



MD/EP 3464306 T2 2024.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3464306 (13) T2

(51) Int. Cl: C07F 9/6558 (2006.01.01)
C07F 9/6561 (2006.01.01)
A61P 21/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0424 (22) Data de depozit: 2017.05.24 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17731337.6, 2017.05.24 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3464306, 2019.04.10 (31) Numărul cererii prioritare: 201662340953 P; 201662357134 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.05.24; 2016.06.30 (33) Țara cererii prioritare: US; US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 08/2024, 2024.08.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 13/2024, 2024.03.27 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 05/2019, 2019.05.31
(71) Solicitant: SAREPTA THERAPEUTICS, INC., US (72) Inventatori: CAI Bao, US; MARTINI Mitchell, US; SHIMABUKU Ross, US; THOMAS Katie, US (73) Titular: SAREPTA THERAPEUTICS, INC., US (74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela	

(54) Procedee de preparare a oligomerilor morfolino fosforodiamidați

(57) Rezumat:

1
Sunt furnizate procedee pentru prepararea unui oligomer (de exemplu, un oligomer morfolino). Procedeele de sinteză descrise aici pot fi avantajoase pentru extinderea sintezei oligomerului, menținând în

2
aceiași timp randamentul general și puritatea unui oligomer sintetizat.
Revendicări: 15
Figuri: 3

MD/EP 3464306 T2 2024.08.31

(54) Processes for preparing phosphorodiamidate morpholino oligomers**(57) Abstract:**

¹
Provided herein are processes for preparing an oligomer (e.g., a morpholino oligomer). The synthetic processes described herein may be advantageous to scaling up

²
oligomersynthesis while maintaining overall yield and purity of a synthesized oligomer.

Claims: 15

Fig.: 3

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****CERERI ÎNRUDITE**

- 5 Această cerere revendică beneficiul cererii de brevet provizoriu SUA nr. 62/340.953, depusă la 24 mai, 2016; și cererii de brevet provizoriu SUA nr. 62/357.134, depusă la 30 iunie, 2016.

FUNDAL

- 10 Tehnologia antisens oferă un mijloc pentru modularea exprimării unuia sau mai multor produse genetice specifice, inclusiv produse alternative de îmbinare, și este utilă în mod unic într-un număr de aplicații terapeutice, de diagnostic și de cercetare. Principiul din spatele tehnologiei antisens este că un compus antisens, de exemplu, o oligonucleotidă, care hibridizează la un acid nucleic țintă, modulează activitățile de exprimare a genelor, cum ar fi transcripția, îmbinarea sau translația prin oricare dintre o varietate de mecanisme antisens. Specificitatea secvenței compușilor antisens îi face atractivi ca
15 instrumente pentru validarea țintei și funcționalizarea genelor, precum și ca agenți terapeutici pentru a modula selectiv exprimarea genelor implicate în boală.

- Distrofia musculară Duchenne (DMD) este cauzată de un defect în exprimarea proteinei distrofină. Gena care codifică proteina conține 79 de exoni răspândiți pe peste 2 milioane de nucleotide de ADN. Orice mutație exonică care schimbă cadrul de citire al exonului sau introduce un codon stop sau
20 este caracterizată prin îndepărtarea unui întreg exon sau exoni din afara cadrului, sau duplicări ale unuia sau mai multor exoni, are potențialul de a perturba producția de distrofină funcțională, rezultând DMD.

- Studiile clinice recente care testează siguranța și eficacitatea oligonucleotidelor de comutare a îmbinării (SSO) pentru tratamentul DMD se bazează pe tehnologia SSO pentru a induce îmbinarea alternativă a pre-ARNm-urilor prin blocarea sterică a spliceozomului (Cirak *și colab.*, 2011; Goemans *și colab.*, 2011; Kinali *și colab.*, 2009; van Deutekom *și colab.*, 2007). Cu toate acestea, în ciuda acestor
25 succese, opțiunile farmacologice disponibile pentru tratarea DMD sunt limitate.

- Eteplirsen este un oligomer morfolino fosforodiamidat (PMO) conceput pentru a sări exonul 51 al genei distrofinei umane la pacienții cu DMD a căror stare poate fi ameliorată prin sărirea exonului 51 pentru a restabili cadrul de citire și a produce o formă funcțională mai scurtă a proteinei distrofină. Sarepta Therapeutics, Inc., a depus o cerere de medicament nou (NDA) la Administrația pentru Alimente
30 și Medicamente din Statele Unite (FDA) pentru a solicita aprobarea pentru tratamentul DMD la pacienții a căror stare poate fi ameliorată prin sărirea exonului 51. NDA al firmei Sarepta este în prezent în curs de revizuire de către FDA.

- WO2013/082551 A1 descrie utilizarea unui compus antisens pentru inducerea incluziunii exonului ca tratament pentru atrofia musculară spinală (SMA). Mai particular, se referă la inducerea
35 includerii exonului 7 pentru a restabili nivelurile proteinei neuronului motor de supraviețuire (SMN) codificată de gena neuronului motor de supraviețuire (SMN). Acest document prezintă în continuare procedeele pentru producerea de oligonucleotide morfolino antisens.

- WO 2014/153240 A2 descrie molecule antisens capabile să se lege la un situs țintă selectat din gena distrofină umană pentru a induce sărirea exonului 53. Acest document prezintă în continuare
40 procedeele pentru producerea de oligonucleotide morfolino antisens.

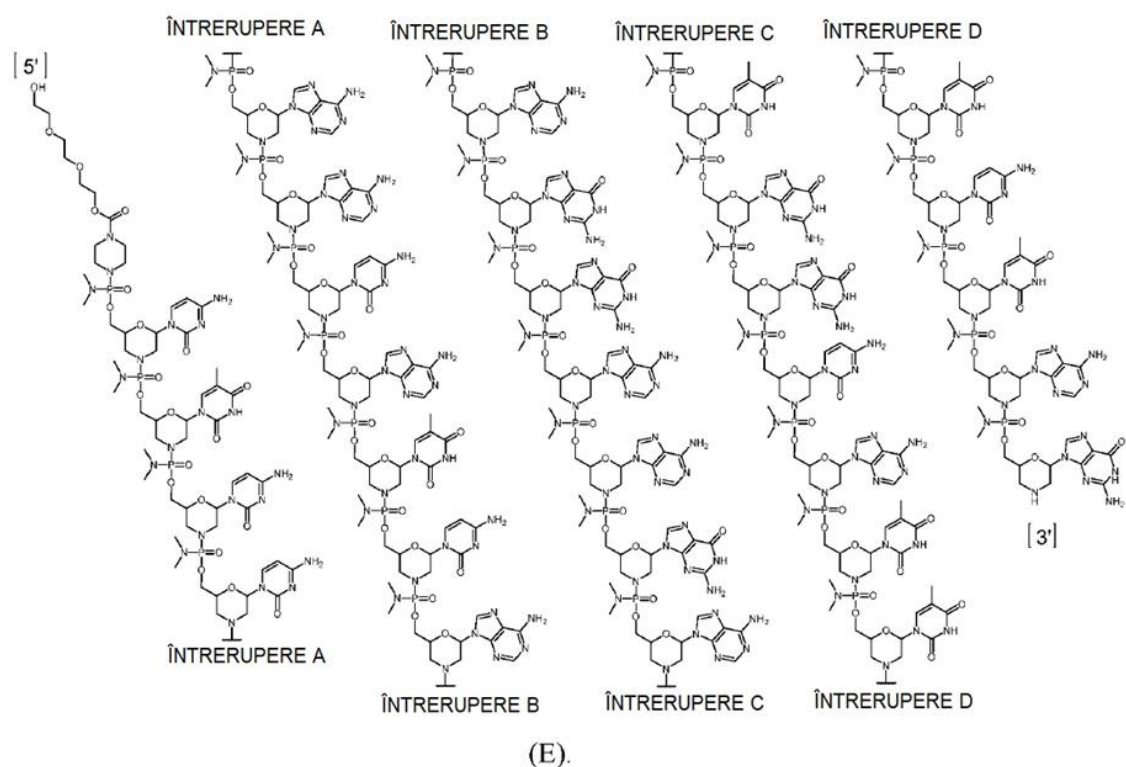
- WO 2011/150408 A2 dezvăluie oligonucleotide antisens utile pentru tratamentul bolilor în care inhibarea exprimării proteinei sau corectarea produselor de îmbinare a ARNm aberante produce efecte
45 terapeutice benefice. Acest document prezintă în continuare procedeele pentru producerea de oligonucleotide morfolino antisens.

Deși s-au făcut progrese semnificative în domeniul tehnologiei antisens, în domeniu rămâne o nevoie de metode de preparare a oligomerilor morfolino fosforodiamidați cu performanță antisens sau antigenă îmbunătățită.

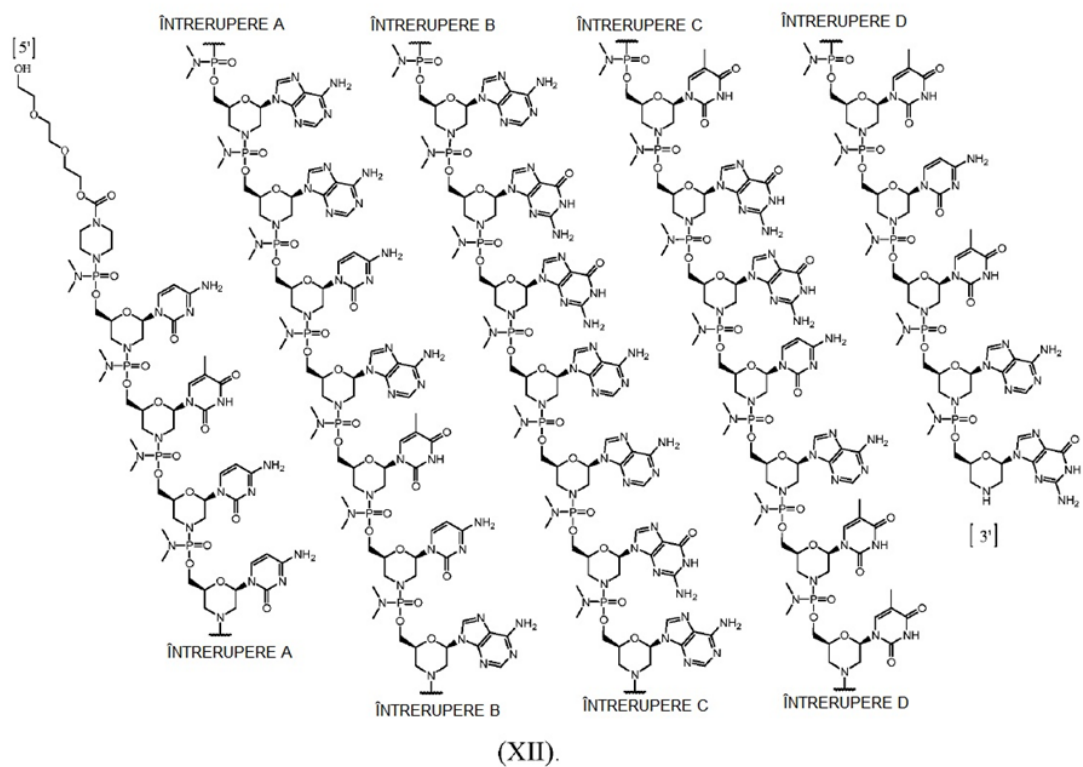
REZUMAT

50 Aici sunt furnizate procedee pentru prepararea de oligomeri morfolino fosforodiamidați (PMO). Procedeele de sinteză descrise aici permit o sinteză extinsă a PMO, menținând în același timp randamentul general și puritatea unui PMO sintetizat.

- 55 Prezenta invenție se referă la un procedeu pentru prepararea unui compus oligomeric cu Formula (E):



Într-un alt exemplu de realizare, compusul oligomeric din dezvăluire care include, de exemplu, unele exemple de realizare ale unui compus oligomeric cu Formula (E), este un compus oligomeric cu Formula (XII):



Pentru claritate, formulele structurale care includ, de exemplu, compusul oligomeric cu Formula (E) și Eteplirsen, descrise prin Formula (XII), sunt o formulă structurală continuă de la 5' la 3' și, pentru comoditatea descrierii întregii formule într-o formă compactă în formulele structurale de mai sus, Solicitanții au inclus diverse întreruperi în ilustrare etichetate "ÎNTRERUPERE A", "ÎNTRERUPERE

B", "ÎNTRERUPERE C" și "ÎNTRERUPERE D". Așa cum ar fi înțeles de către specialistul în domeniu, de exemplu, fiecare indicație a "ÎNTRERUPERII A" arată o continuare a ilustrării formulei structurale în aceste puncte. Specialistul în domeniu înțelege că același lucru este valabil pentru fiecare exemplu de "ÎNTRERUPERE B", "ÎNTRERUPERE C" și "ÎNTRERUPERE D" în formulele structurale de mai sus, incluzând Eteplirsen. Niciuna dintre întreruperile ilustrației, totuși, nu este destinată să indice și nici un specialist în domeniu nu le-ar înțelege ca însemnând o întrerupere reală a formulelor structurale de mai sus, incluzând Eteplirsen.

SCURTĂ DESCRIERE A FIGURILOR

Fig. 1 prezintă o cromatogramă de cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) analitică reprezentativă a unei substanțe medicamentoase brute Eteplirsen (AVI-4658) sintetizate și deprotejate (vezi Exemplul 4).

Fig. 2 prezintă o cromatogramă HPLC analitică reprezentativă a unei soluții purificate de substanță medicamentoasă Eteplirsen (vezi Exemplul 5).

Fig. 3 prezintă o cromatogramă HPLC analitică reprezentativă a unei substanțe medicamentoase Eteplirsen desărate și liofilizate (vezi Exemplul 5).

DESCRIERE DETALIATĂ

Aici sunt furnizate procedee pentru prepararea unui oligomer morfolino așa cum este definit aici. Oligomerul morfolino descris aici prezintă o afinitate mai puternică pentru ADN și ARN fără a compromite selectivitatea secvenței, în raport cu oligonucleotidele native sau nemodificate. Așa cum este descris aici, oligomerul morfolino din dezvoltare minimizează sau previne clivarea de către RNaza H. Așa cum este descris aici, oligomerul morfolino din dezvoltare nu activează RNaza H.

Procedeele descrise aici sunt avantajoase într-un procedeu la scară industrială și pot fi aplicate la prepararea cantităților de oligomer morfolino cu randament și la scară mare (de exemplu, aproximativ 1 kg, aproximativ 1-10 kg, aproximativ 2-10 kg, aproximativ 5-20 kg, aproximativ 10-20 kg, sau aproximativ 10-50 kg).

Definiții

Mai jos sunt enumerate definițiile diferiților termeni folosiți pentru a descrie această dezvoltare. Aceste definiții se aplică termenilor așa cum sunt utilizați în această specificație și în revendicări, cu excepția cazului în care sunt limitate altfel în cazuri specifice, fie individual, fie ca parte a unui grup mai mare.

"Protejat de bază" sau "protecție de bază" se referă la protecția grupărilor de împerechere de baze, de exemplu baze purinice sau pirimidinice, pe subunitățile morfolino cu grupări protectoare adecvate pentru a preveni reacția sau interferența grupărilor de împerechere de baze în timpul sintezei treptate a oligomerului. (Un exemplu de subunitate morfolino protejată de bază este compusul subunității C activate (C) având o grupare protectoare CBZ pe gruparea amino citozină descrisă mai jos.)

O "grupare fosforamidat activată" este în mod tipic o grupare clorofosforamidat, având substituție la azot care este dorită în eventuala legătură fosforodiamidat în oligomer. Un exemplu este (dimetilamino)clorofosforamidat, adică -OP(=O)(NMe₂)Cl.

Termenul "legat la suport" se referă la o entitate chimică care este legată covalent la un mediu-suport.

Termenul "mediu-suport" se referă la orice material incluzând, de exemplu, orice particulă, granula sau suprafață, pe care un oligomer poate fi atașat sau sintetizat sau poate fi modificat pentru atașarea sau sinteza unui oligomer. Substraturile reprezentative includ, dar nu se limitează la, suporturi anorganice și suporturi organice, cum ar fi sticla și sticla modificată sau funcționalizată, materiale plastice (inclusiv acrilice, polistiren și copolimeri de stiren și alte materiale, polipropilenă, polietilenă, polibutilenă, poliuretani, TEFLON, etc.), polizaharide, nylon sau nitroceluloză, ceramică, rășini, silice sau materiale pe bază de silice, inclusiv siliciu și siliciu modificat, carbon, metale, sticlă anorganică, materiale plastice, fascicule de fibre optice și o varietate de alți polimeri. Mediile-suport și suprafețele solide deosebit de utile pentru unele exemple de realizare sunt amplasate în interiorul unui aparat cu flux de celule. În unele exemple de realizare a procedeele descrise aici, mediul-suport cuprinde polistiren cu 1% divinilbenzen reticulat.

În unele exemple de realizare, mediul-suport reprezentativ cuprinde cel puțin un situs reactiv pentru atașarea sau sinteza unui oligomer. De exemplu, în unele exemple de realizare, un mediu-suport al dezvoltării cuprinde una sau mai multe grupări amino sau hidroxil terminale capabile să formeze o

legătură chimică cu o subunitate de intrare sau altă grupare activată pentru atașarea sau sintetizarea unui oligomer.

Unele medii-suport reprezentative care sunt adaptabile la procedeele descrise aici includ, dar nu sunt limitate la, următoarele: sticlă cu pori controlați (CPG); sticlă cu pori controlat de oxalil (vezi, de exemplu, Alul, și colab., *Nucleic Acids Research* 1991, 19, 1527); particule care conțin silice, cum ar fi granule de sticlă poroasă și silicagel, cum ar fi cel format prin reacția tricloro-[3-(4-clorometil)fenil]propilsilanului și sticlă poroasă (vezi Parr și Grohmann, *Angew. Chem. Internat. Ed.* 1972, 11, 314, vândută sub marca comercială "PORASIL E" de Waters Associates, Framingham, Mass., SUA); un monoester al 1,4-dihidroximetilbenzenului și silicei (vezi Bayer and Jung, *Tetrahedron Lett.*, 1970, 4503, vândut sub marca comercială "BIOPAK" de Waters Associates); TENTAGEL (vezi, de exemplu, Wright, și colab., *Tetrahedron Letters* 1993, 34, 3373); matrice cu granule de copolimer de stiren/divinilbenzen reticulat sau POROS, un copolimer de polistiren/divinilbenzen (disponibil de la Perceptive Biosystems); mediu-suport solubil, cum ar fi polietilenglicol PEG (vezi Bonora și colab., *Organic Process Research & Development*, 2000, 4, 225-231); suport PEPS, care este o peliculă de polietilenă (PE) cu grefe de polistiren (PS) suspendat cu lanț lung (vezi Berg, și colab., *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 8024 și cererea de brevet internațional WO 1990/02749); copolimeri ai dimetilacrilamidei reticulați cu N,N'-bisacriloloiletilendiamină, inclusiv o cantitate cunoscută de N-terț-butoxicarbonil-beta-alanil-N'-acriloloilhexametildiamină (vezi Atherton, și colab., *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, 97, 6584, *Bioorg. Chem.* 1979, 8, 351, și *J. C. S. Perkin I* 538 (1981)); particule de sticlă acoperite cu un polimer de stiren reticulat hidrofob (vezi Scott, și colab., *J. Chrom. Sci.*, 1971, 9, 577); polimer de etilenă fluorurat pe care a fost grefat polistiren (vezi Kent și Merrifield, *Israel J. Chem.* 1978, 17, 243 și van Rietschoten în *Peptides* 1974, Y. Wolman, Ed., Wiley and Sons, New York, 1975, pp. 113-116); membrane de polipropilenă acoperite cu hidroxipropilacrilat (Daniels, și colab., *Tetrahedron Lett.* 1989, 4345); tije de polietilenă grefate cu acid acrilic (Geysen, și colab., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 3998); un "pliculeț de ceai" care conține granule polimerice utilizate în mod tradițional (Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 5131); și combinații ale acestora.

Termenul "aparat cu flux de celule" se referă la o cameră care cuprinde o suprafață (de exemplu, suprafață solidă) prin care pot fi trecuți unul sau mai mulți reactivi fluizi (de exemplu, lichid sau gaz).

Termenul "agent de deblocare" se referă la o compoziție (de exemplu, o soluție) care cuprinde un acid chimic sau o combinație de acizi chimici pentru îndepărtarea grupărilor protectoare. Exemple de acizi chimici utilizați în agenții de deblocare includ acizi halogenați, de exemplu, acid cloracetic, acid dicloracetic, acid tricloroacetic, acid fluoroacetic, acid difluoroacetic și acid trifluoroacetic. În unele exemple de realizare, un agent de deblocare îndepărtează una sau mai multe grupări tritol, de exemplu, dintr-un oligomer, un oligomer legat de suport, o subunitate legată de suport sau alt fragment protejat de azot sau oxigen.

Termenii "halogen" și "halo" se referă la un atom selectat din grupul constând din fluor, clor, brom și iod.

Termenul "agent de capsulare" se referă la o compoziție (de exemplu, o soluție) care cuprinde o anhidridă acidă (de exemplu, anhidridă benzoică, anhidridă acetică, anhidridă fenoxiacetică și altele asemenea) utilă pentru blocarea unui situs reactiv, de exemplu, al unui mediu-suport care formează o legătură chimică cu o subunitate de intrare sau alt grup activat.

Termenul "agent de clivare" se referă la o compoziție (de exemplu, o soluție lichidă sau un amestec gazos) care cuprinde o bază chimică (de exemplu, amoniac sau 1,8-diazabicycloundec-7-enă) sau o combinație de baze chimice utile pentru clivare, pentru de exemplu, un oligomer legat de suport dintr-un mediu-suport.

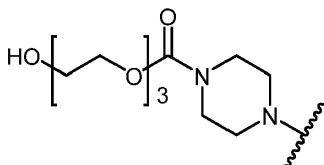
Termenul "agent de deprotejare" se referă la o compoziție (de exemplu, o soluție lichidă sau un amestec gazos) care cuprinde o bază chimică (de exemplu, amoniac, 1,8-diazabicycloundec-7-enă sau carbonat de potasiu) sau o combinație de baze chimice utile pentru eliminarea grupărilor protectoare. De exemplu, un agent de deprotejare, în unele exemple de realizare, poate îndepărta protecția de bază de la, de exemplu, o subunitate morfolino, subunități morfolino ale unui oligomer morfolino sau versiuni ale acestora legate de suport.

Termenul "solvent" se referă la o componentă a unei soluții sau a unui amestec în care este dizolvat un solvat. Solvenții pot fi anorganici sau organici (de exemplu, acid acetic, acetona, acetonitril, acetyl acetona, 2-aminoetanol, anilină, anisol, benzen, benzonitril, alcool benzilic, 1-butanol, 2-butanol, i-butanol, 2-butanonă, alcool t-butilic, disulfură de carbon, tetraclorură de carbon, clorbenzen, cloroform, ciclohexan, ciclohexanol, ciclohexanonă, di-n-butilftalat, 1,1-diclorețan, 1,2-diclorețan, dietilamină, dietilenglicol, diglime, dimetoxietan (glime), N,N-dimetilanilină, dimetilformamidă, dimetilftalat, dimetilsulfoxid, dioxan, etanol, eter, acetat de etil, acetoacetat de etil, benzoat de etil, etilenglicol, glicerină, heptan, 1-heptanol, hexan, 1-hexanol, metanol, acetat de metil, metil t-butil eter, clorură de

metilen, 1-octanol, pentan, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-pentanonă, 3-pentanonă, 1-propanol, 2-propanol, piridină, tetrahidrofuran, toluen, apă, p-xilen).

Expresiile "oligomer morfolino" și "oligomer morfolino fosforodiamidat" sau "PMO" se referă la un oligomer având subunități morfolino legate între ele prin legături fosforodiamidat, unind azotul morfolino al unei subunități la carbonul 5'-exociclic al unei subunități adiacente. Fiecare subunitate morfolino cuprinde o porțiune de împerechere a nucleobazelor eficientă pentru a se lega, prin legături de hidrogen specifice nucleobazei, la o nucleobază dintr-o țintă.

Termenul "coadă EG3" se referă la fragmente de trietilenglicol conjugate la oligomer, de exemplu, la capătul său 3' sau 5'. De exemplu, în unele exemple de realizare, "coada EG3" conjugată la capătul 3' al unui oligomer poate avea structura:



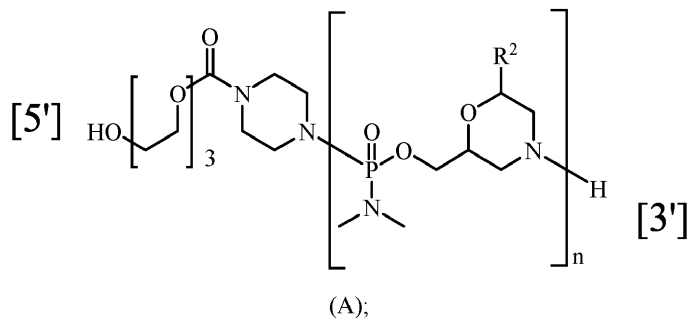
Termenii "aproximativ" sau "circa" sunt înțeleși în general de către persoanele cu cunoștințe în domeniul relevant, dar în anumite circumstanțe pot însemna $\pm 10\%$ sau $\pm 5\%$ dintr-o anumită valoare sau interval.

Procedee de preparare a oligomerilor morfolino

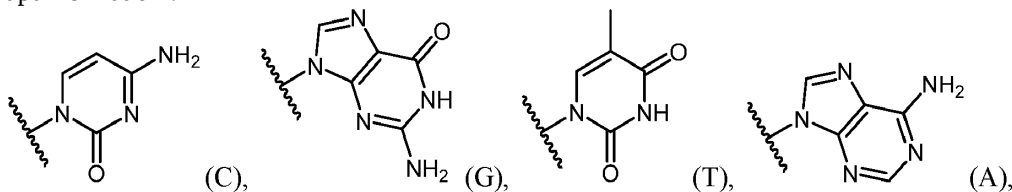
Sinteza este în general preparată, așa cum este descris aici, pe un mediu-suport. În general, un prim sinton (de exemplu, un monomer, cum ar fi o subunitate morfolino) este mai întâi atașat la un mediu-suport, iar oligomerul este apoi sintetizat prin cuplarea secvențială a subunităților la sintonul legat de suport. Această alungire iterativă are ca rezultat în cele din urmă un compus oligomeric final. Mediile-suport adecvate pot fi solubile sau insolubile sau pot avea solubilitate variabilă în diferiți solvenți pentru a permite polimerului în creștere legat de suport să fie în soluție sau în afara acesteia, după cum se dorește. Mediile-suport convenționale sunt în cea mai mare parte insolubile și sunt amplasate în mod obișnuit în vase de reacție, în timp ce reactivii și solvenții reacționează cu și/sau spală lanțul în creștere până când oligomerul atinge lungimea țintă, după care este clivat de la suport și, dacă este necesar, prelucrat în continuare pentru a produce compusul polimeric final. Abordări mai recente au introdus suporturi solubile, inclusiv suporturi polimerice solubile, pentru a permite precipitarea și dizolvarea produsului sintetizat iterativ în punctele dorite ale sintezei (Gravert și colab., Chem. Rev., 1997, 97, 489-510).

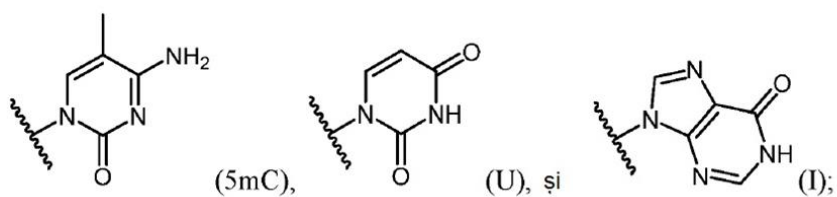
Aici sunt furnizate procedee pentru prepararea de oligomeri morfolino.

Într-un alt aspect, aici este prezentat un procedeu pentru prepararea unui compus oligomeric cu formula (A):

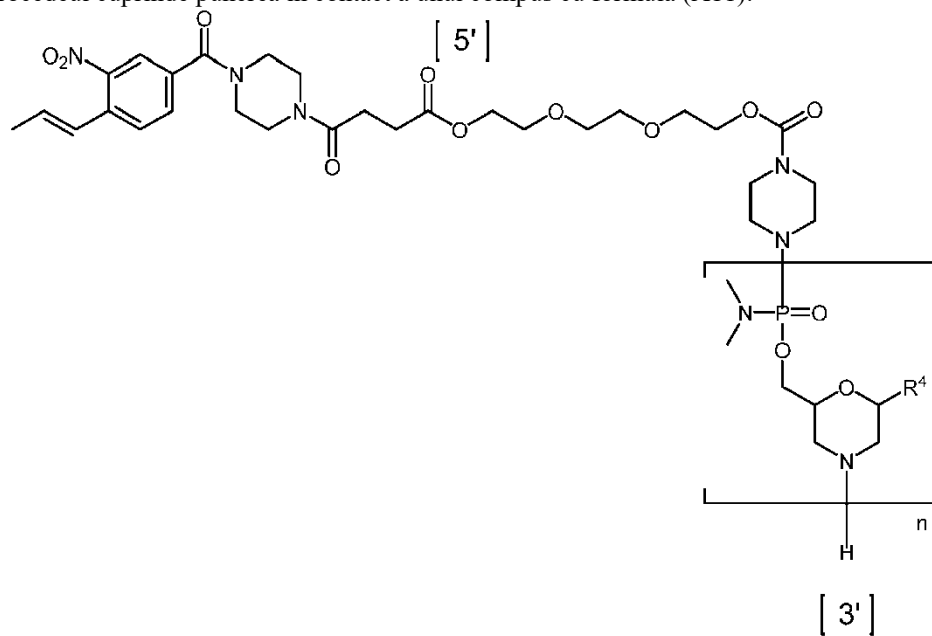


în care n este un număr întreg de la 10 la 40 și fiecare R^2 este selectat, independent pentru fiecare apariție, din grupul format din:



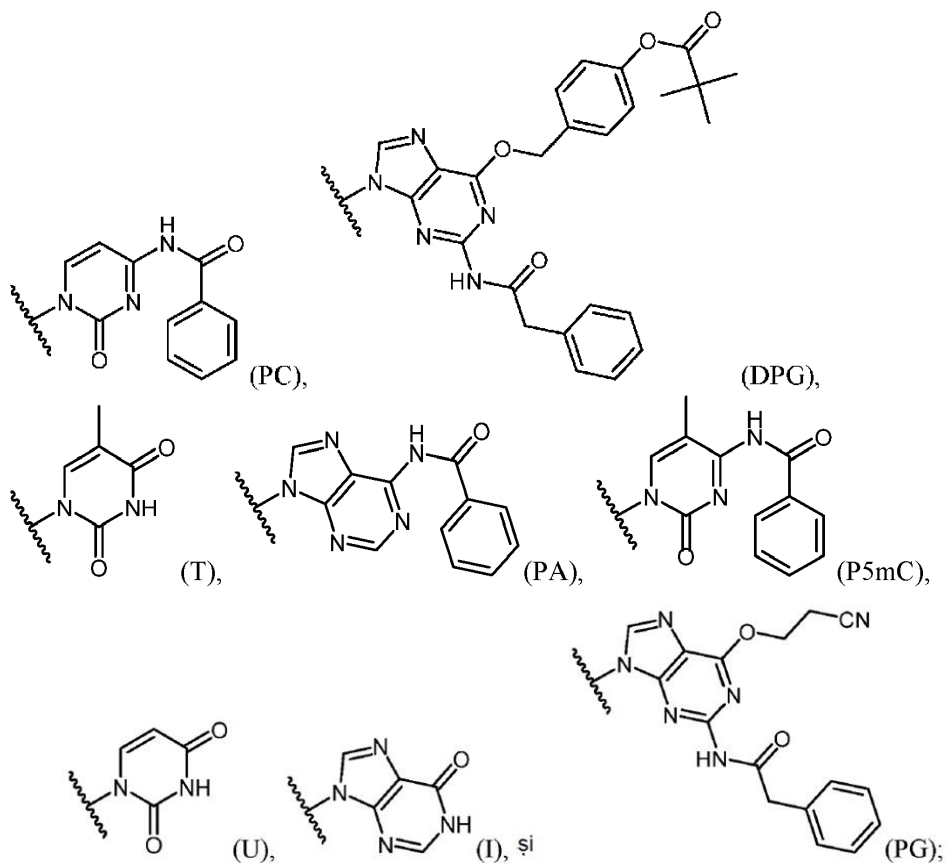


în care procedeul cuprinde punerea în contact a unui compus cu formula (A11):



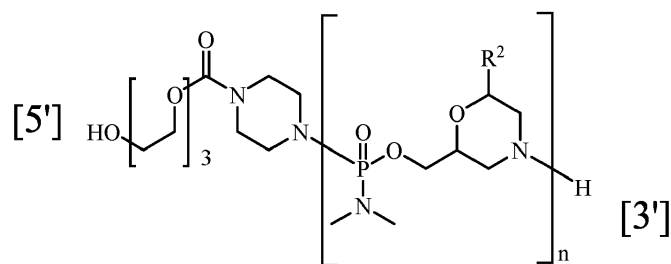
(A11);

5 în care n este un număr întreg de la 10 la 40 și fiecare R⁴ este selectat, independent pentru fiecare apariție, din grupul format din:



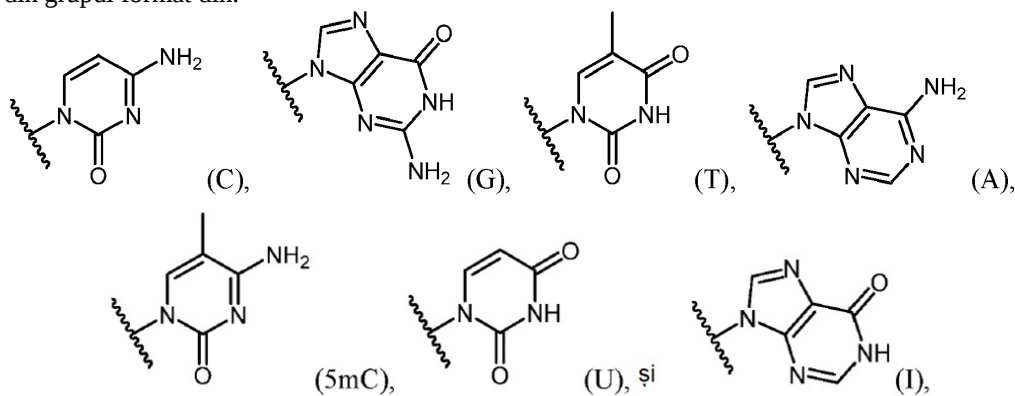
cu un agent de deprotezare pentru a forma compusul oligomeric cu formula (A).

- 5 Într-un alt aspect, aici este prezentat un procedeu pentru prepararea unui compus oligomeric cu formula (A):



(A);

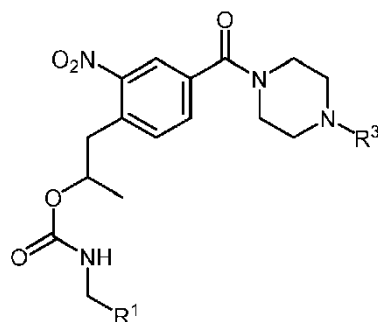
în care n este un număr întreg de la 10 la 40 și fiecare R^2 este selectat, independent pentru fiecare apariție, din grupul format din:



în care procedeul cuprinde etapele secvențiale de:

- (a) punerea în contact a unui compus cu formula (A1):

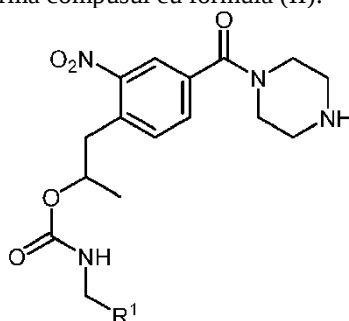
10



(A1);

în care R^1 este un mediu-suport și R^3 este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil;

cu un agent de deblocare pentru a forma compusul cu formula (II):

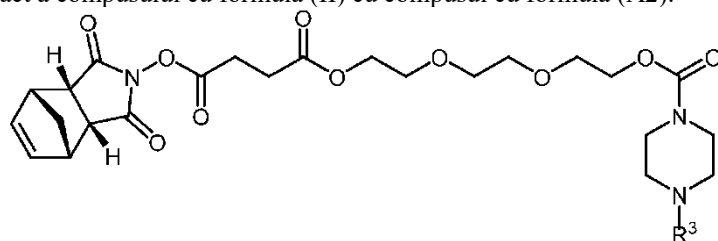


(II);

5

în care R^1 este un mediu-suport;

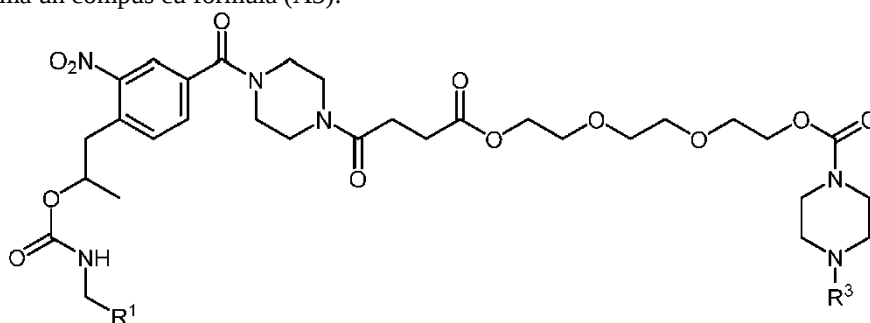
(b) punerea în contact a compusului cu formula (II) cu compusul cu formula (A2):



(A2);

în care R^3 este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil; pentru a forma un compus cu formula (A3):

10

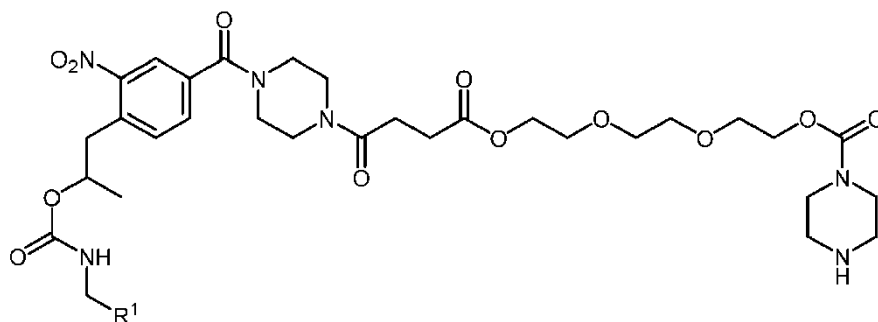


(A3);

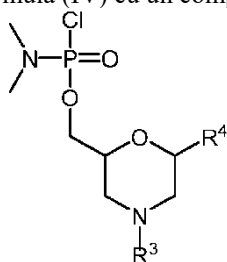
în care R^1 este un mediu-suport și R^3 este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil;

(c) punerea în contact a compusului cu formula (A3) cu un agent de deblocare pentru a forma un compus cu formula (IV):

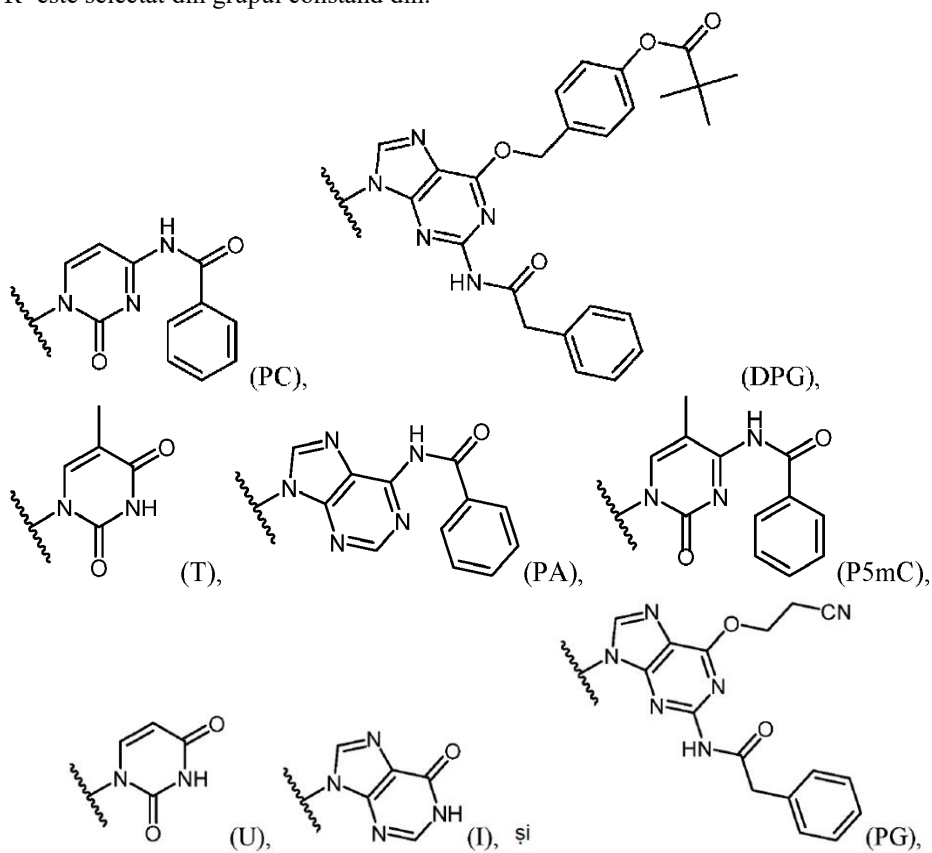
15



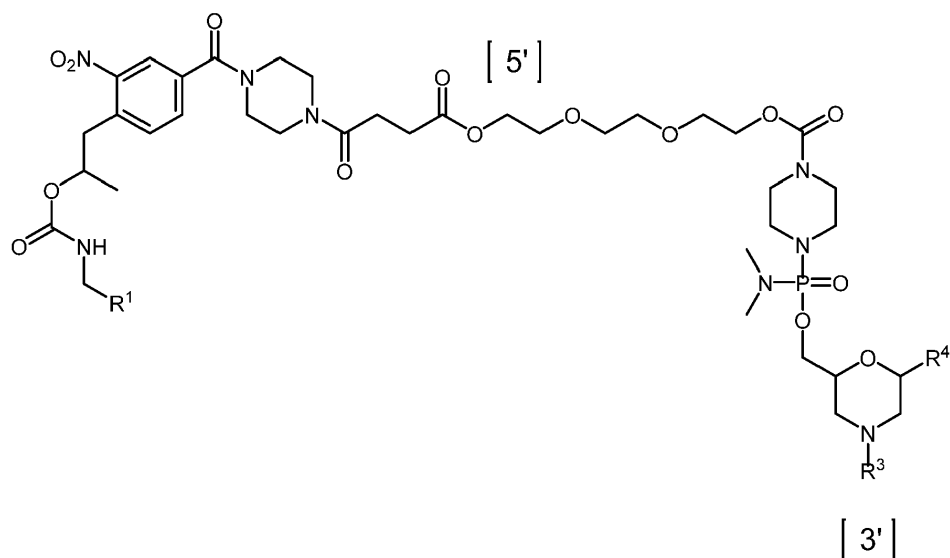
(d) punerea în contact a compusului cu formula (IV) cu un compus cu formula (A4):



5 în care R^3 este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil, și R^4 este selectat din grupul constând din:



10 pentru a forma un compus cu formula (A5):

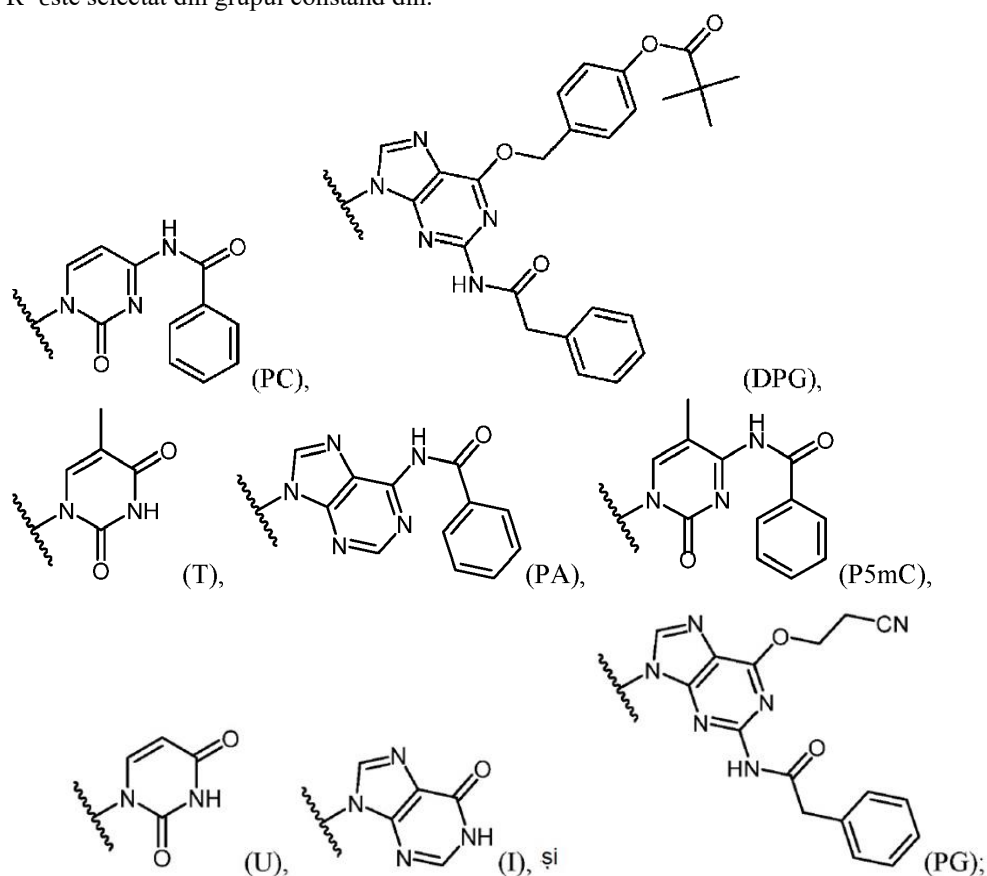


(A5);

în care R^1 este un mediu-suport, R^3 este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil și

R^4 este selectat din grupul constând din:

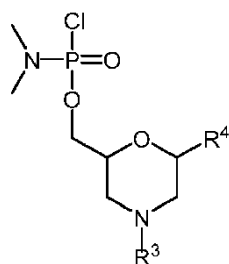
5



(e) efectuarea de n-1 iterații ale etapelor secvențiale de:

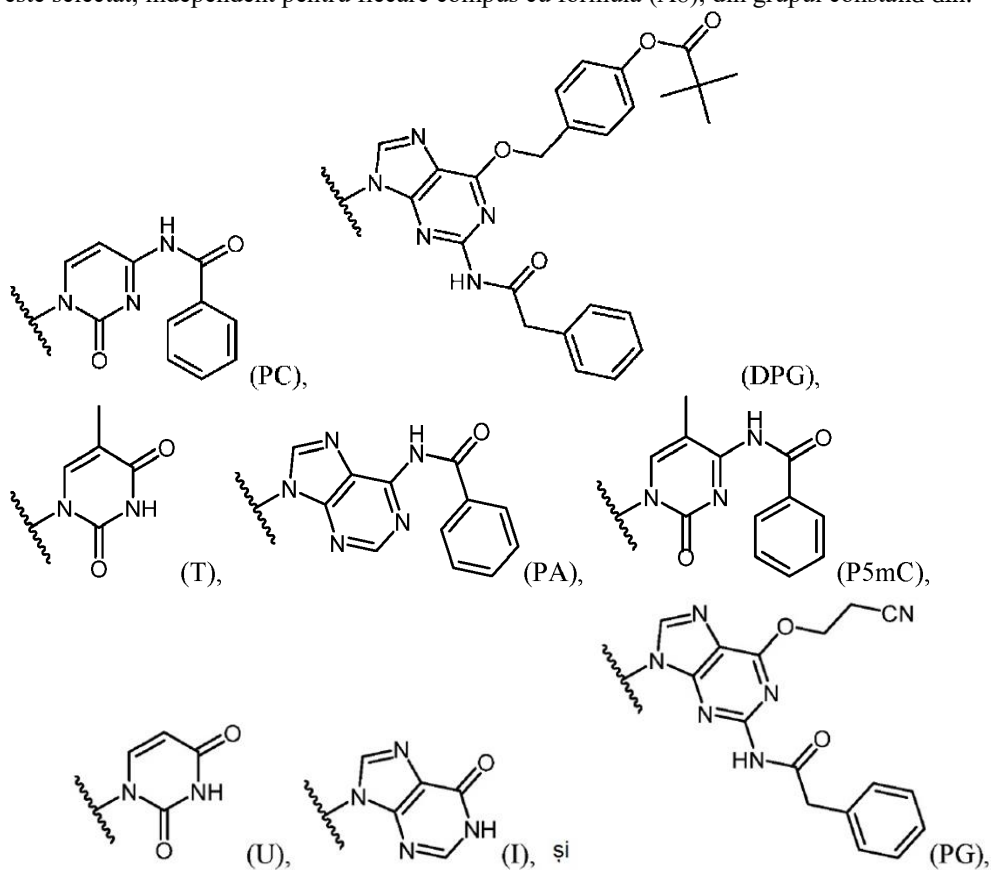
- 10 (e1) punerea în contact a produsului format prin etapa imediat anterioară cu un agent de deblocare; și
 (e2) punerea în contact a compusului format prin etapa imediat anterioară cu un compus cu formula (A8):

13

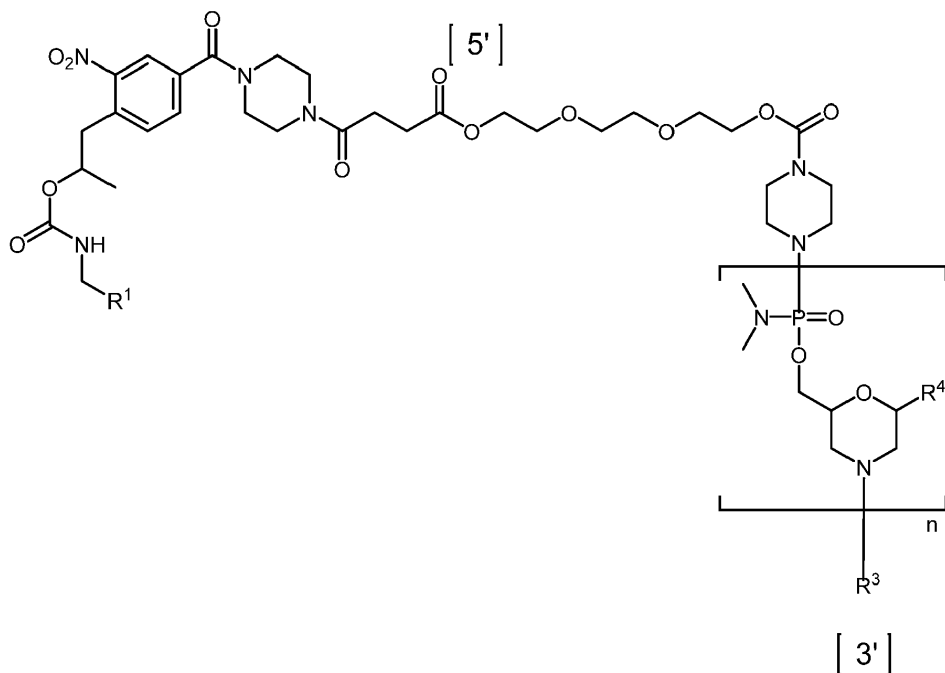


(A8);

în care R^3 este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil și R^4 este selectat, independent pentru fiecare compus cu formula (A8), din grupul constând din:

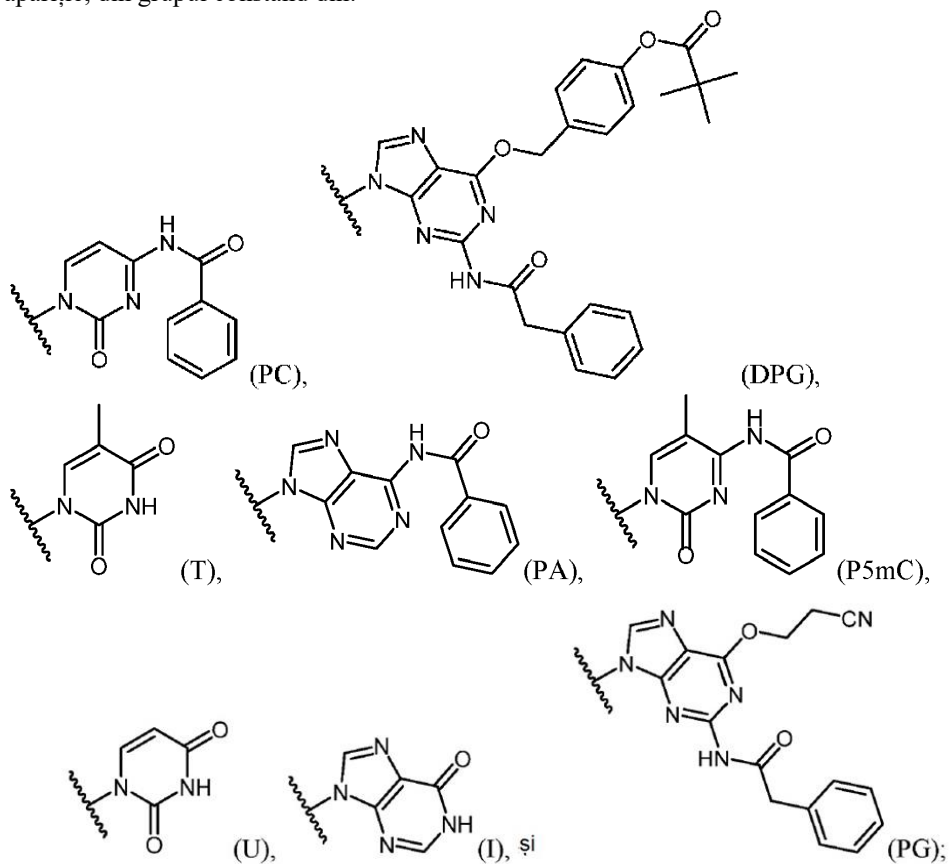


pentru a forma un compus cu formula (A9):



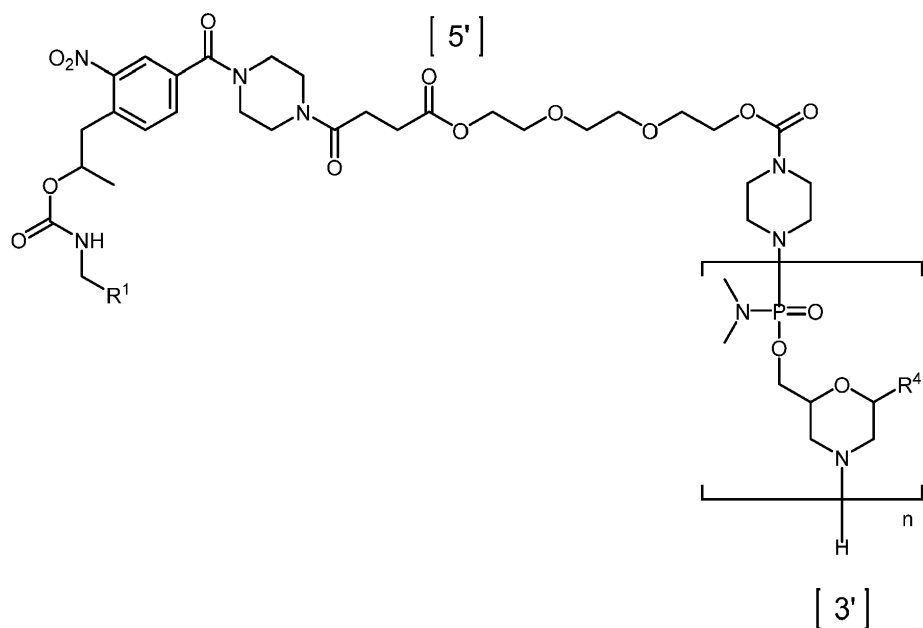
(A9);

în care n este un număr întreg de la 10 la 40, R¹ este un mediu-suport, R³ este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil și R⁴ este selectat, independent pentru fiecare apariție, din grupul constând din:



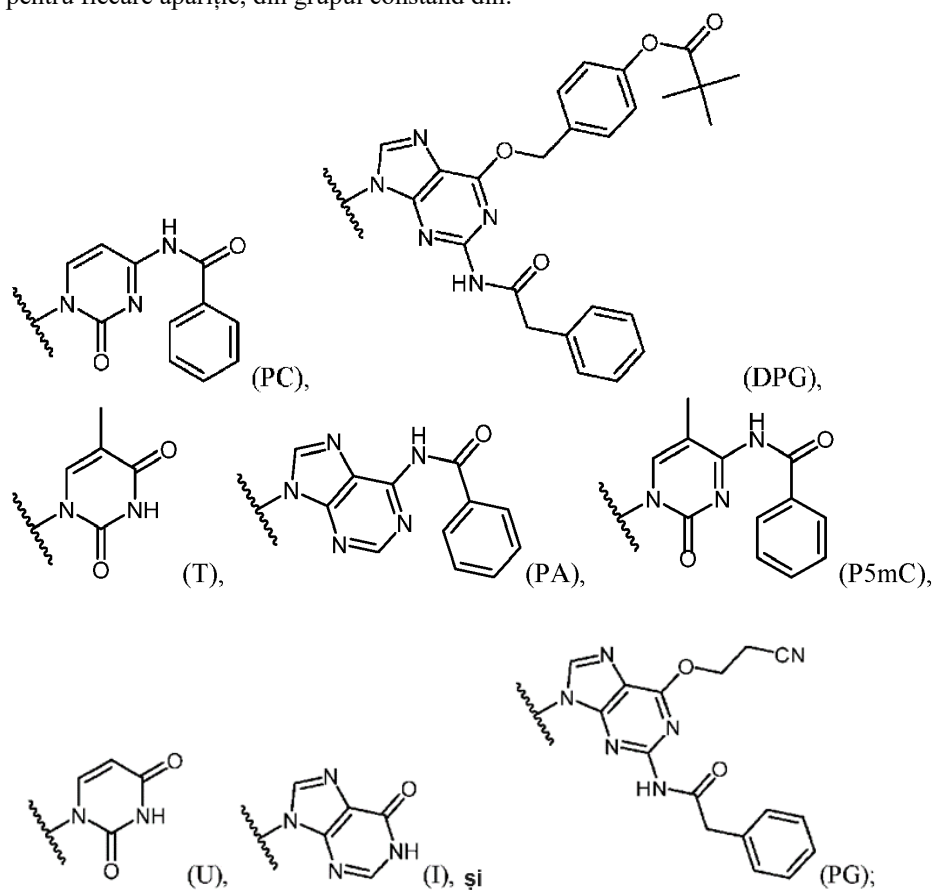
și

(f) punerea în contact a compusului cu formula (A9) cu un agent de deblocare pentru a forma un compus cu formula (A10):

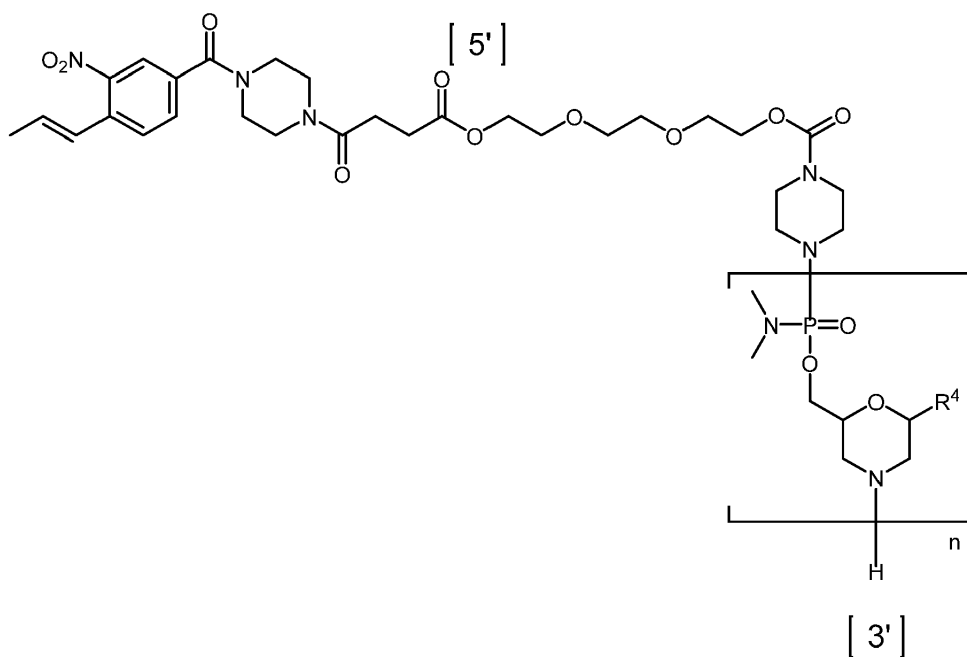


(A10);

în care n este un număr întreg de la 10 la 40, R^1 este un mediu-suport, iar R^4 este selectat, independent pentru fiecare apariție, din grupul constând din:

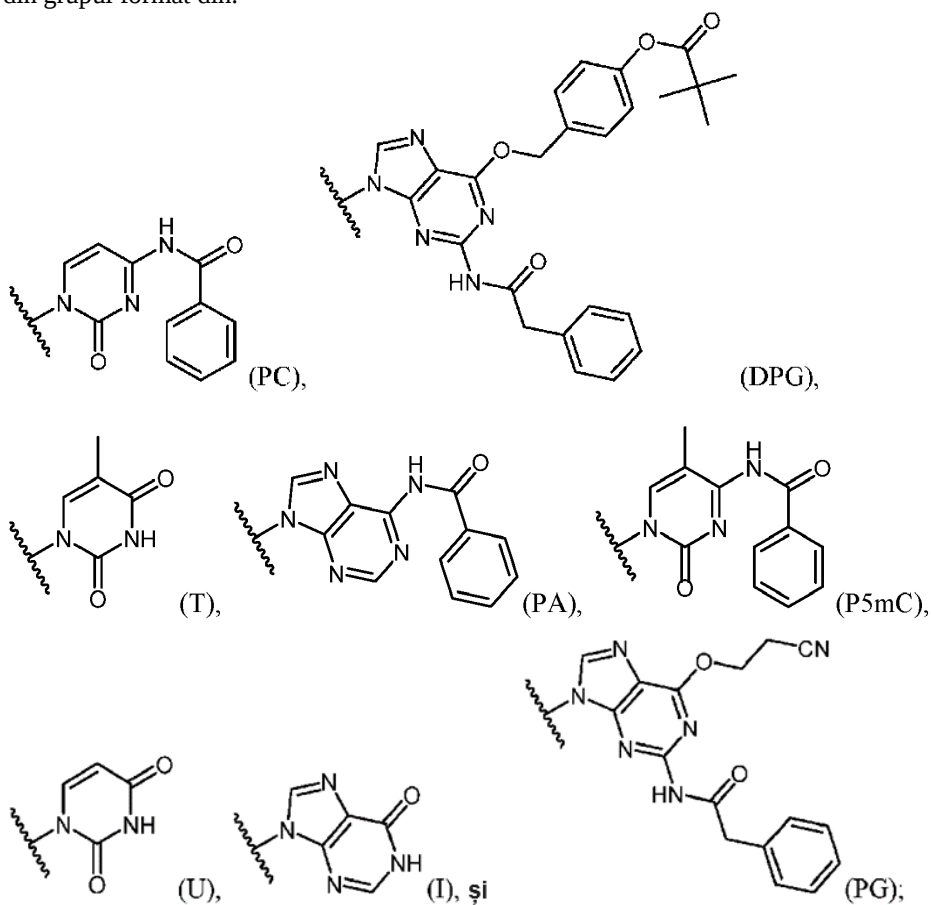


(g) punerea în contact a compusului cu formula (A10) cu un agent de clivare pentru a forma un compus cu formula (A11):



(A11);

în care n este un număr întreg de la 10 la 40 și fiecare R^4 este selectat, independent pentru fiecare apariție, din grupul format din:



și

(h) punerea în contact a compusului cu formula (A11) cu un agent de deprotejare pentru a forma compusul oligomeric cu formula (A).

Într-un exemplu de realizare, etapa (d) sau etapa (e2) mai cuprinde punerea în contact a compusului cu formula (IV) sau, respectiv, a compusului format prin etapa imediat anterioară cu un agent de capsulare.

Într-un alt exemplu de realizare, fiecare etapă este realizată în prezența cel puțin unui solvent.

5 Într-un alt exemplu de realizare, agentul de deblocare utilizat în fiecare etapă este o soluție care cuprinde un acid halogenat.

Într-un alt exemplu de realizare, agentul de deblocare utilizat în fiecare etapă este acidul cianoacetic.

10 Într-un alt exemplu de realizare, acidul halogenat este selectat din grupul constând din acid cloroacetic, acid dicloroacetic, acid tricloroacetic, acid fluoroacetic, acid difluoroacetic și acid trifluoroacetic.

Într-un alt exemplu de realizare, acidul halogenat este acidul trifluoroacetic.

Într-un alt exemplu de realizare, cel puțin una dintre etapele (a), (c), (e1) și (f) mai cuprinde etapa de punere în contact a compusului deblocat din fiecare etapă cu un agent de neutralizare.

15 Într-un alt exemplu de realizare, fiecare dintre etapele (a), (c), (e1) și (f) mai cuprinde etapa de punere în contact a compusului deblocat din fiecare etapă cu un agent de neutralizare.

Într-un alt exemplu de realizare, agentul de neutralizare este într-o soluție care cuprinde diclormetan și alcool izopropilic.

20 Într-un alt exemplu de realizare, agentul de neutralizare este o monoalchil-, dialchil- sau trialchilamină.

Într-un alt exemplu de realizare, agentul de neutralizare este N,N-diizopropiletilamină.

Într-un alt exemplu de realizare, agentul de deblocare utilizat în fiecare etapă este o soluție care cuprinde 4-cianopiridină, diclormetan, acid trifluoroacetic, trifluoroetanol și apă.

25 Într-un alt exemplu de realizare, agentul de capsulare este într-o soluție care cuprinde etilmorfolină și metilpirolidinonă.

Într-un alt exemplu de realizare, agentul de capsulare este o anhidridă acidă.

Într-un alt exemplu de realizare, anhidrida acidă este anhidridă benzoică.

Într-un alt exemplu de realizare, compușii cu formula (A4) și formula (A8) sunt fiecare, independent, într-o soluție care cuprinde etilmorfolină și dimetilimidazolidinonă.

30 Într-un alt exemplu de realizare, agentul de clivare cuprinde ditiotritol și 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enă.

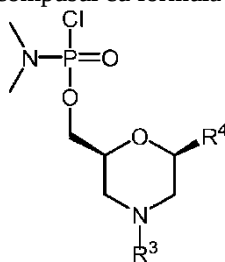
Într-un alt exemplu de realizare, agentul de clivare este într-o soluție care cuprinde N-metil-2-pirolidonă.

35 Într-un alt exemplu de realizare, agentul de deprotejare cuprinde NH_3 .

Într-un alt exemplu de realizare, agentul de deprotejare este într-o soluție apoasă.

Într-un alt exemplu de realizare, mediul-suport cuprinde polistiren cu 1% divinilbenzen reticulat.

Într-un alt exemplu de realizare, compusul cu formula (A4) are formula (A4a):

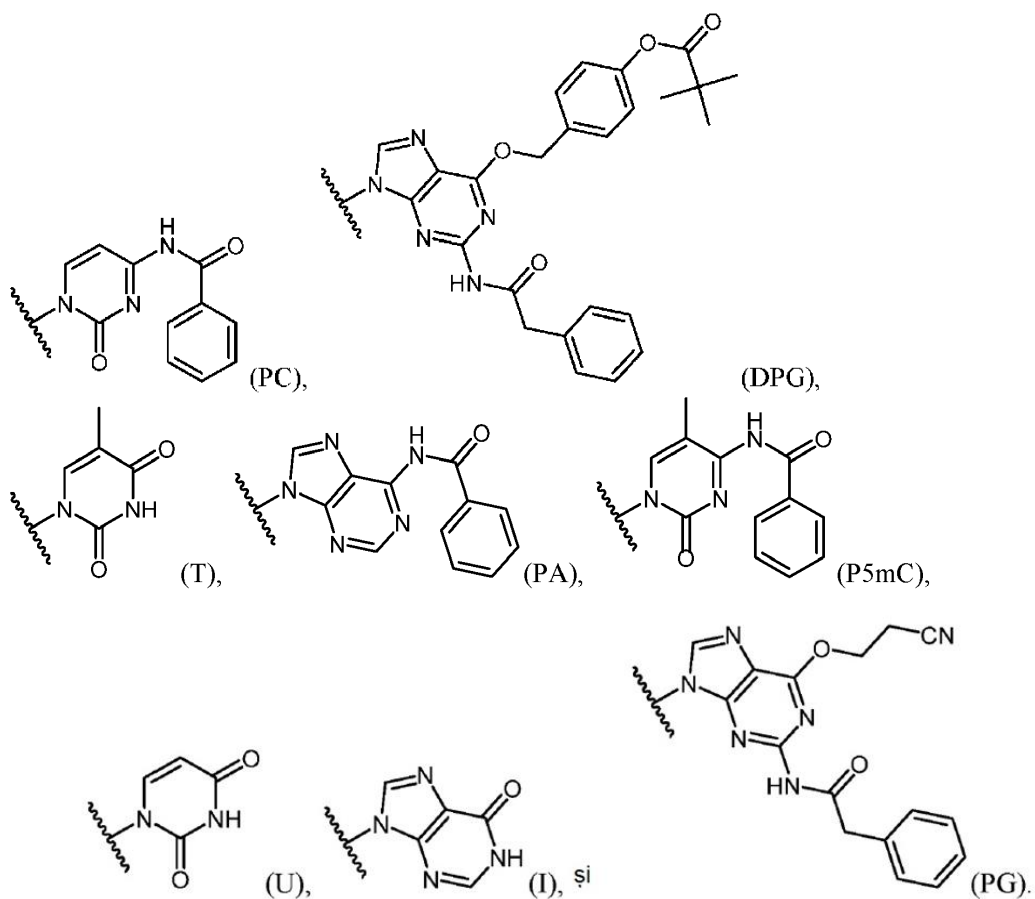


(A4a);

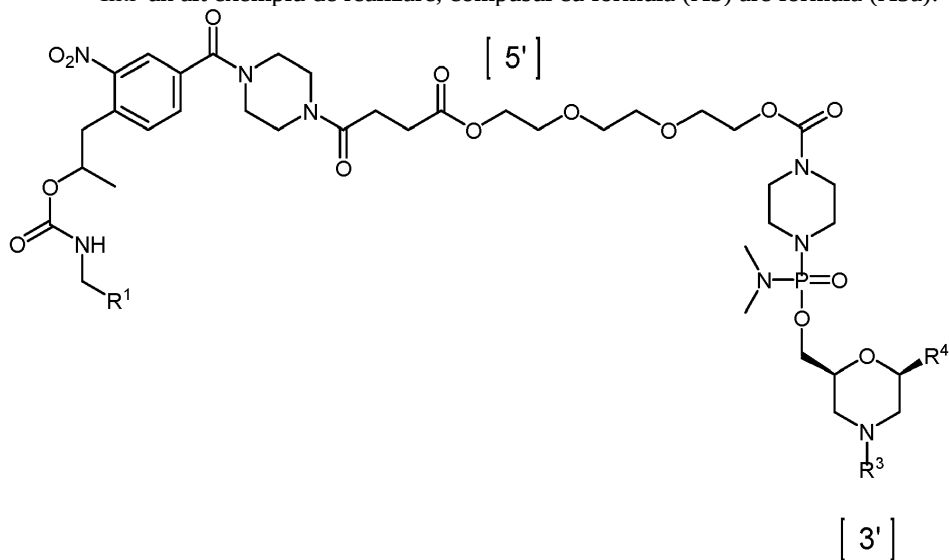
în care:

40 R^3 este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil și

R^4 este selectat dintre:



Într-un alt exemplu de realizare, compusul cu formula (A5) are formula (A5a):



5

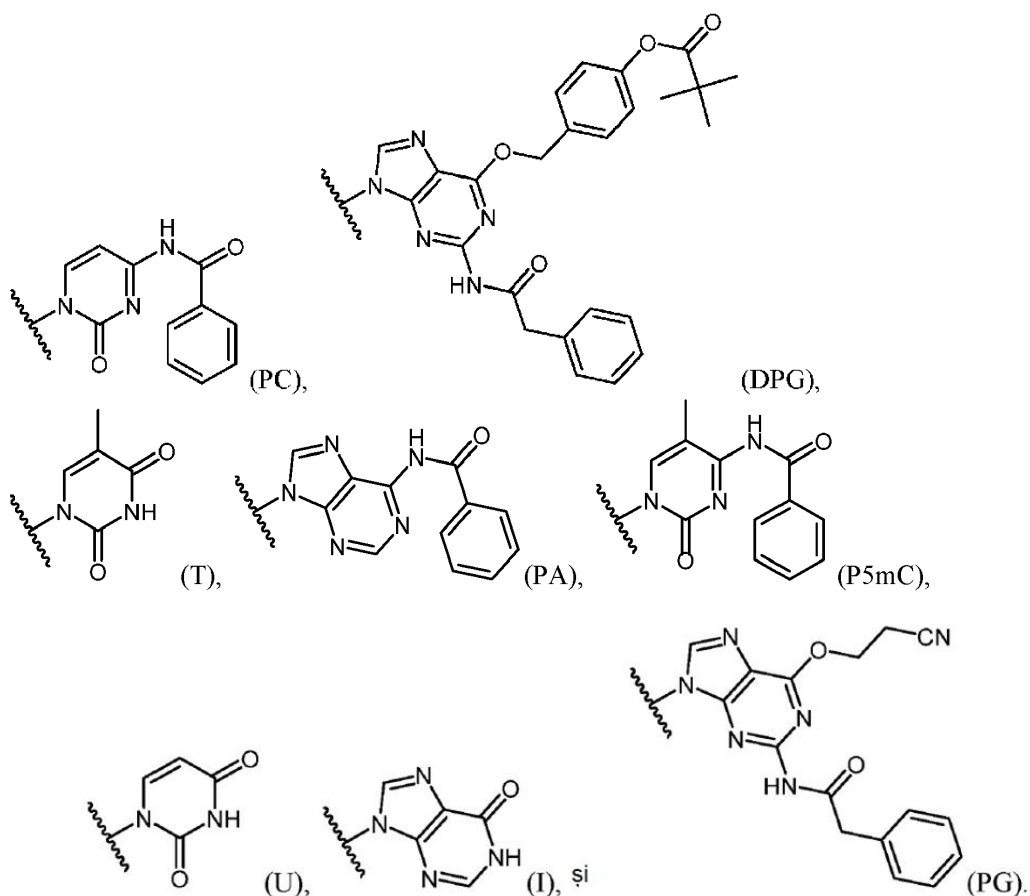
(A5a);

în care:

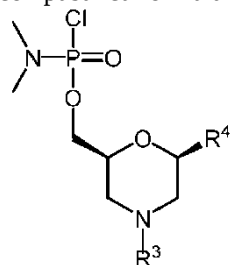
R^1 este un mediu-suport,

R^3 este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil și

R^4 este selectat dintre:



Într-un alt exemplu de realizare, compusul cu formula (A8) are formula (A8a):



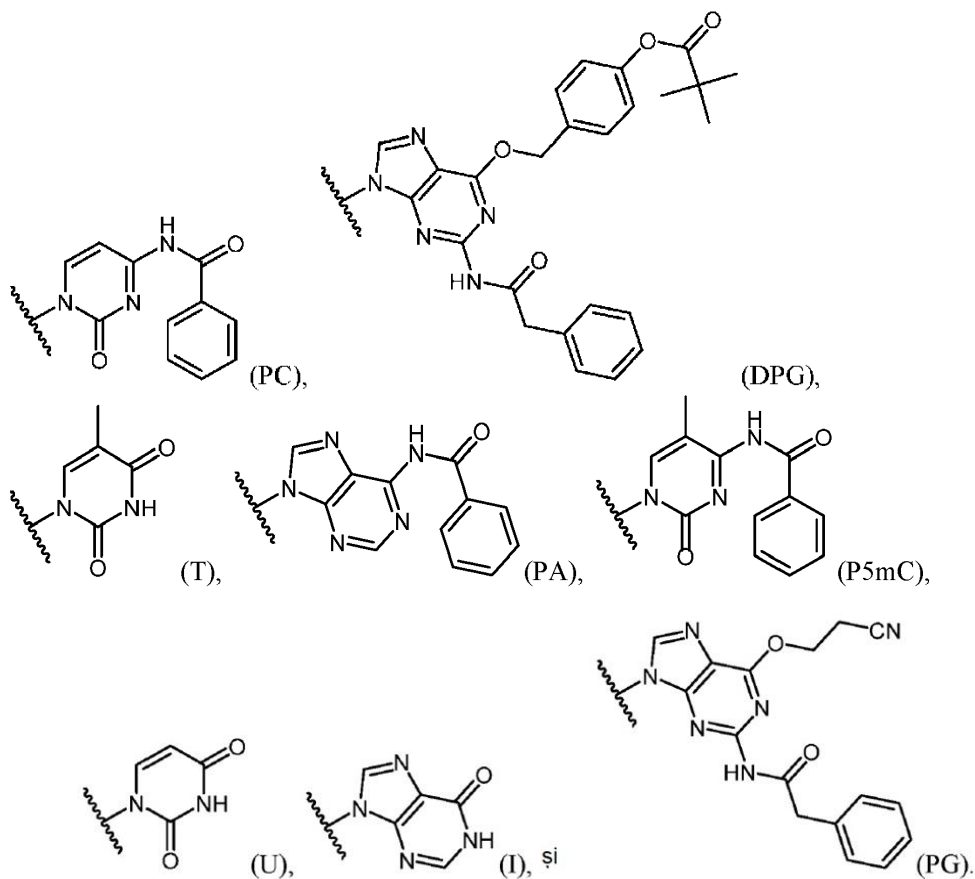
(A8a);

5

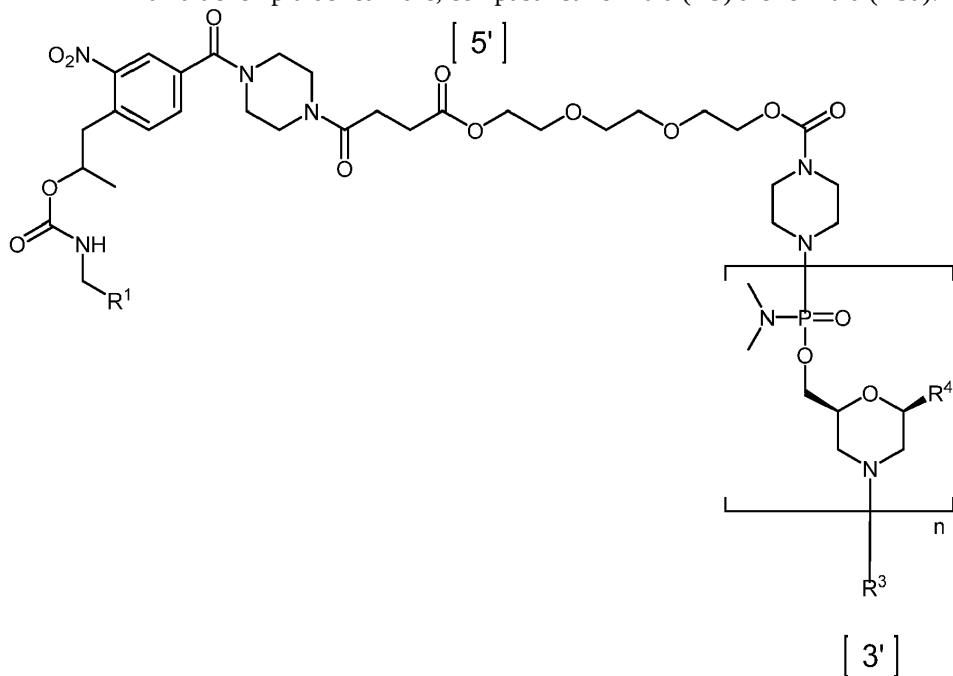
în care:

R^3 este selectat din grupul constând din tritol, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil și

R^4 este selectat, independent la fiecare apariție a compusului cu formula (A8a), din grupul constând din:



Într-un alt exemplu de realizare, compusul cu formula (A9) are formula (A9a):



(A9a);

5

în care:

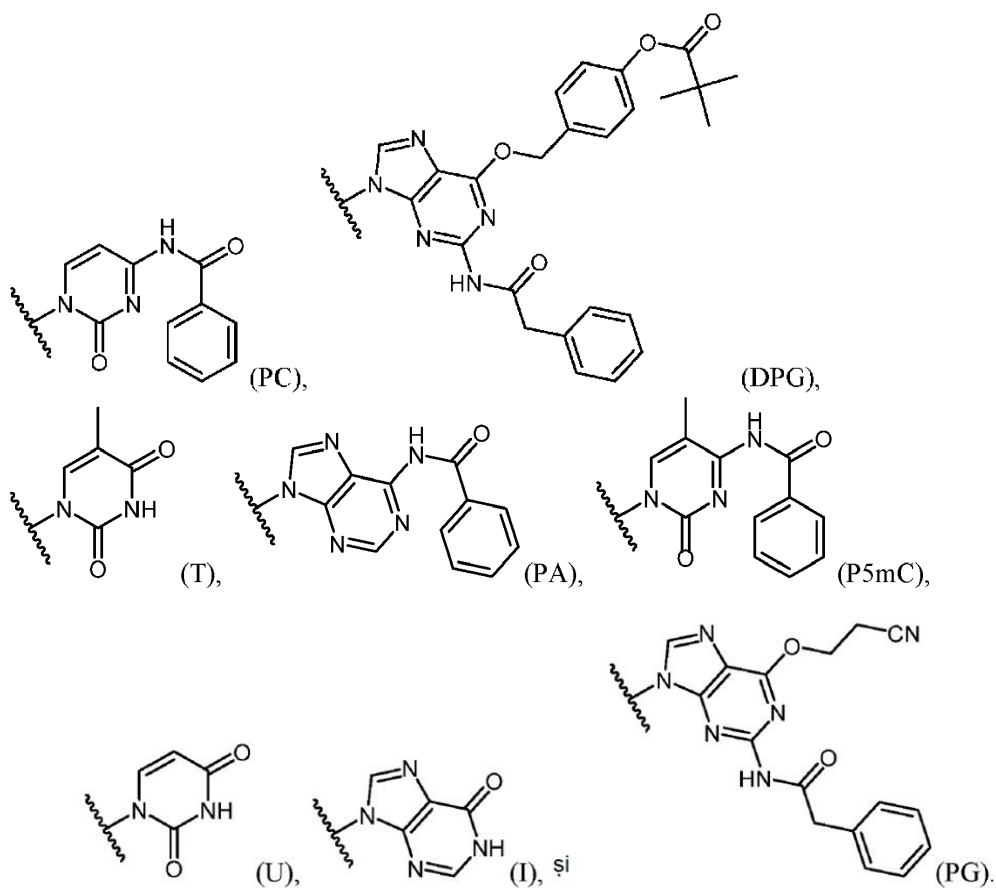
n este un număr întreg de la 10 la 40,

R¹ este un mediu-suport

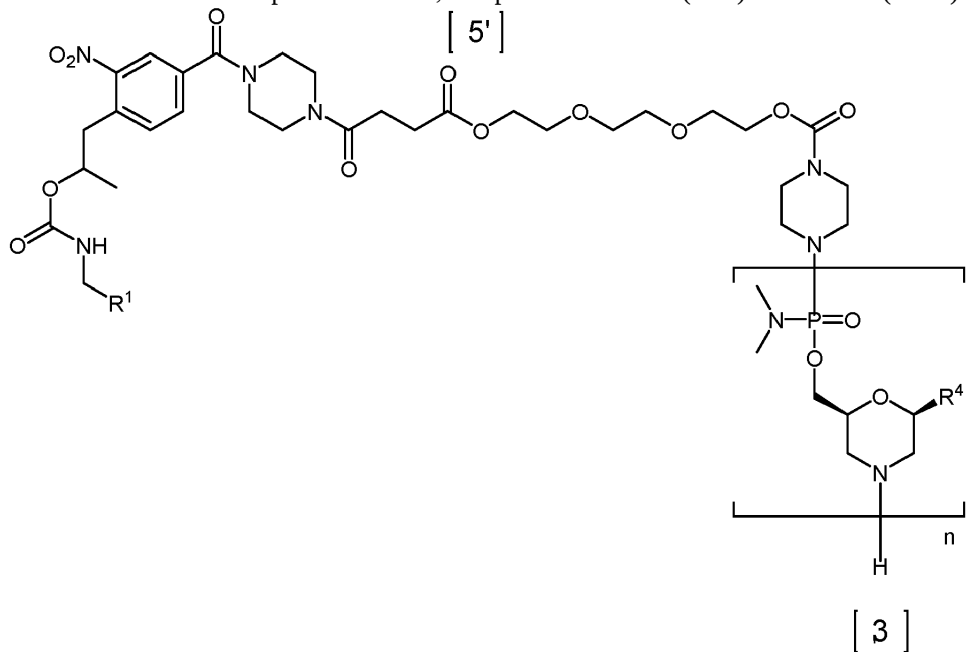
R³ este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil și

10

R⁴ este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:



Într-un alt exemplu de realizare, compusul cu formula (A10) are formula (A10a):



5

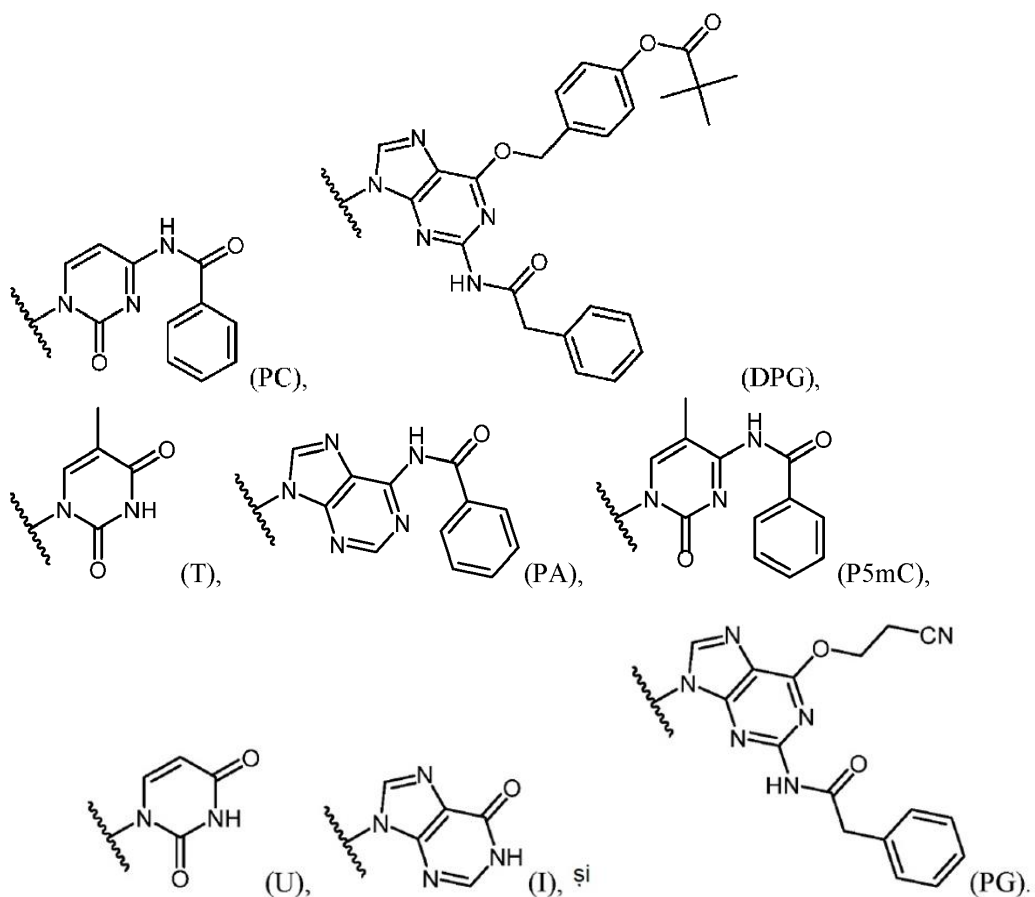
(A10a);

în care:

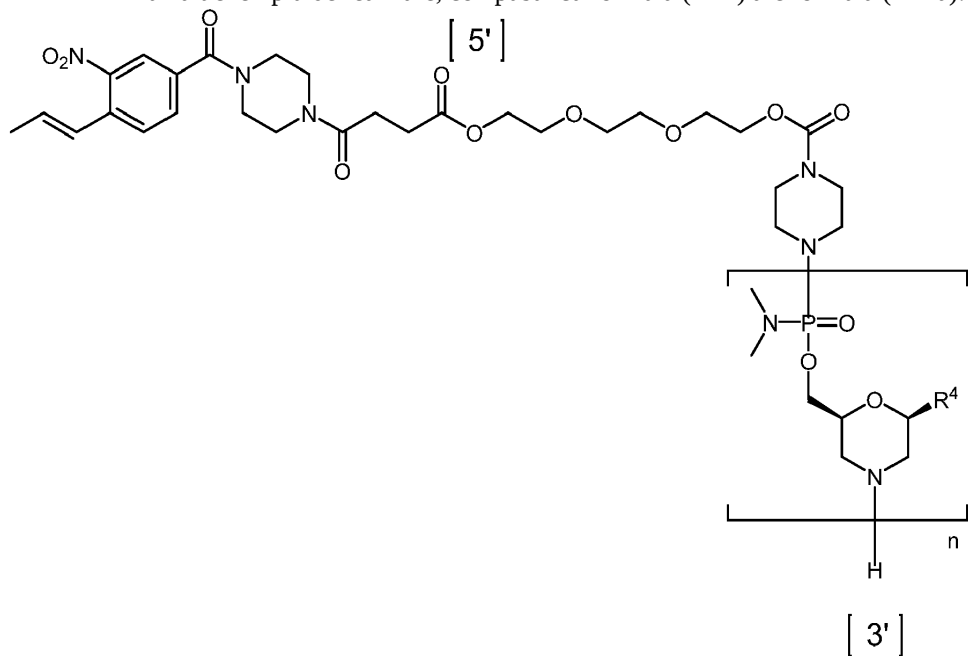
n este un număr întreg de la 10 la 40,

R^1 este un mediu-suport și

R^4 este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:



Într-un alt exemplu de realizare, compusul cu formula (A11) are formula (A11a):



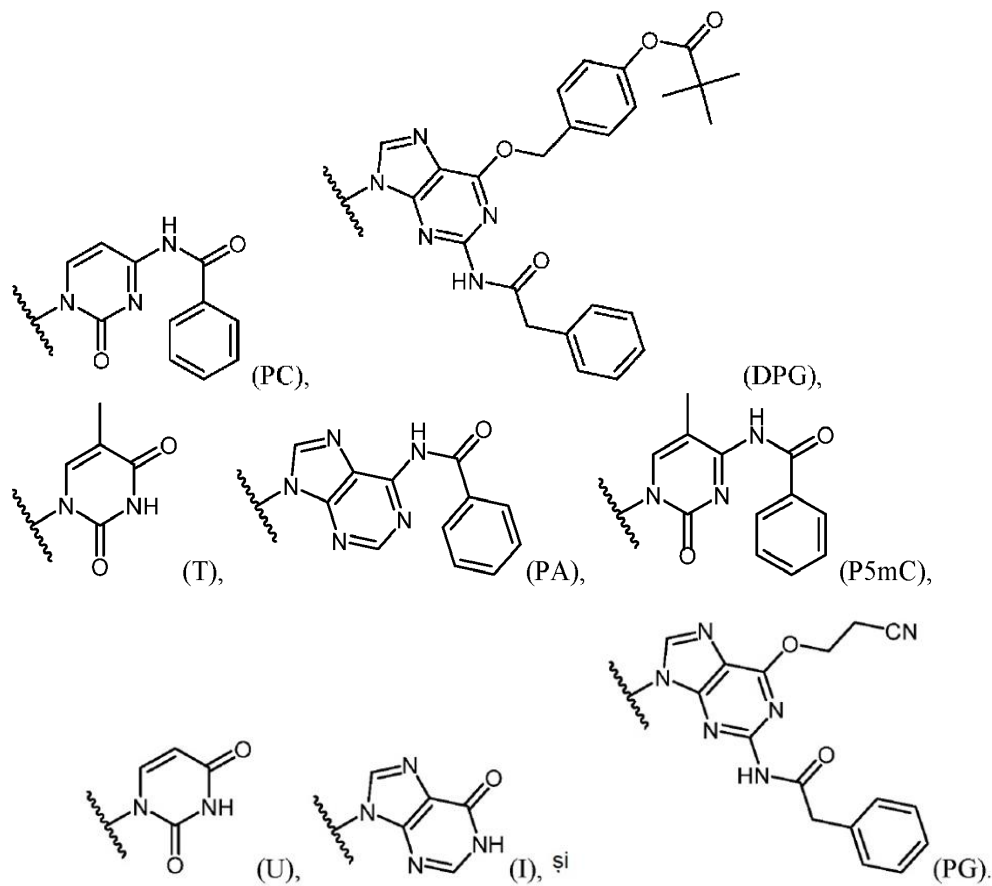
5

(A11a);

în care:

n este un număr întreg de la 10 la 40 și

R^4 este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:



5 În compusul oligomeric cu formula (A), n este 30 și R² este în fiecare poziție de la 1 la 30 și de la 5' la 3':

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
1	C	11	A	21	G
2	T	12	A	22	C
3	C	13	G	23	A
4	C	14	G	24	T
5	A	15	A	25	T
6	A	16	A	26	T
7	C	17	G	27	C
8	A	18	A	28	T
9	T	19	T	29	A
10	C	20	G	30	G

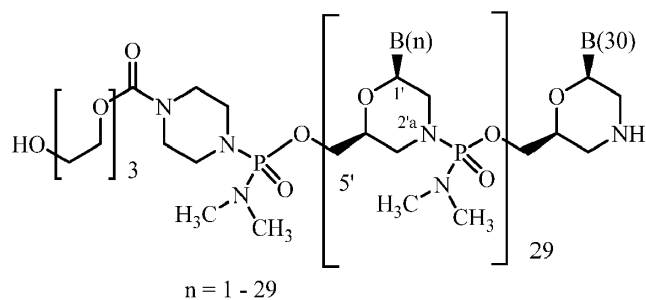
în care compusul oligomeric cu formula (A) este un compus cu formula (E):

The figure displays four chemical structures, labeled A, B, C, and D, representing intramolecularly cross-linked polyphosphazenes. Each structure is a long, repeating chain of phosphazene units, with the 5' and 3' ends indicated. The structures are interconnected by cross-links, forming a network. The cross-links are formed by the reaction of the amino groups (NH₂) on the side chains of the phosphazene units with the carbonyl groups (C=O) of the side chains of other phosphazene units, resulting in the formation of a cyclic structure. The structures are labeled A, B, C, and D, corresponding to the four different cross-linking patterns shown. The 5' end is marked with a vertical line and the number 5, and the 3' end is marked with a vertical line and the number 3.

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Eteplirsen (a se vedea, de exemplu, publ. cererii internaționale de brevet nr. WO 2006/000057) a făcut obiectul unor studii clinice pentru a-i testa siguranța și eficacitatea, iar dezvoltarea clinică este în curs de desfășurare. Eteplirsenul este un oligomer morfolino fosforodiamidat (PMO). Medicamentul pentru distrofină "Eteplirsen", cunoscut și ca "AVI-4658" este un PMO având secvența de bază 5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (SECV ID NR:1). Eteplirsen este înregistrat sub numărul de registru CAS 1173755-55-9. Denumirile chimice includ: ARN, [P-deoxi-P-(dimetilamino)](2',3'-dideoxi-2',3'-imino-2',3'-seco)(2'→5')(C-m5U-C-C-A-A-C-A-m5U-C-A-A-G-G-A-A-G-A-m5U-G-G-C-A-m5U-m5U-m5U-C-m5U-A-G) (SECV ID NR:1), 5'-[P-[4-[[2-(2-hidroxi-etoxi)etoxi]etoxi]carbonil]-1-piperazinil]-N,N-dimetilfosfonamidat] și P,2',3'-trideoxi-P-(dimetilamino)-5'-O-{P-[4-(10-hidroxi-2,5,8-trioxadecanoil)piperazin-1-il]-N,N-dimetilfosfonamidoil}-2',3'-imino-2',3'-secocitidilil-(2'a→5')-P,3'-dideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secotimidilil-(2'a→5')-P,2',3'-trideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secocitidilil-(2'a→5')-P,2',3'-trideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secocitidilil-(2'a→5')-P,2',3'-trideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secoadenilil-(2'a→5')-P,2',3'-trideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secoadenilil-(2'a→5')-P,2',3'-trideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secocitidilil-(2'a→5')-P,2',3'-trideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secotimidilil-(2'a→5')-P,2',3'-trideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secocitidilil-(2'a→5')-P,2',3'-trideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secoadenilil-(2'a→5')-P,2',3'-trideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secoadenilil-(2'a→5')-P,2',3'-trideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secoguanilil-(2'a→5')-P,2',3'-trideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secoadenilil-(2'a→5')-P,2',3'-trideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secoadenilil-(2'a→5')-P,2',3'-trideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secoguanilil-(2'a→5')-P,2',3'-trideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secoadenilil-(2'a→5')-P,3'-dideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secotimidilil-(2'a→5')-P,3'-dideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secotimidilil-(2'a→5')-P,2',3'-trideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secocitidilil-(2'a→5')-P,3'-dideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secotimidilil-(2'a→5')-P,2',3'-trideoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-secoadenilil-(2'a→5')-2',3'-dideoxi-2',3'-imino-2',3'-secoguanozină.

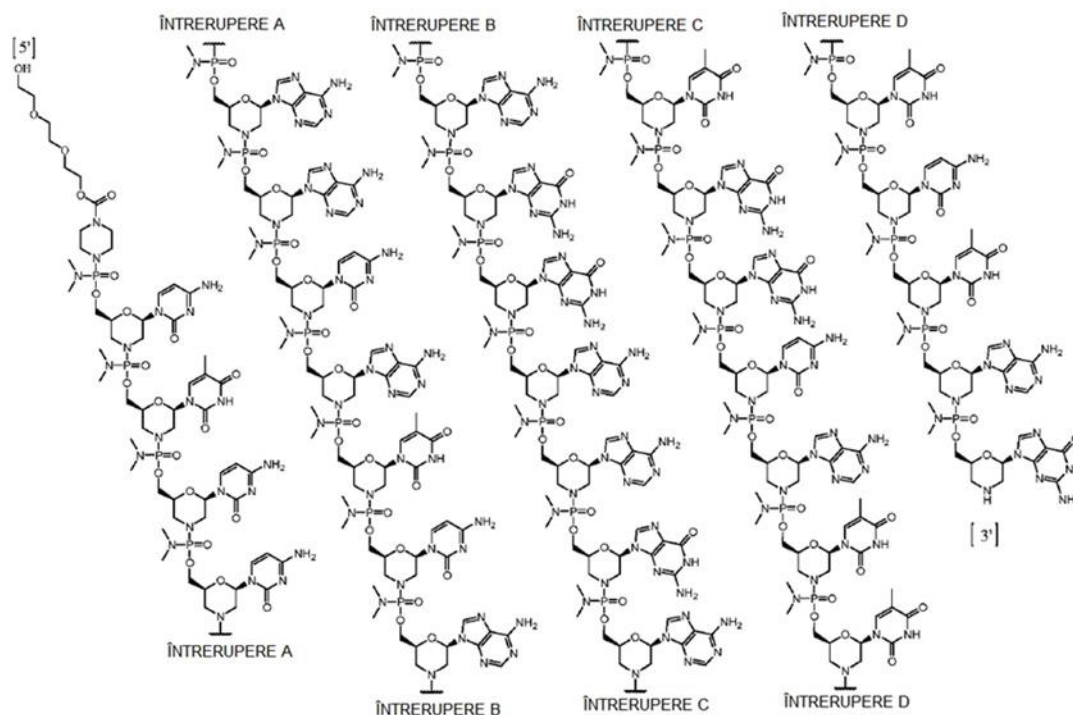
Eteplirsen are următoarea structură:



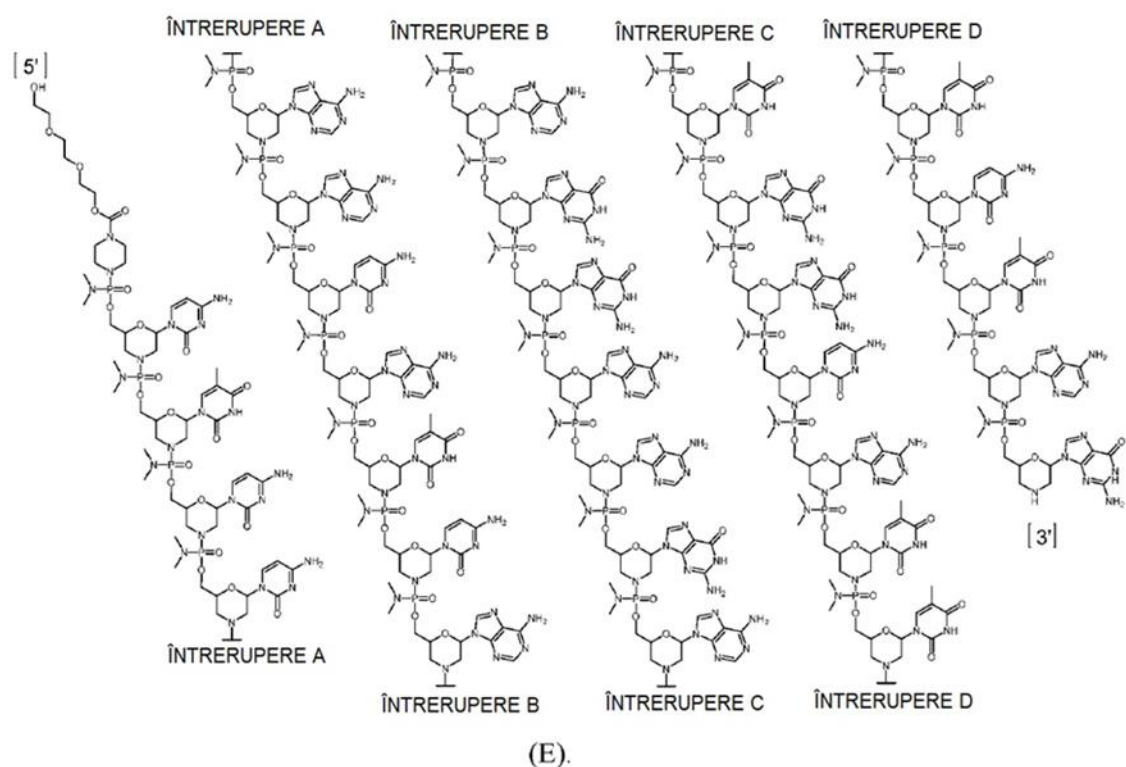
B(1-30):

C-T-C-C-A-A-C-A-T-C-A-A-G-G-A-A-G-A-T-G-G-C-A-T-T-T-C-T-A-G (SECV ID NR:1)

Eteplirsen poate fi, de asemenea, reprezentat de structura cu formula (XII):

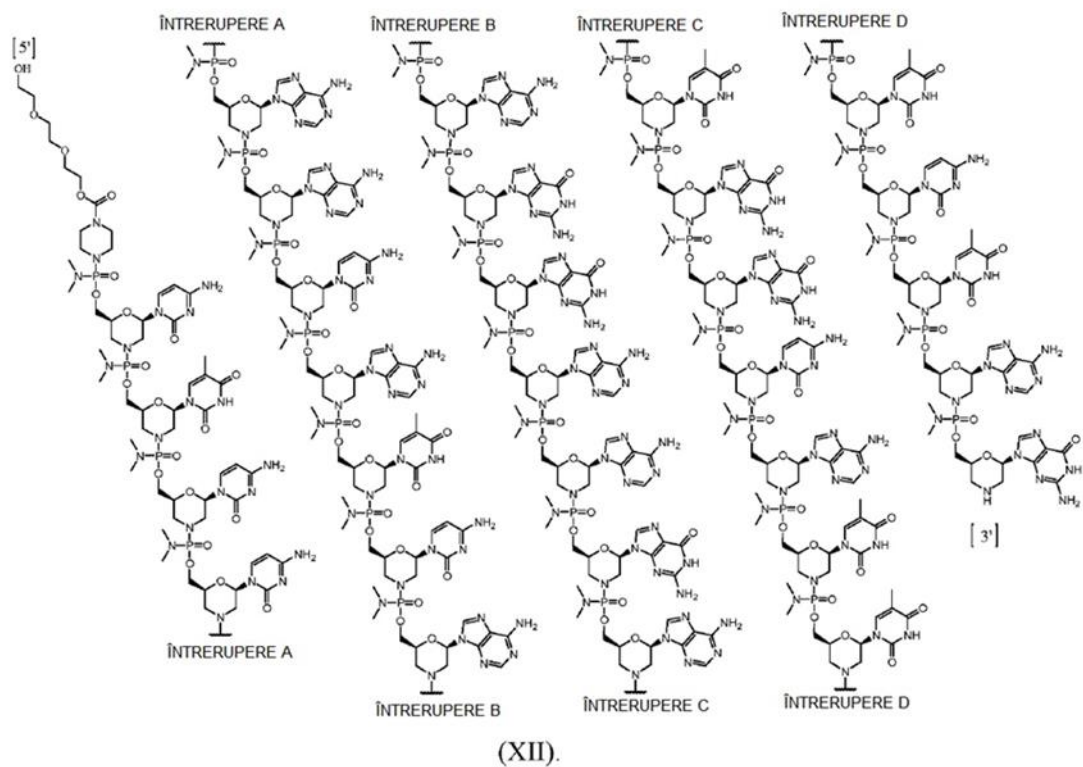


Prezenta invenție se referă la un procedeu de preparare a unui compus cu formula (E):



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Într-un alt exemplu de realizare, compusul oligomeric cu formula (E) este un compus oligomeric cu formula (XII):



5

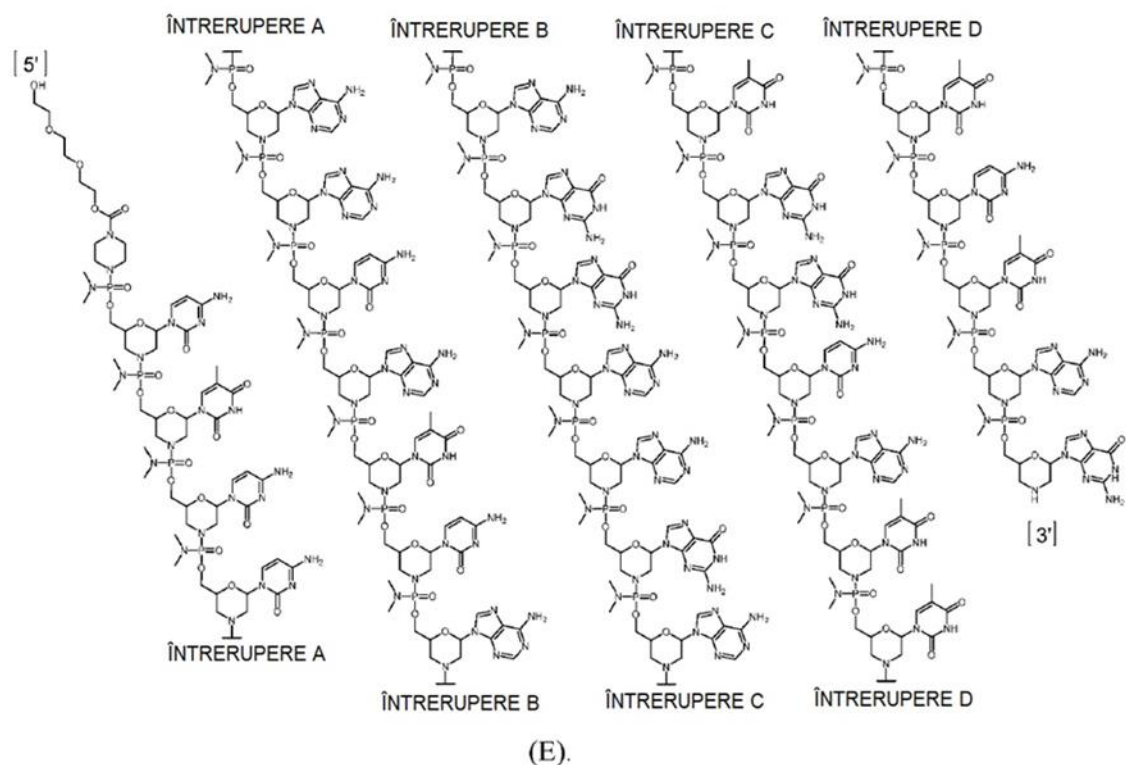
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Într-un alt exemplu de realizare, R^3 este, la fiecare apariție, tritol.

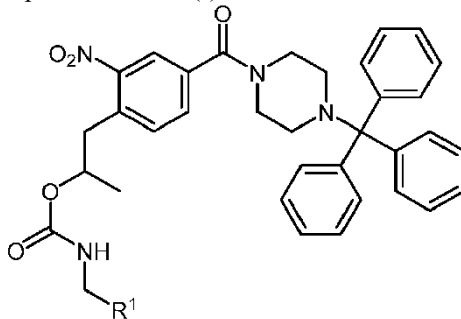
Procedee pentru prepararea Eteplirsenului

Aici sunt furnizate procedee pentru prepararea Eteplirsenului.

Într-un aspect, aici este prezentat un procedeu pentru prepararea unui compus oligomeric cu formula (E):

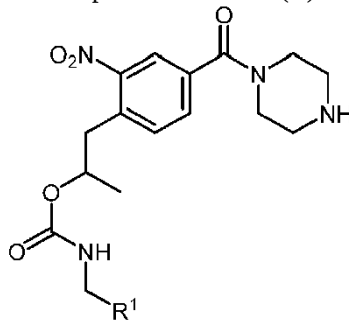


- 5 în care procedeul cuprinde etapele secvențiale de:
(a) punerea în contact a unui compus cu formula (I):



(I);

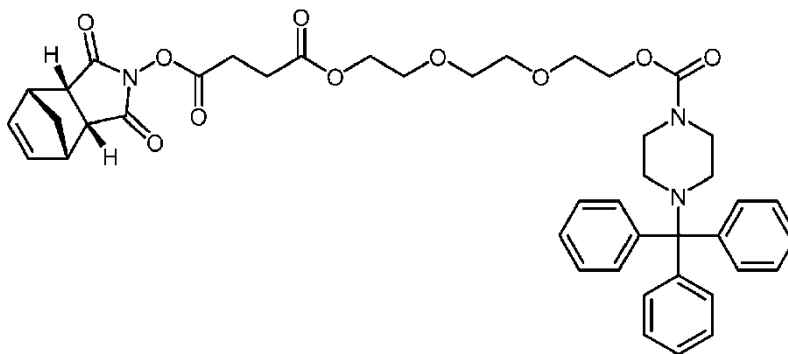
în care R^1 este un mediu-suport,
cu un agent de deblocare pentru a forma compusul cu formula (II):



(II);

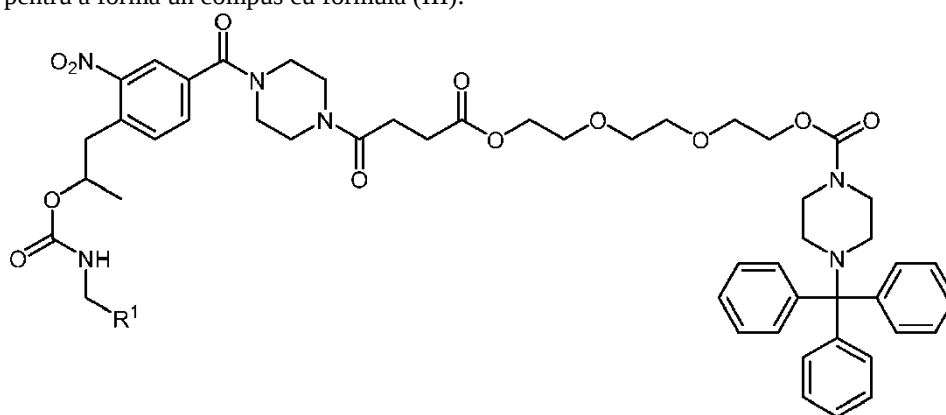
10

în care R^1 este un mediu-suport;
(b) punerea în contact a compusului cu formula (II) cu compusul (B):



(B);

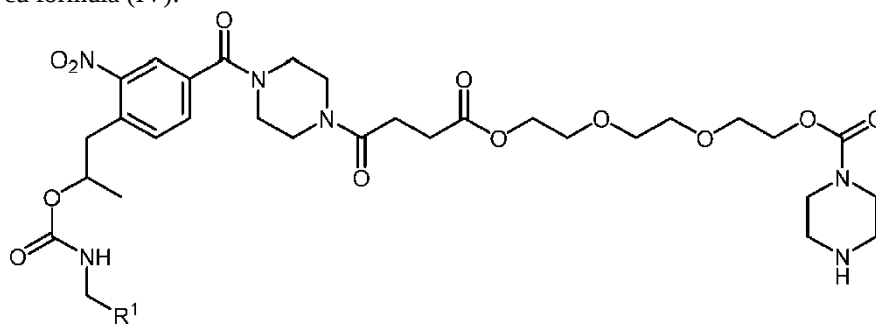
pentru a forma un compus cu formula (III):



(III);

în care R¹ este un mediu-suport;

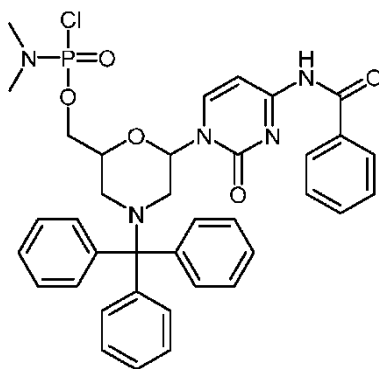
- 5 (c) punerea în contact a compusului cu formula (III) cu un agent de deblocare pentru a forma un compus cu formula (IV):



(IV);

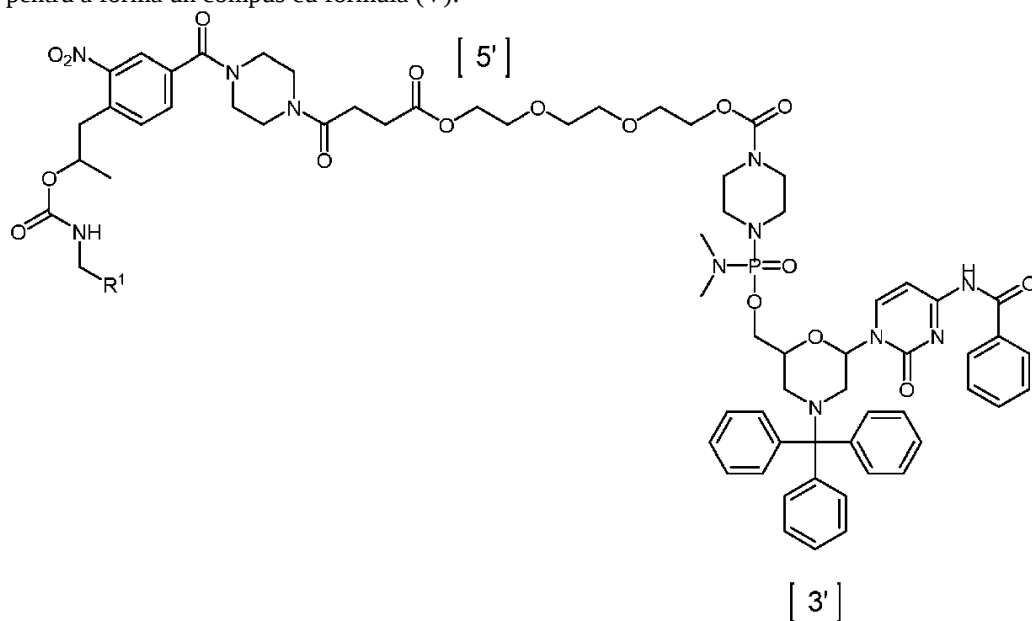
în care R¹ este un mediu-suport;

- (d) punerea în contact a compusului cu formula (IV) cu un compus cu formula (C):



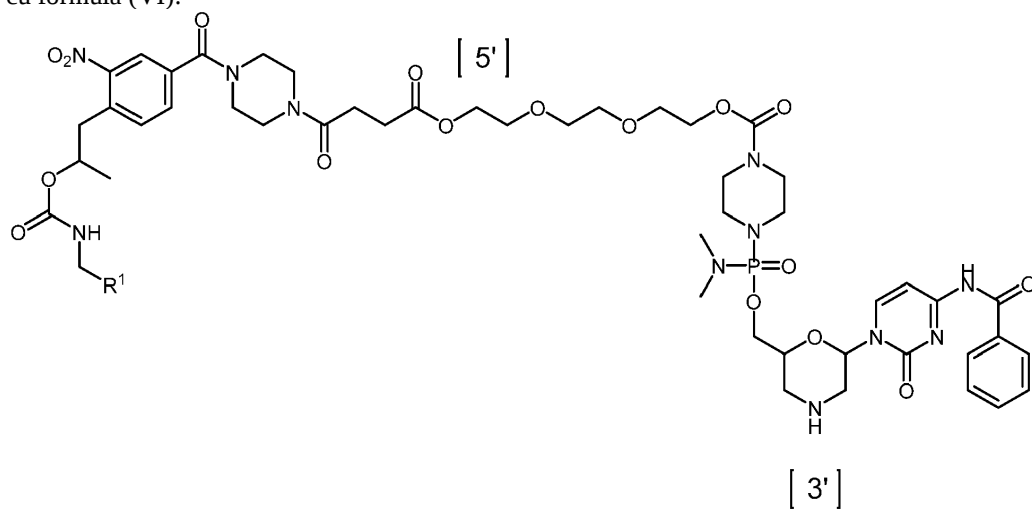
(C);

pentru a forma un compus cu formula (V):



(V);

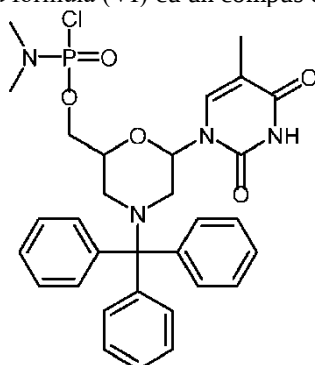
- 5 în care R^1 este un mediu-suport;
 (e) punerea în contact a compusului cu formula (V) cu un agent de deblocare pentru a forma un compus cu formula (VI):



(VI);

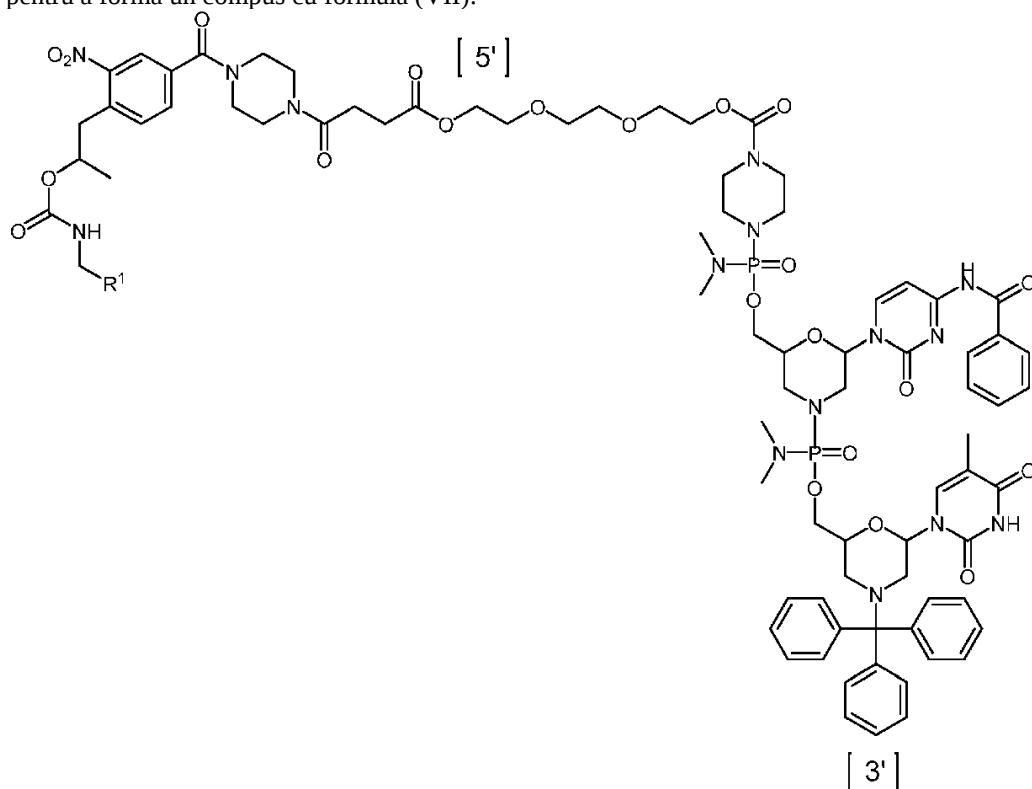
în care R^1 este un mediu-suport;

(f) punerea în contact a compusului cu formula (VI) cu un compus cu formula (F):



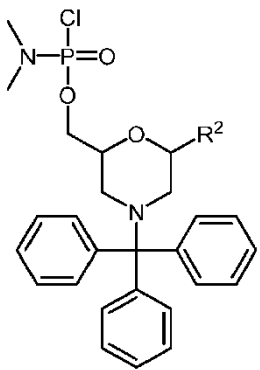
(F);

pentru a forma un compus cu formula (VII):



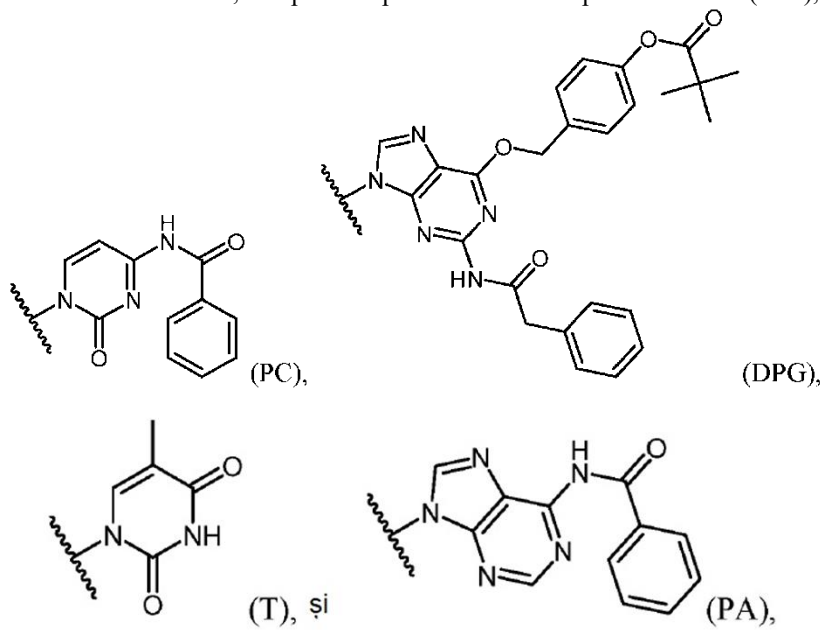
(VII);

- 5 în care R¹ este un mediu-suport;
- (g) efectuarea a 28 de iterații ale etapelor secvențiale de:
 - (g1) punerea în contact a produsului format prin etapa imediat anterioară cu un agent de deblocare; și
 - (g2) punerea în contact a compusului format prin etapa imediat anterioară cu un compus cu formula (VIII):



(VIII);

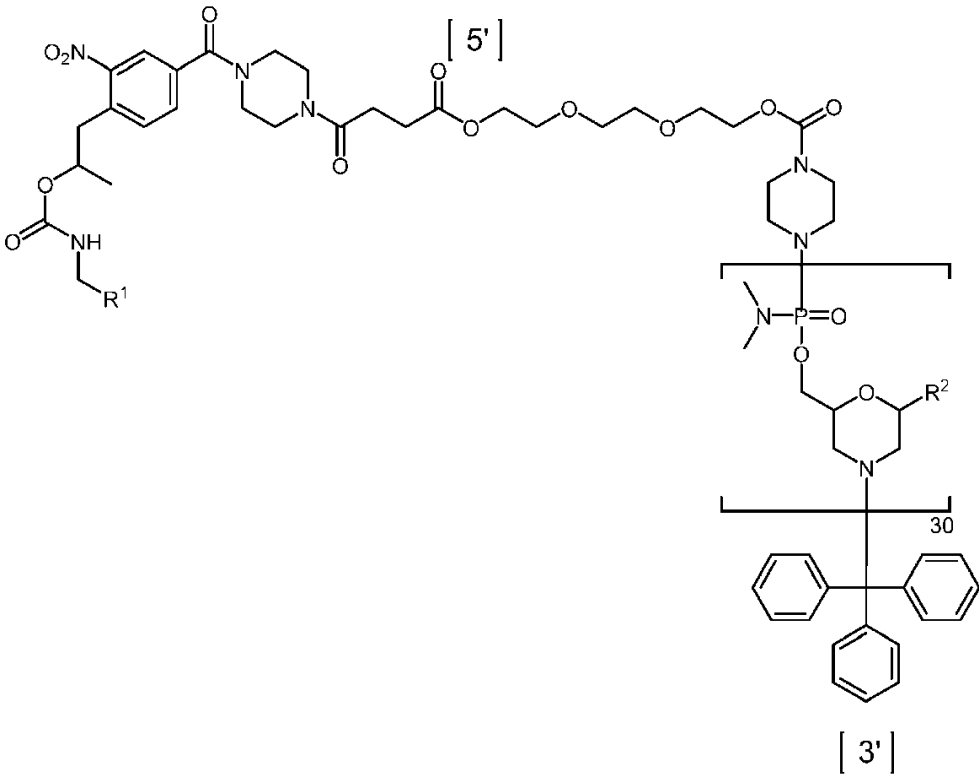
în care R² este selectat, independent pentru fiecare compus cu formula (VIII), din grupul constând din:



5 în care, pentru fiecare iterație de la 1 la 28, R² este:

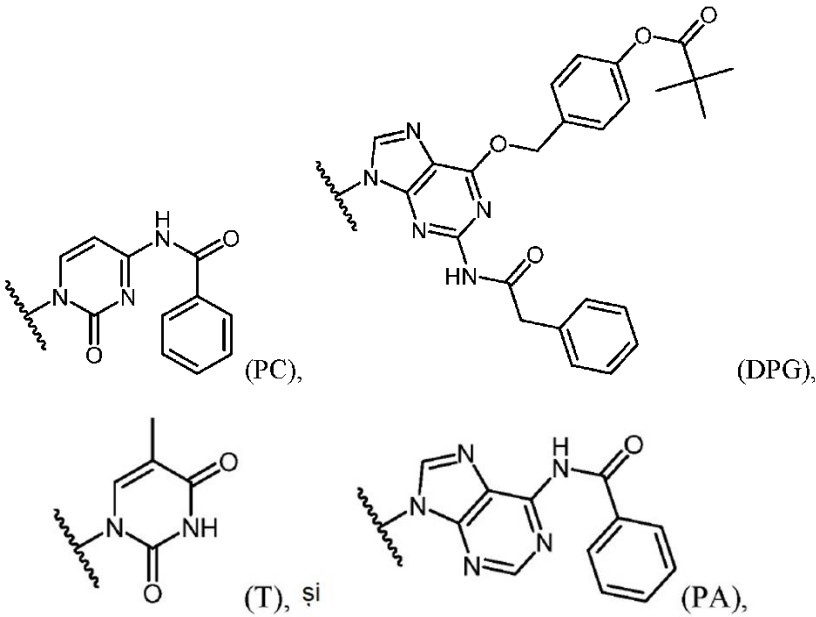
Iterație nr.	R ²	Iterație nr.	R ²	Iterație nr.	R ²
1	PC	11	DPG	21	PA
2	PC	12	DPG	22	T
3	PA	13	PA	23	T
4	PA	14	PA	24	T
5	PC	15	DPG	25	PC
6	PA	16	PA	26	T
7	T	17	T	27	PA
8	PC	18	DPG	28	DPG
9	PA	19	DPG		
10	PA	20	PC		

pentru a forma un compus cu formula (IX):



(IX);

în care R¹ este un mediu-suport, în care R² este selectat, independent pentru fiecare apariție, din grupul constând din:



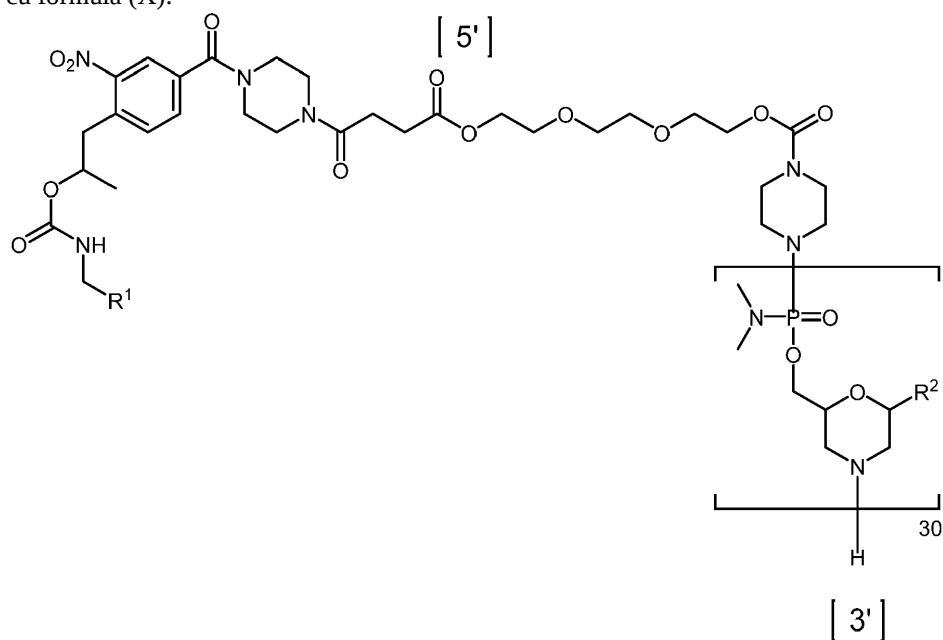
5

și în care R² este la fiecare poziție de la 1 la 30 și de la 5' la 3':

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
1	PC	11	PA	21	DPG
2	T	12	PA	22	PC
3	PC	13	DPG	23	PA

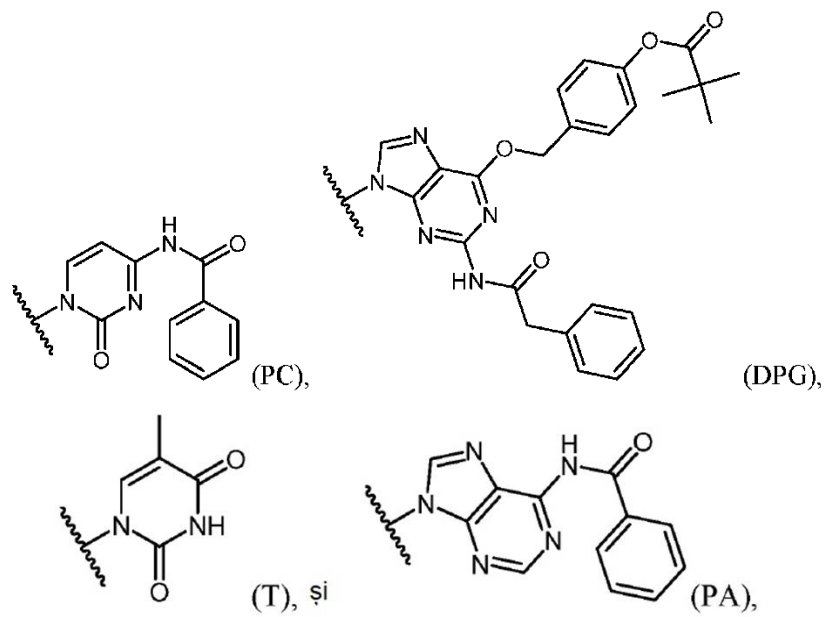
Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
4	PC	14	DPG	24	T
5	PA	15	PA	25	T
6	PA	16	PA	26	T
7	PC	17	DPG	27	PC
8	PA	18	PA	28	T
9	T	19	T	29	PA
10	PC	20	DPG	30	DPG

(h) punerea în contact a compusului cu formula (IX) cu un agent de deblocare pentru a forma un compus cu formula (X):



(X);

- 5 în care R¹ este un mediu-suport,
 în care R² este selectat, independent pentru fiecare apariție, din grupul constând din:

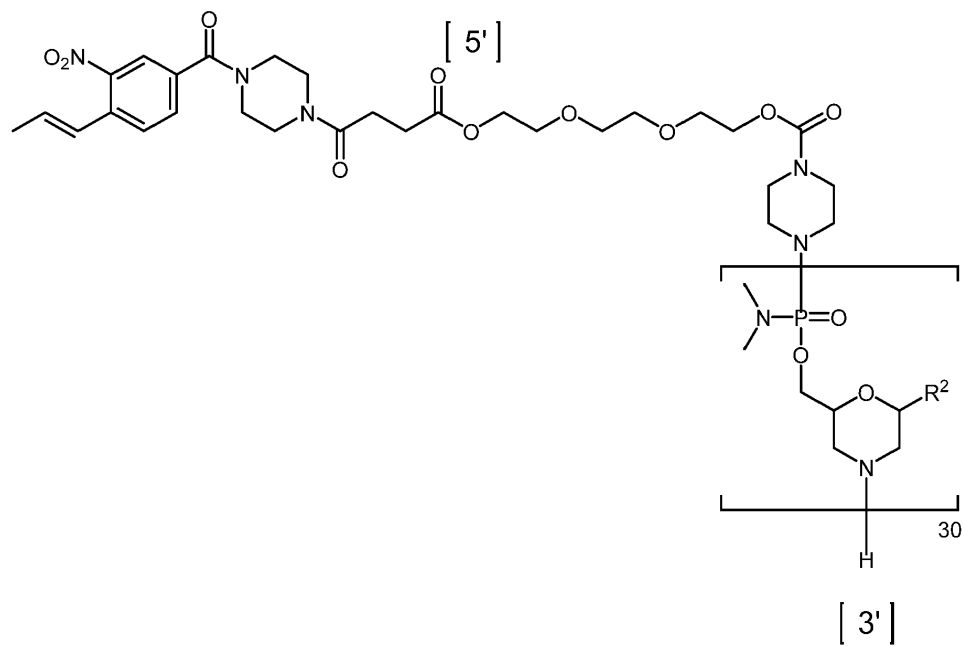


, și
în care R² este la fiecare poziție de la 1 la 30 și de la 5' la 3':

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
1	PC	11	PA	21	DPG
2	T	12	PA	22	PC
3	PC	13	DPG	23	PA
4	PC	14	DPG	24	T
5	PA	15	PA	25	T
6	PA	16	PA	26	T
7	PC	17	DPG	27	PC
8	PA	18	PA	28	T
9	T	19	T	29	PA
10	PC	20	DPG	30	DPG

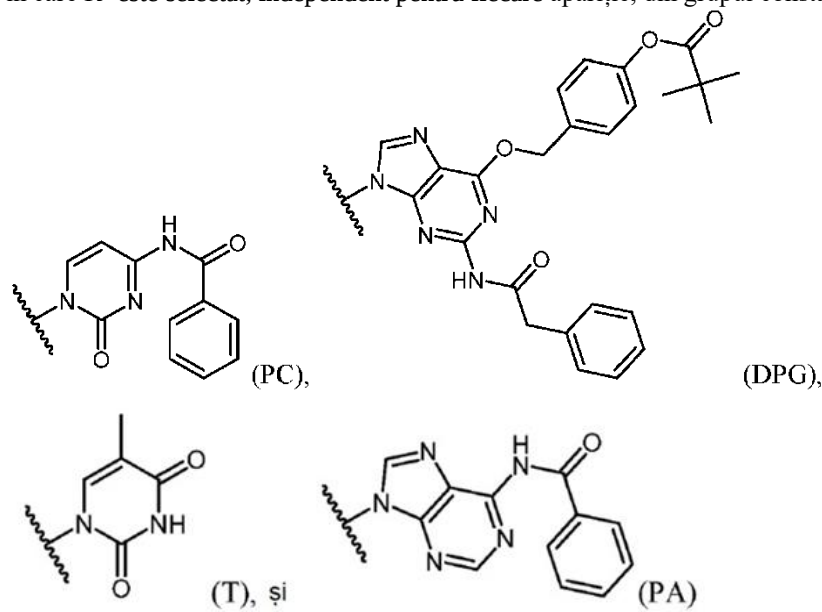
5

(i) punerea în contact a compusului cu formula (X) cu un agent de clivare pentru a forma un compus cu formula (XI):



(XI),

în care R² este selectat, independent pentru fiecare apariție, din grupul constând din:



5

, și

în care R² este la fiecare poziție de la 1 la 30 și de la 5' la 3':

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
1	PC	11	PA	21	DPG
2	T	12	PA	22	PC
3	PC	13	DPG	23	PA
4	PC	14	DPG	24	T
5	PA	15	PA	25	T
6	PA	16	PA	26	T
7	PC	17	DPG	27	PC
8	PA	18	PA	28	T

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
9	T	19	T	29	PA
10	PC	20	DPG	30	DPG

și

(j) punerea în contact a compusului cu formula (XI) cu un agent de deprotejare pentru a forma compusul oligomeric cu formula (E).

5 Într-un exemplu de realizare, etapa (d), etapa (f), etapa g(2) sau combinații ale acestora mai cuprinde punerea în contact a compusului cu formula (IV), formula (VI) sau, respectiv, a compusului format prin etapa imediat anterioară, cu un agent de capsulare.

În anumite exemple de realizare, fiecare dintre etapa (d), etapa (f) și etapa g(2) mai cuprinde punerea în contact a compusului cu formula (IV), formula (VI) sau, respectiv, a compusului format prin

10 etapa imediat anterioară, cu un agent de capsulare.

Într-un alt exemplu de realizare, fiecare etapă este realizată în prezența cel puțin unui solvent.

Într-un alt exemplu de realizare, agentul de deblocare utilizat în fiecare etapă este o soluție care cuprinde un acid halogenat.

15 Într-un alt exemplu de realizare, agentul de deblocare utilizat în fiecare etapă este acidul cianoacetic.

Într-un alt exemplu de realizare, acidul halogenat este selectat din grupul constând din acid cloroacetic, acid dicloroacetic, acid trichloroacetic, acid fluoroacetic, acid difluoroacetic și acid trifluoroacetic.

Într-un alt exemplu de realizare, acidul halogenat este acidul trifluoroacetic.

20 Într-un alt exemplu de realizare, cel puțin una dintre etapele (c), (e1) și (f) mai cuprinde etapa de punere în contact a compusului deblocat din fiecare etapă cu un agent de neutralizare.

Într-un alt exemplu de realizare, fiecare dintre etapele (c), (e1) și (f) mai cuprinde etapa de punere în contact a compusului deblocat din fiecare etapă cu un agent de neutralizare.

25 Într-un alt exemplu de realizare, agentul de neutralizare este într-o soluție care cuprinde diclormetan și alcool izopropilic.

Într-un alt exemplu de realizare, agentul de neutralizare este o monoalchil-, dialchil- sau trialchilamină.

Într-un alt exemplu de realizare, agentul de neutralizare este N,N-diizopropiletilamină.

30 Într-un alt exemplu de realizare, agentul de deblocare utilizat în fiecare etapă este o soluție care cuprinde 4-cianopiridină, diclormetan, acid trifluoroacetic, trifluoroetanol și apă.

Într-un alt exemplu de realizare, agentul de capsulare este într-o soluție care cuprinde etilmorfolină și metilpirolidinonă.

Într-un alt exemplu de realizare, agentul de capsulare este o anhidridă acidă.

Într-un alt exemplu de realizare, anhidrida acidă este anhidridă benzoică.

35 Într-un alt exemplu de realizare, compusul cu formula (VIII), compusul (C) și compusul (F) sunt fiecare, independent, într-o soluție care cuprinde etilmorfolină și dimetilimidazolidinonă.

Într-un alt exemplu de realizare, agentul de clivare cuprinde ditiotretol și 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enă.

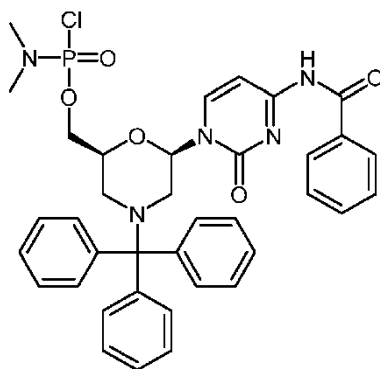
40 Într-un alt exemplu de realizare, agentul de clivare este într-o soluție care cuprinde N-metil-2-pirolidonă.

Într-un alt exemplu de realizare, agentul de deprotejare cuprinde NH₃.

Într-un alt exemplu de realizare, agentul de deprotejare este într-o soluție apoasă.

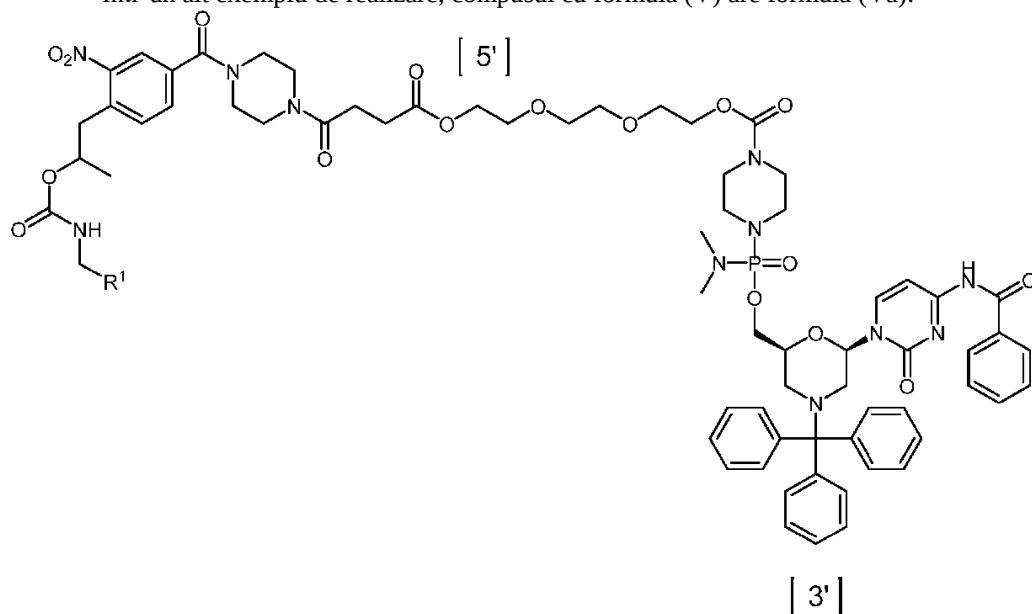
Într-un alt exemplu de realizare, mediul-suport cuprinde polistiren cu 1% divinilbenzen reticulat.

Într-un alt exemplu de realizare, compusul cu formula (C) are formula (C1):



(C1).

Într-un alt exemplu de realizare, compusul cu formula (V) are formula (Va):

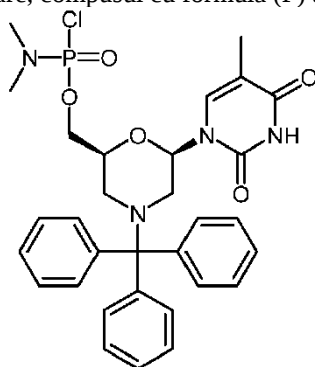


(Va),

în care R¹ este un mediu-suport.

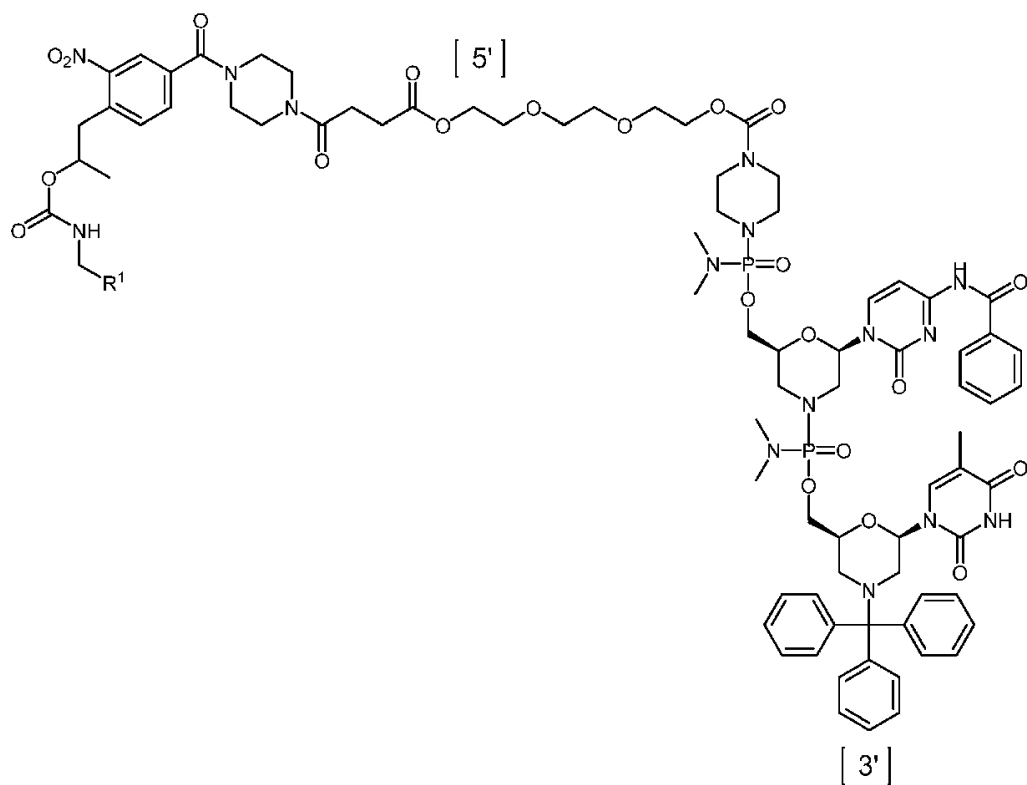
5

Într-un alt exemplu de realizare, compusul cu formula (F) are formula (F1):



(F1).

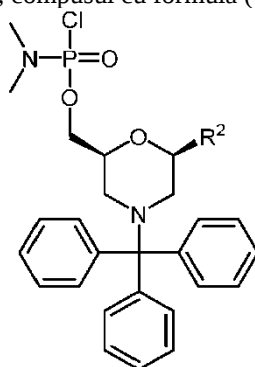
Într-un alt exemplu de realizare, compusul cu formula (VII) are formula (VIIa):



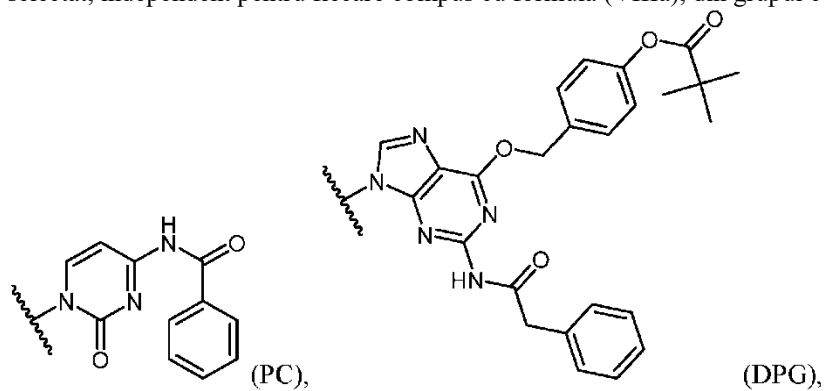
(VIIa),

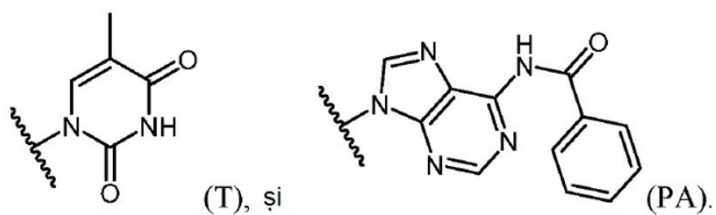
în care R^1 este un mediu-suport.

Într-un alt exemplu de realizare, compusul cu formula (VIII) are formula (VIIIa):

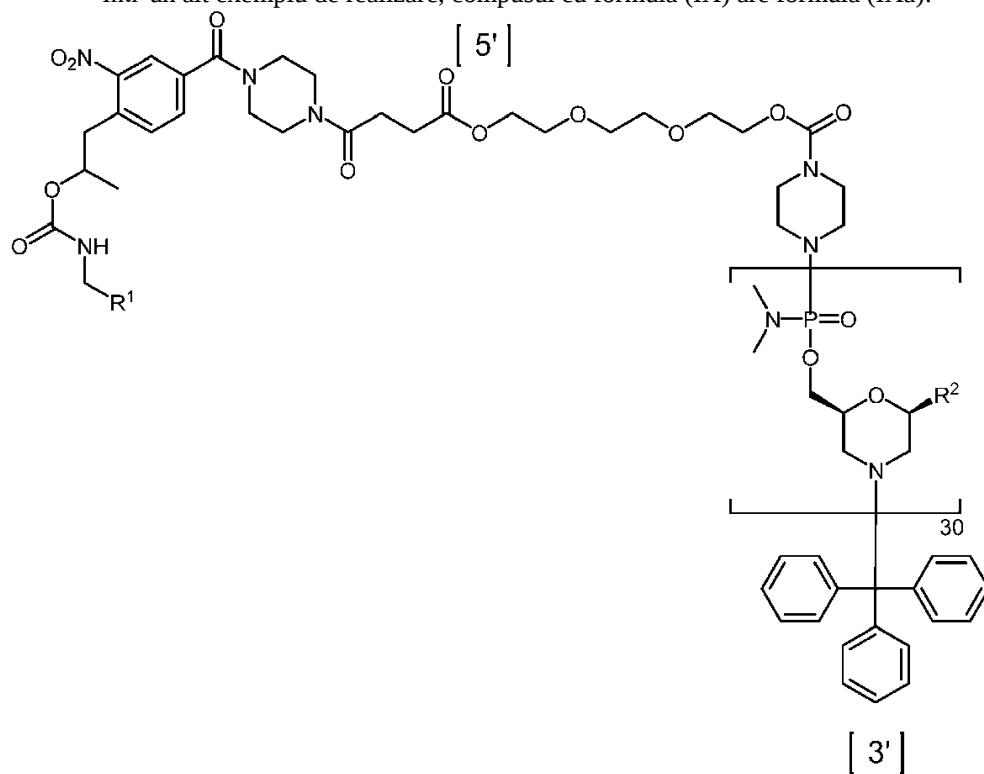


(VIIIa);

5 în care R^2 este selectat, independent pentru fiecare compus cu formula (VIIIa), din grupul constând din:



Într-un alt exemplu de realizare, compusul cu formula (IX) are formula (IXa):



(IXa),

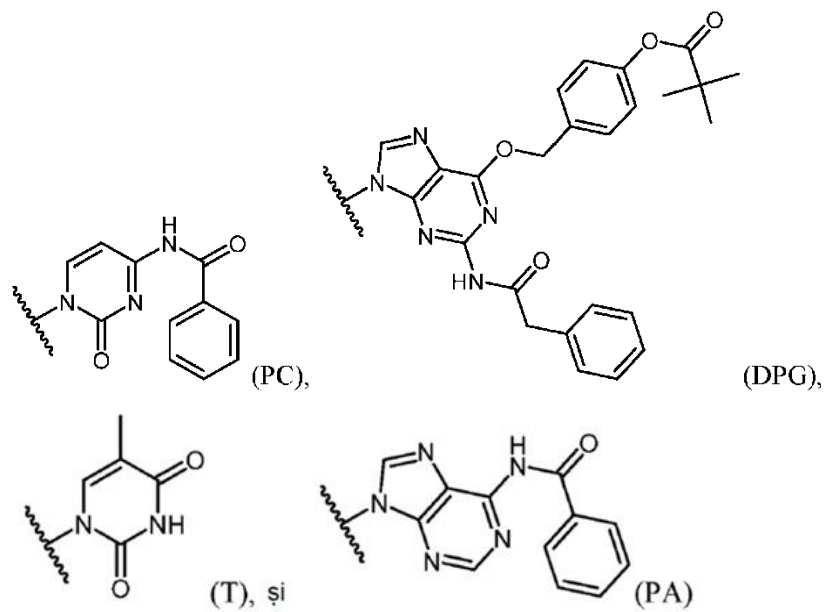
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia,

5

în care

R¹ este un mediu-suport și

R² este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:



, și
în care R² este la fiecare poziție de la 1 la 30 și de la 5' la 3':

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
1	PC	11	PA	21	DPG
2	T	12	PA	22	PC
3	PC	13	DPG	23	PA
4	PC	14	DPG	24	T
5	PA	15	PA	25	T
6	PA	16	PA	26	T
7	PC	17	DPG	27	PC
8	PA	18	PA	28	T
9	T	19	T	29	PA
10	PC	20	DPG	30	DPG

5

Într-un alt exemplu de realizare, compusul cu formula (X) are formula (Xa):



R^1 este un mediu-suport și

R^2 este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:



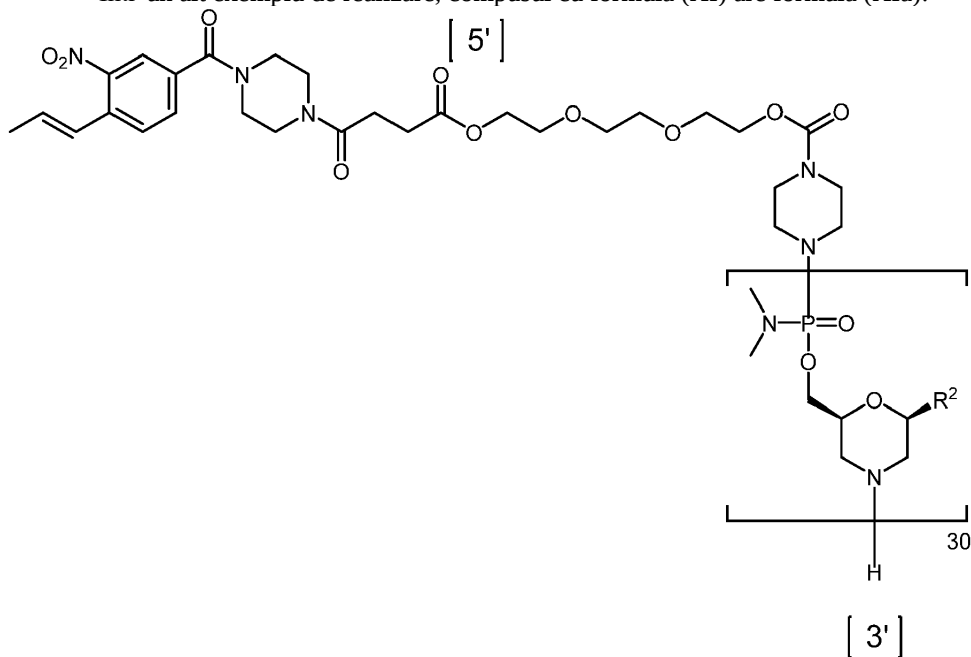
, Şi

în care R^2 este la fiecare poziție de la 1 la 30 și de la 5' la 3':

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
1	PC	11	PA	21	DPG
2	T	12	PA	22	PC
3	PC	13	DPG	23	PA
4	PC	14	DPG	24	T
5	PA	15	PA	25	T
6	PA	16	PA	26	T

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
7	PC	17	DPG	27	PC
8	PA	18	PA	28	T
9	T	19	T	29	PA
10	PC	20	DPG	30	DPG

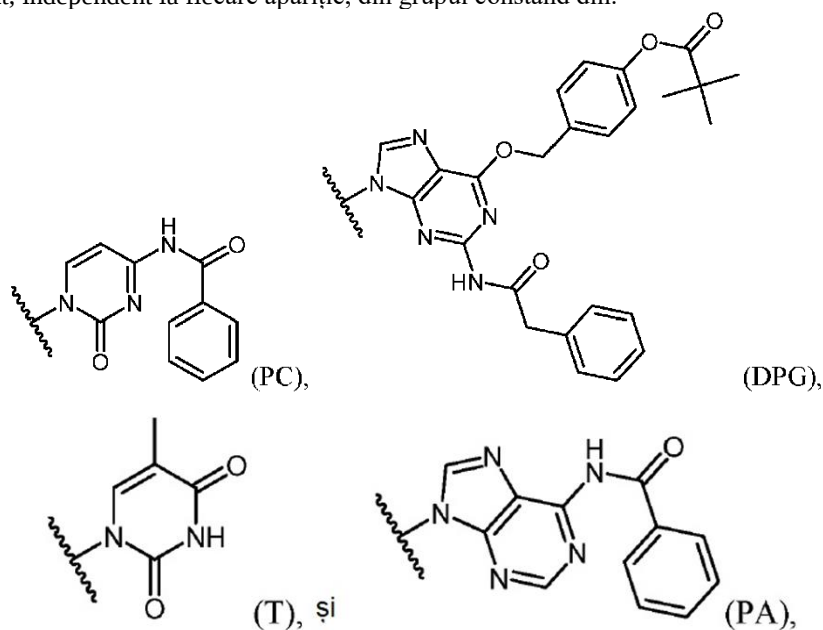
Într-un alt exemplu de realizare, compusul cu formula (XI) are formula (XIa):



(XIa),

sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, în care:

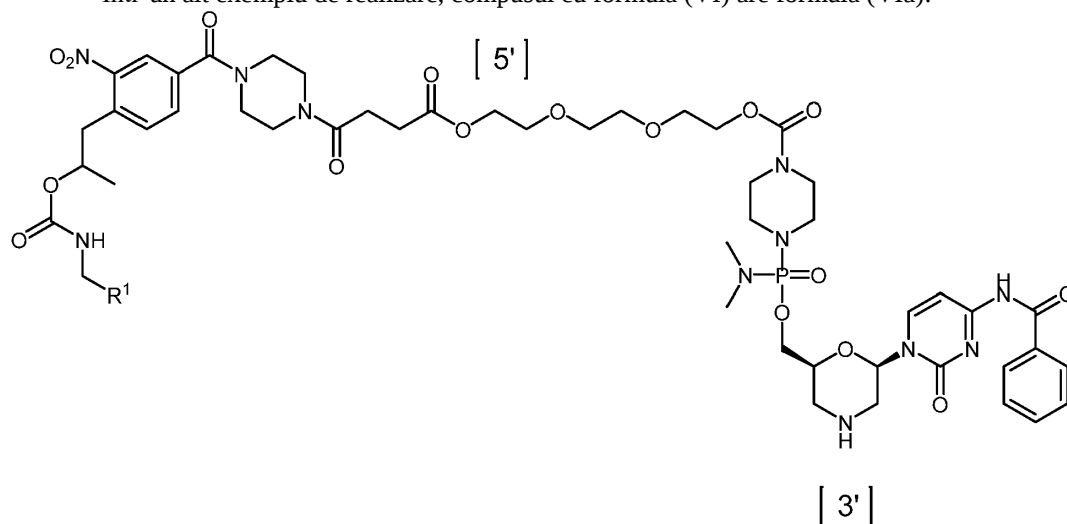
- 5 R² este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:



și
în care R² este la fiecare poziție de la 1 la 30 și de la 5' la 3':

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
1	PC	11	PA	21	DPG
2	T	12	PA	22	PC
3	PC	13	DPG	23	PA
4	PC	14	DPG	24	T
5	PA	15	PA	25	T
6	PA	16	PA	26	T
7	PC	17	DPG	27	PC
8	PA	18	PA	28	T
9	T	19	T	29	PA
10	PC	20	DPG	30	DPG

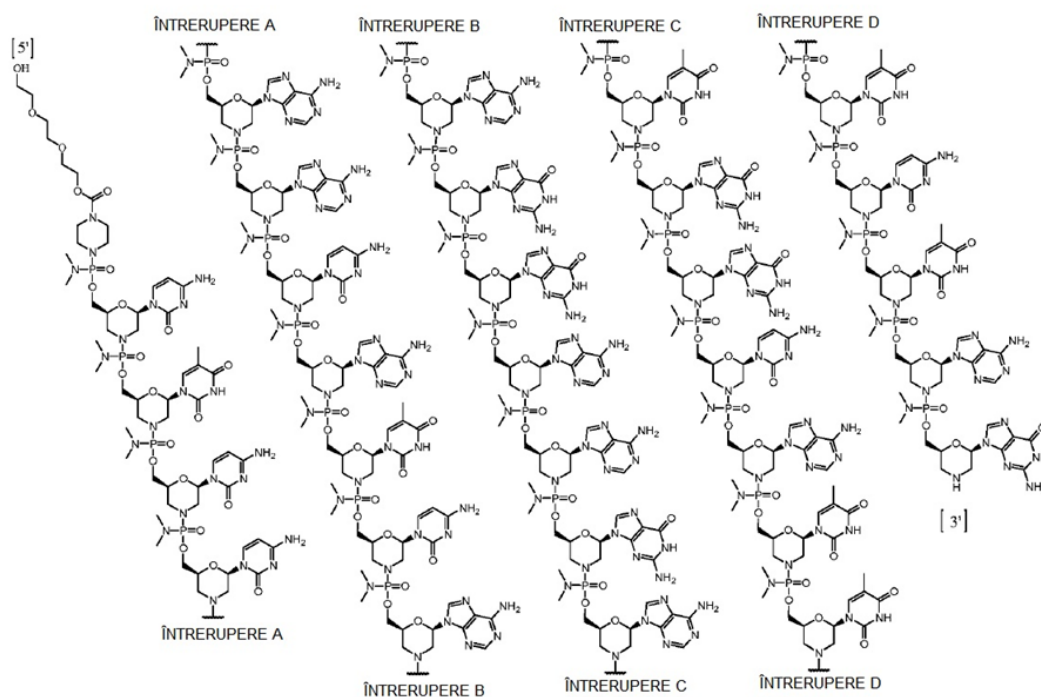
Într-un alt exemplu de realizare, compusul cu formula (VI) are formula (VIa):



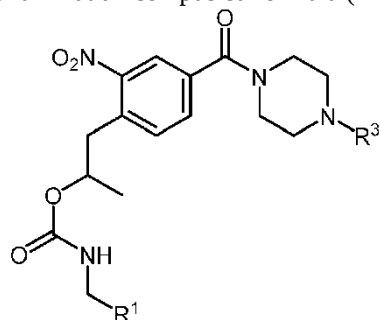
(VIa);

în care R¹ este un mediu-suport.

- 5 Într-un alt exemplu de realizare, compusul oligomeric cu formula (E) este un compus oligomeric cu formula (XII):



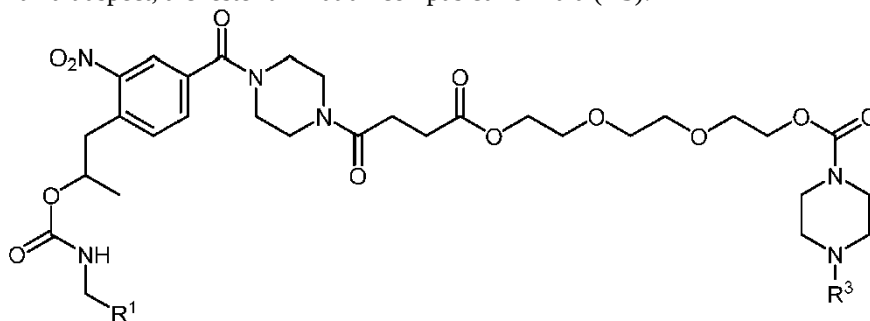
Într-un alt aspect, aici este furnizat un compus cu formula (A1):



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

- 5 fiecare R^1 este independent un mediu-suport; și
fiecare R^3 este selectat independent din grupul constând din hidrogen, tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil.

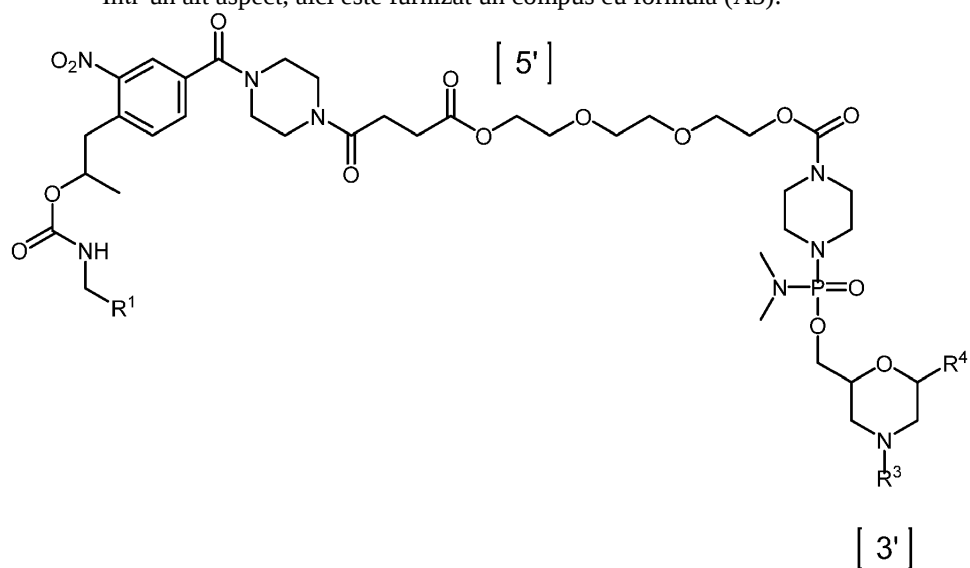
Într-un alt aspect, aici este furnizat un compus cu formula (A3):



10 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

- fiecare R^1 este independent un mediu-suport; și
fiecare R^3 este selectat independent din grupul constând din hidrogen, tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil.

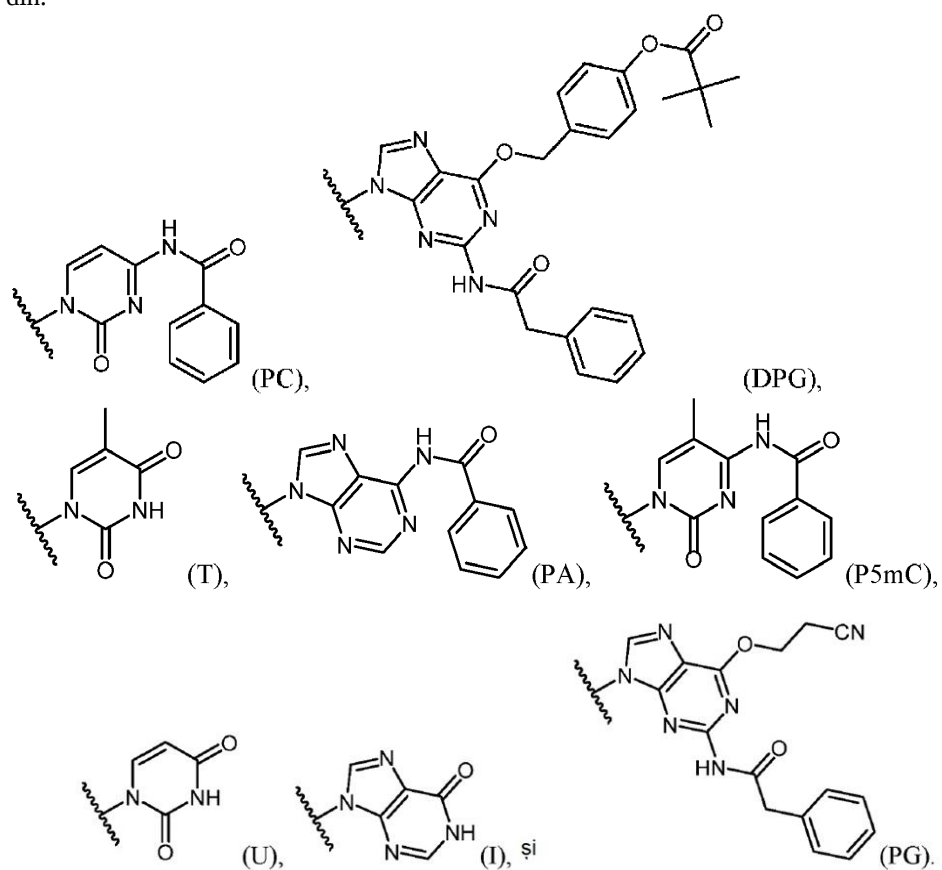
Într-un alt aspect, aici este furnizat un compus cu formula (A5):



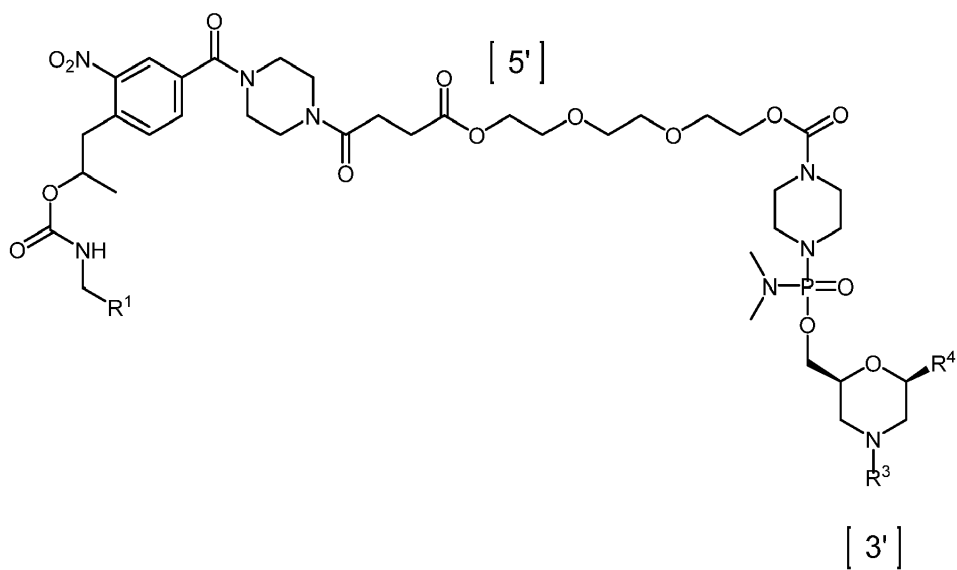
(A5);

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care R^1 este un mediu-suport, R^3 este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil și R^4 este selectat din grupul constând din:

5



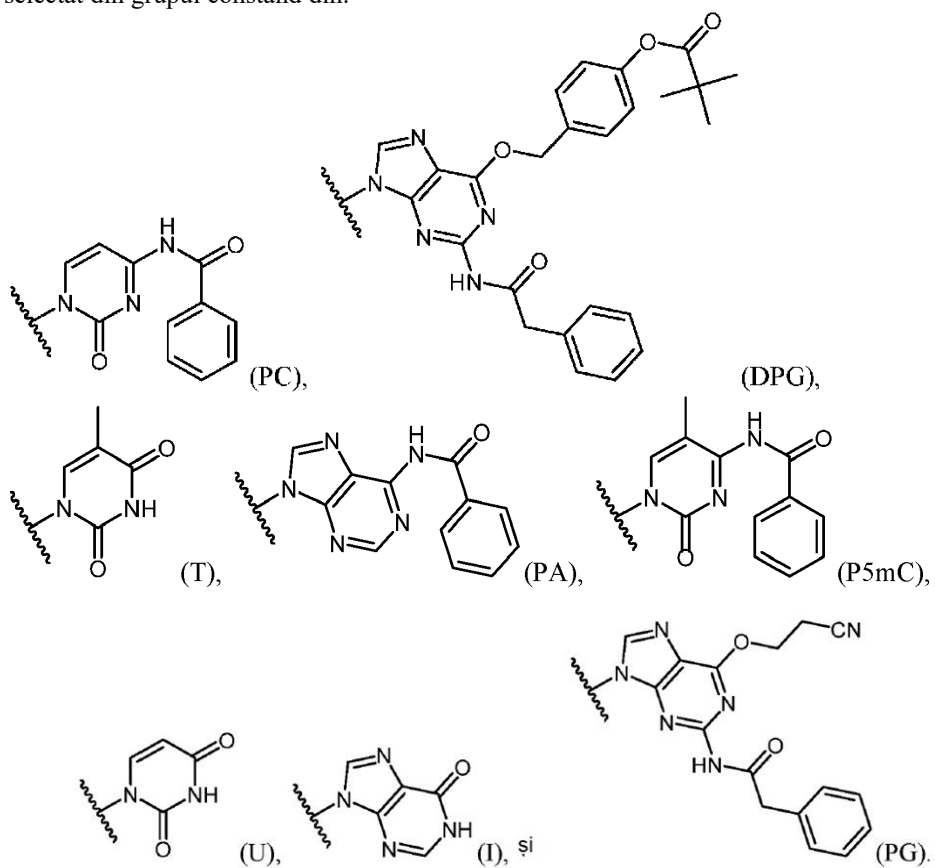
În unele exemple de realizare, compusul cu formula (A5) are formula (A5a):



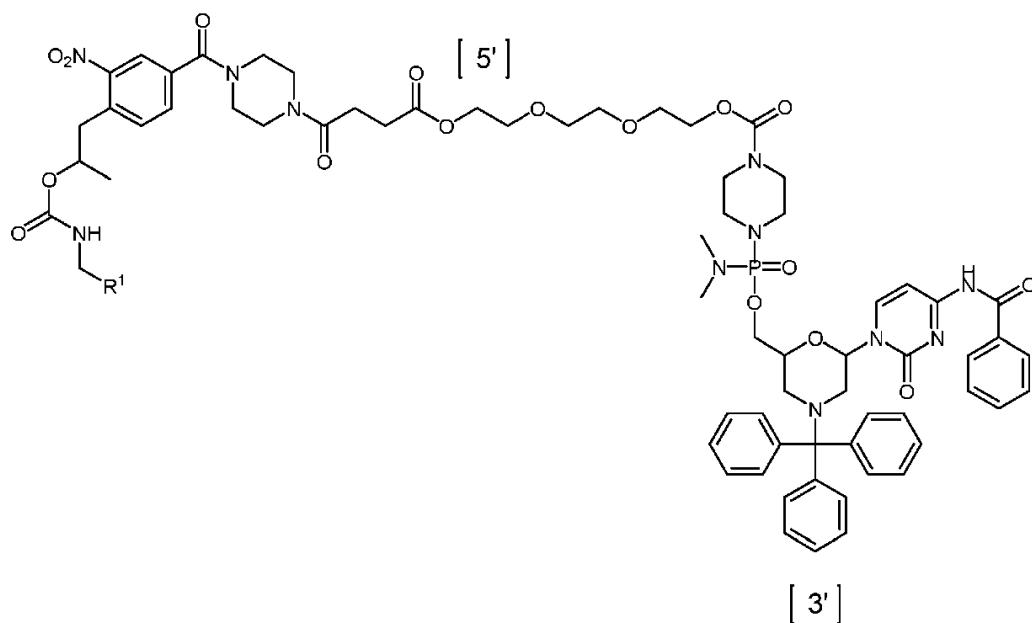
(A5a);

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care R^1 este un mediu-suport, R^3 este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil și R^4 este selectat din grupul constând din:

5



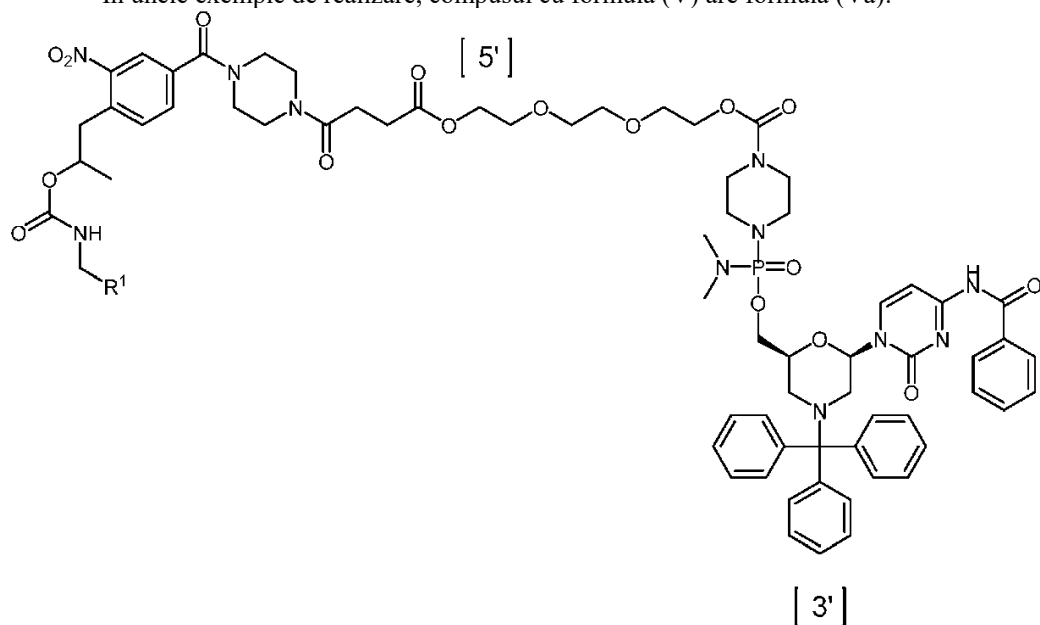
Într-un alt aspect, aici este furnizat un compus cu formula (V):



(V);

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care R^1 este un mediu-suport.

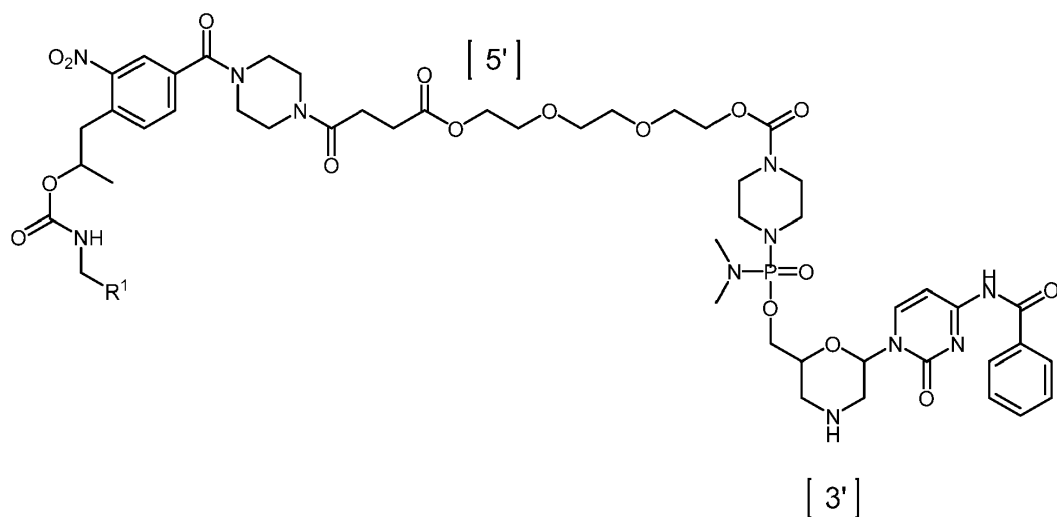
În unele exemple de realizare, compusul cu formula (V) are formula (Va):



(Va),

5 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care R^1 este un mediu-suport.

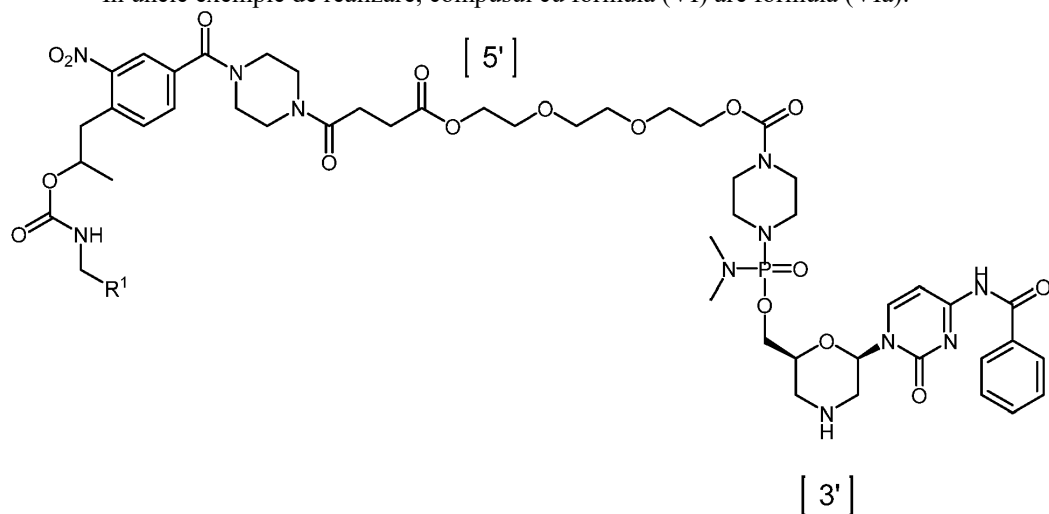
Într-un alt aspect, aici este furnizat un compus cu formula (VI):



(VI);

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care R¹ este un mediu-suport.

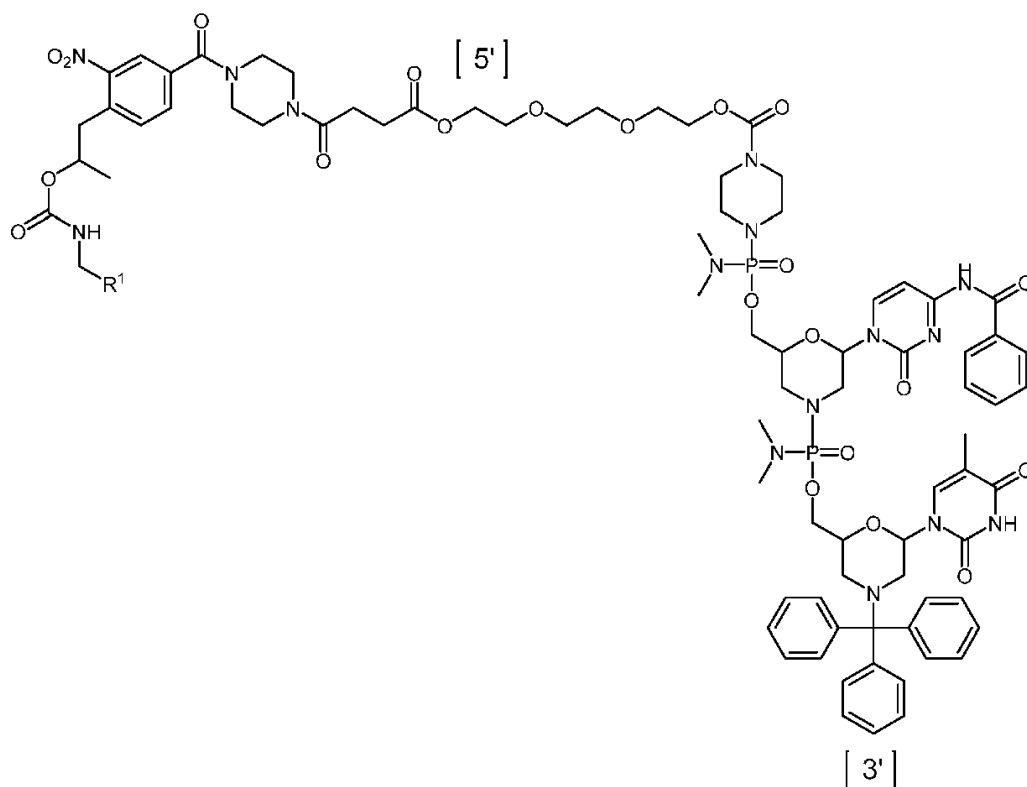
În unele exemple de realizare, compusul cu formula (VI) are formula (VIa):



(VIa);

5 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care R¹ este un mediu-suport.

Într-un alt aspect, aici este furnizat un compus cu formula (VII):

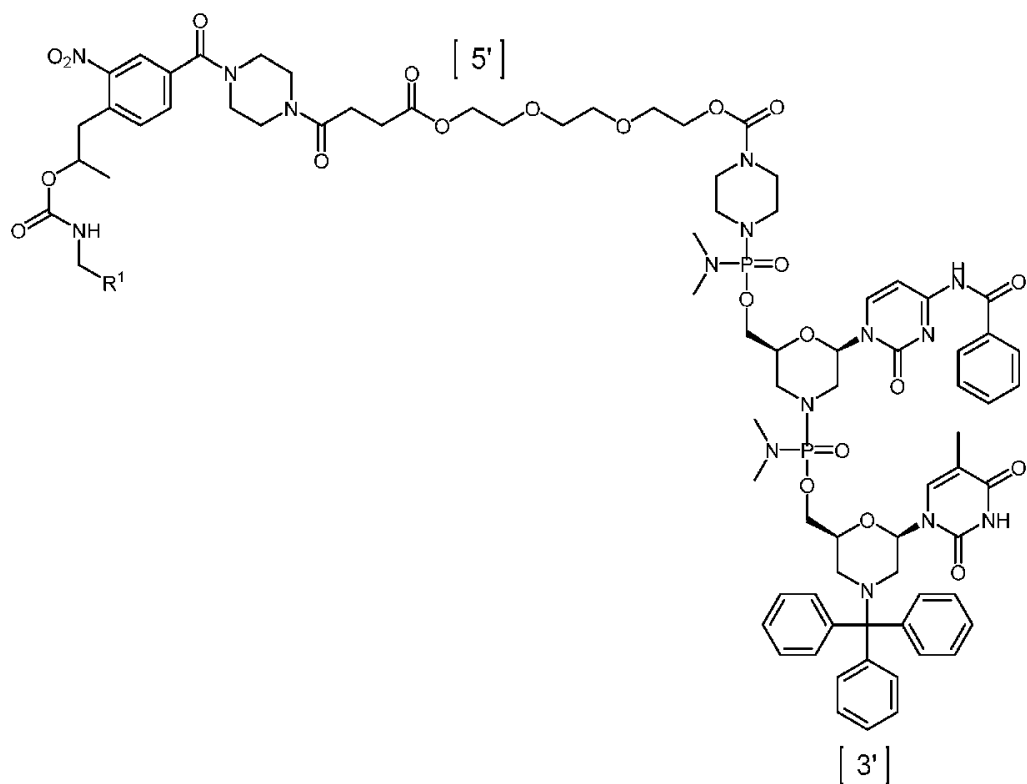


(VII);

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care R^1 este un mediu-suport.

În unele exemple de realizare, compusul cu formula (VII) are formula (VIIa):

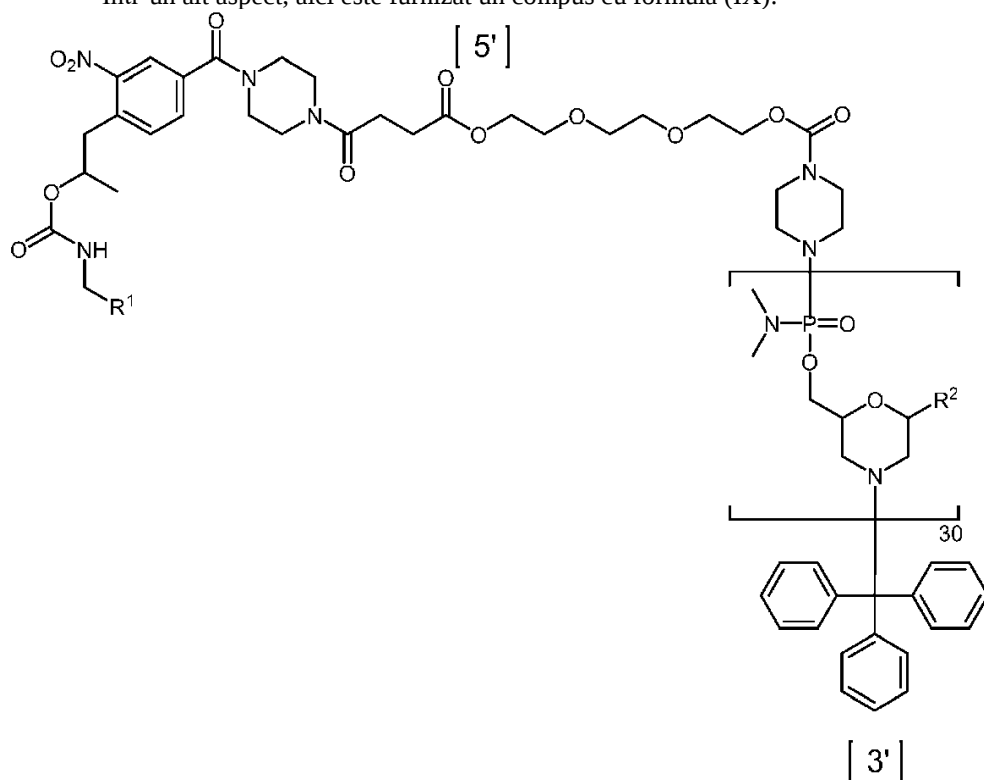
5



(VIIa),

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care R^1 este un mediu-suport.

Într-un alt aspect, aici este furnizat un compus cu formula (IX):

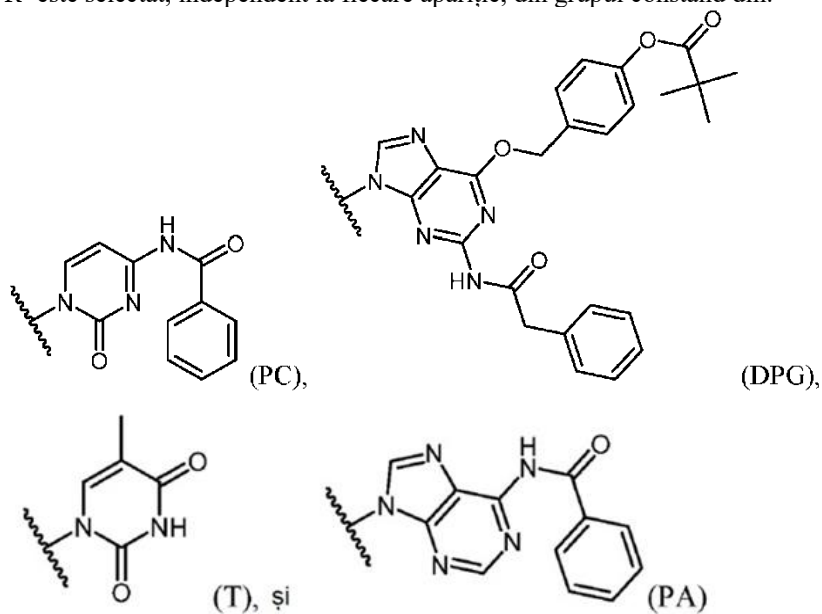


(IX),

sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, în care:

R¹ este un mediu-suport și

- 5 R² este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:



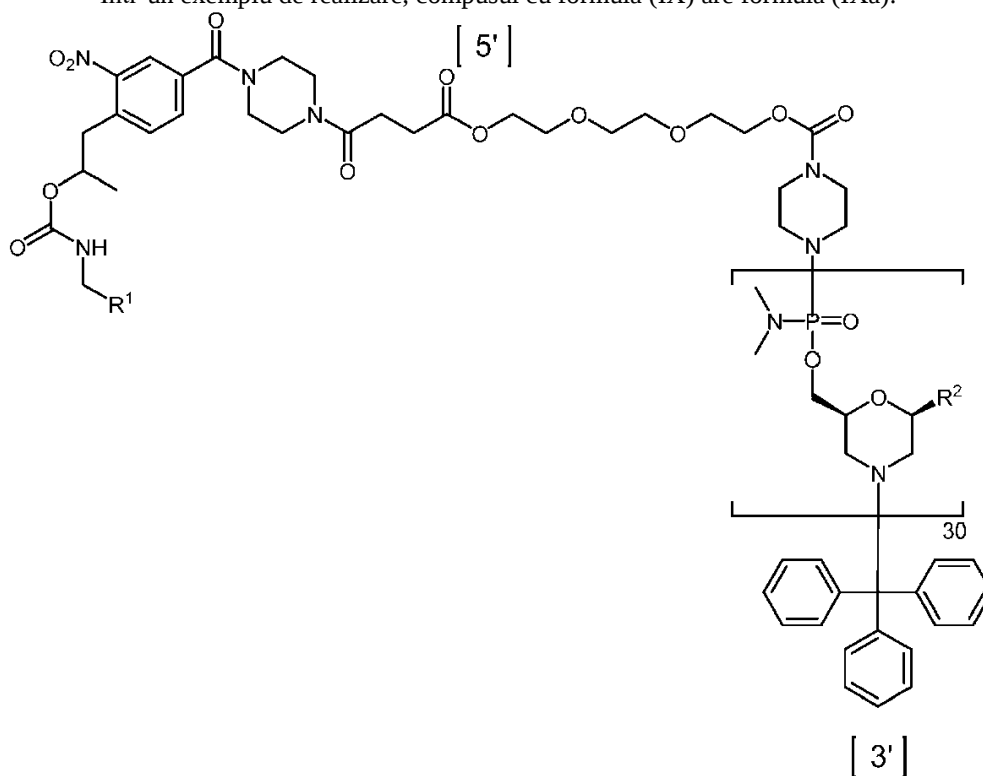
și

în care R² este la fiecare poziție de la 1 la 30 și de la 5' la 3':

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
1	PC	11	PA	21	DPG
2	T	12	PA	22	PC
3	PC	13	DPG	23	PA

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
4	PC	14	DPG	24	T
5	PA	15	PA	25	T
6	PA	16	PA	26	T
7	PC	17	DPG	27	PC
8	PA	18	PA	28	T
9	T	19	T	29	PA
10	PC	20	DPG	30	DPG

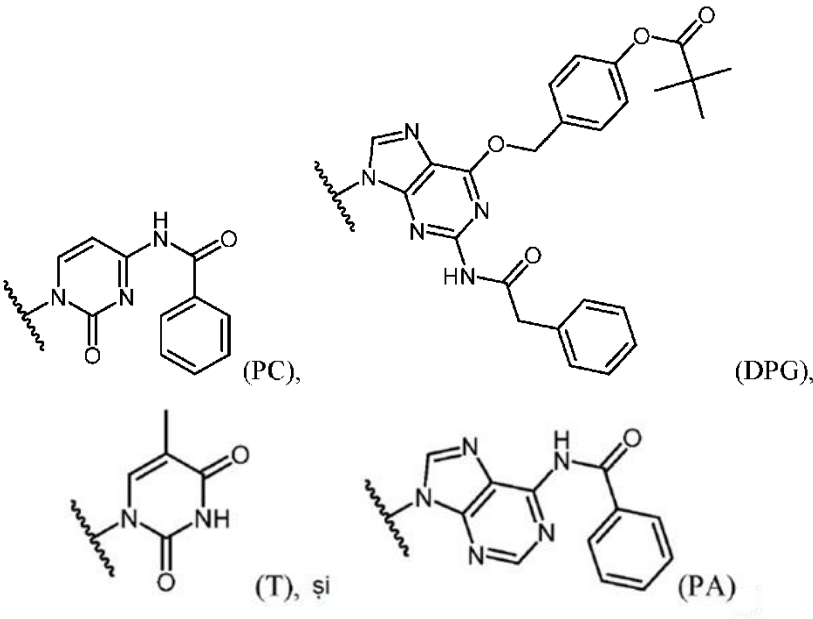
Într-un exemplu de realizare, compusul cu formula (IX) are formula (IXa):



(IXa).

sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, în care

- 5 R¹ este un mediu-suport și
R² este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:

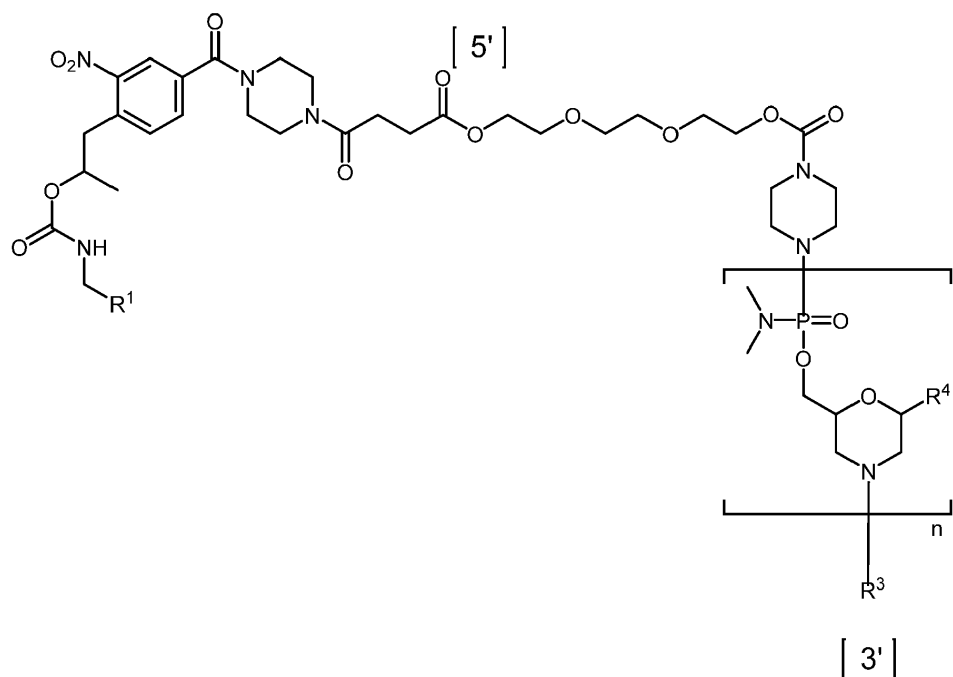


și
în care R² este la fiecare poziție de la 1 la 30 și de la 5' la 3':

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
1	PC	11	PA	21	DPG
2	T	12	PA	22	PC
3	PC	13	DPG	23	PA
4	PC	14	DPG	24	T
5	PA	15	PA	25	T
6	PA	16	PA	26	T
7	PC	17	DPG	27	PC
8	PA	18	PA	28	T
9	T	19	T	29	PA
10	PC	20	DPG	30	DPG

5

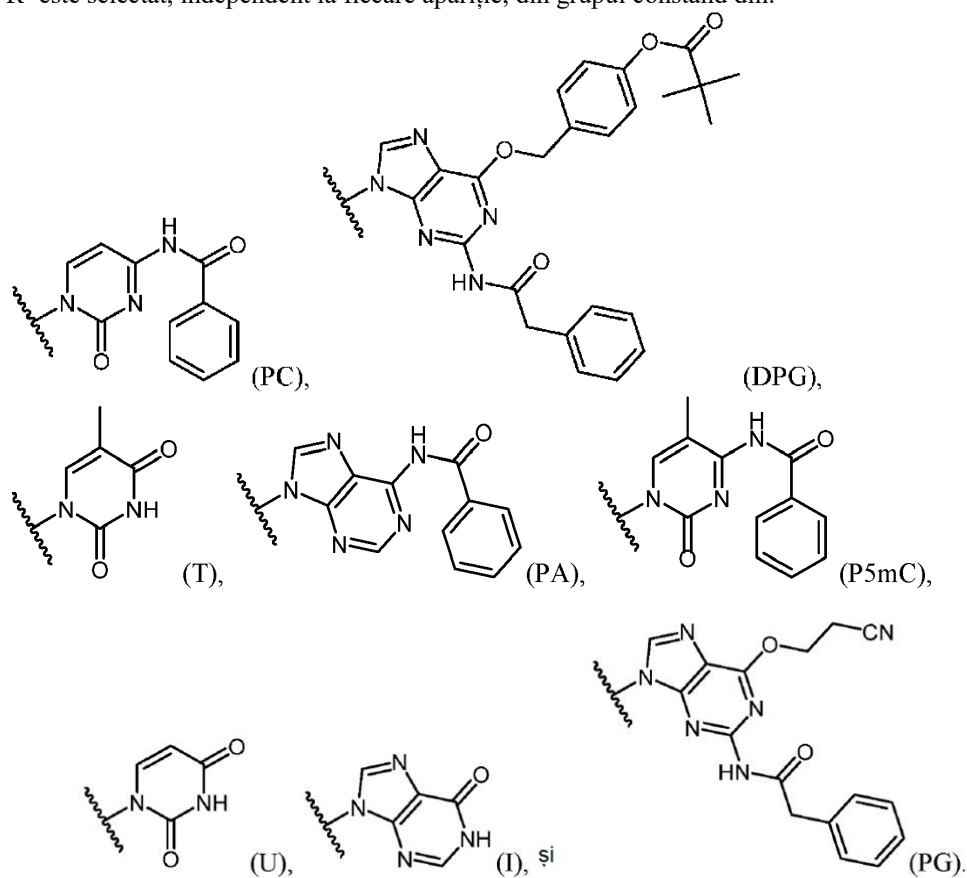
Într-un alt aspect, aici este furnizat un compus cu formula (A9):

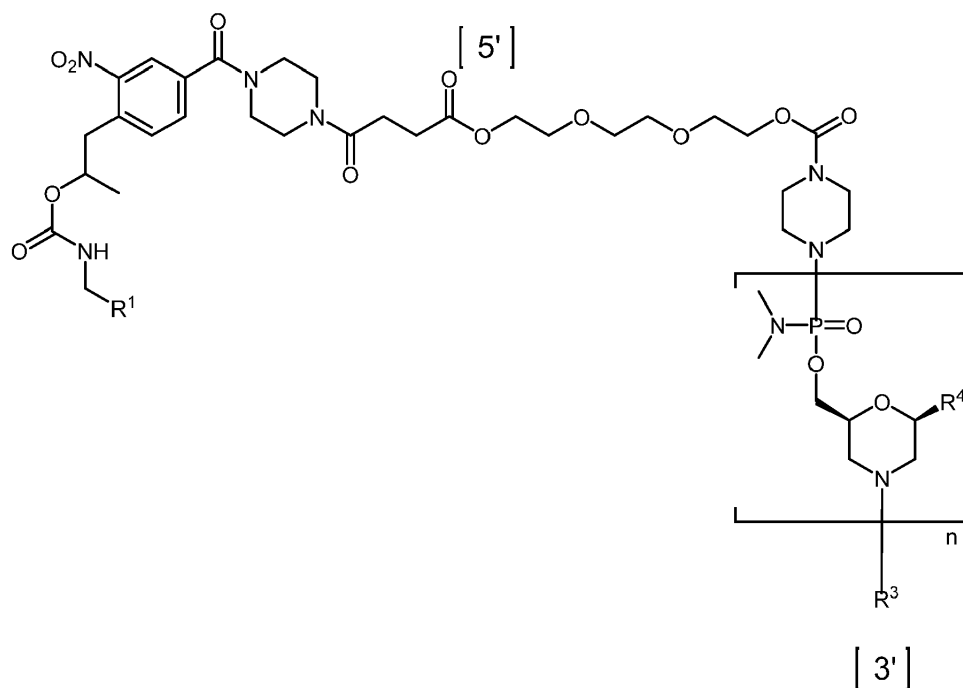


(A9),

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

n este un număr întreg de la 10 la 40;

 R^1 este un mediu-suport;5 R^3 este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil; și R^4 este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:



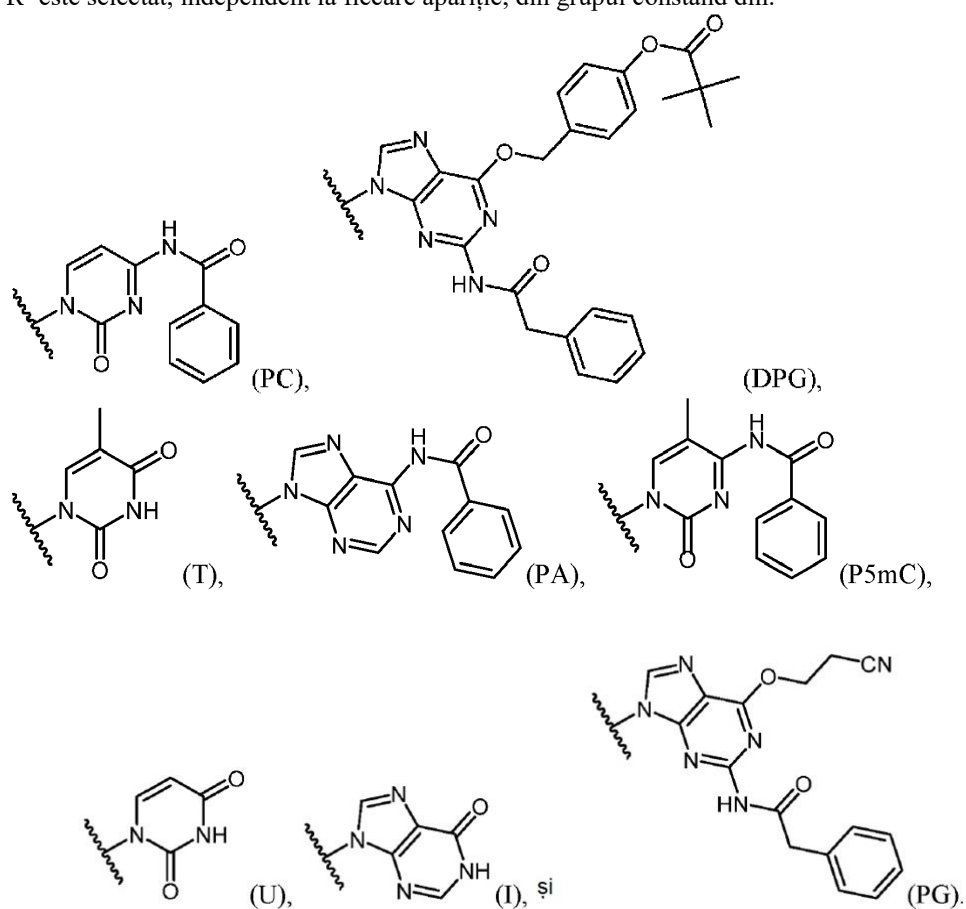
(A9a),

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

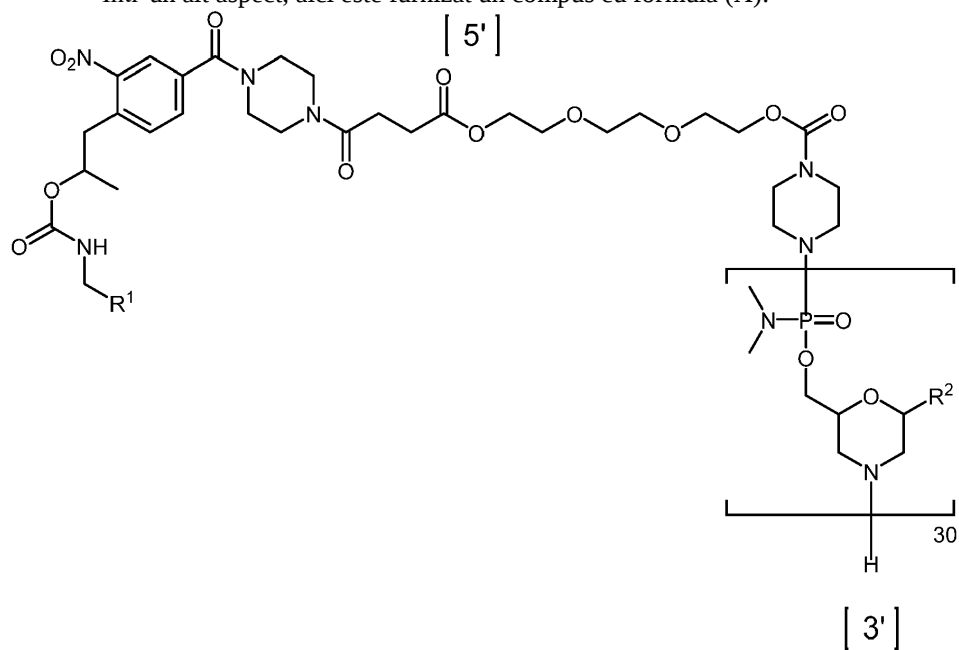
n este un număr întreg de la 10 la 40;

R¹ este un mediu-suport;

- 5 R³ este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil; și
R⁴ este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:



Într-un exemplu de realizare, compusul cu formula (A9) are formula (IX), prezentată mai sus.
Într-un alt aspect, aici este furnizat un compus cu formula (X):

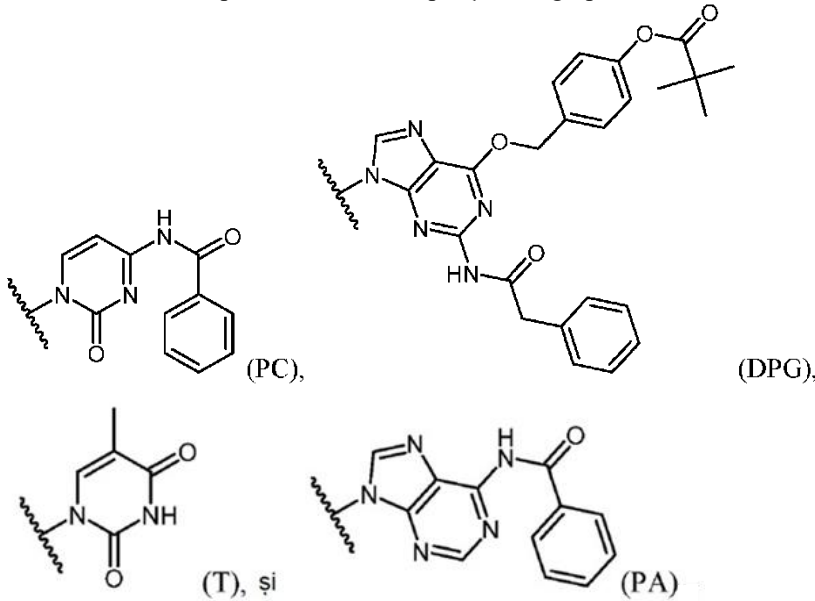


(X);

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care

5 R¹ este un mediu-suport și

R² este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:



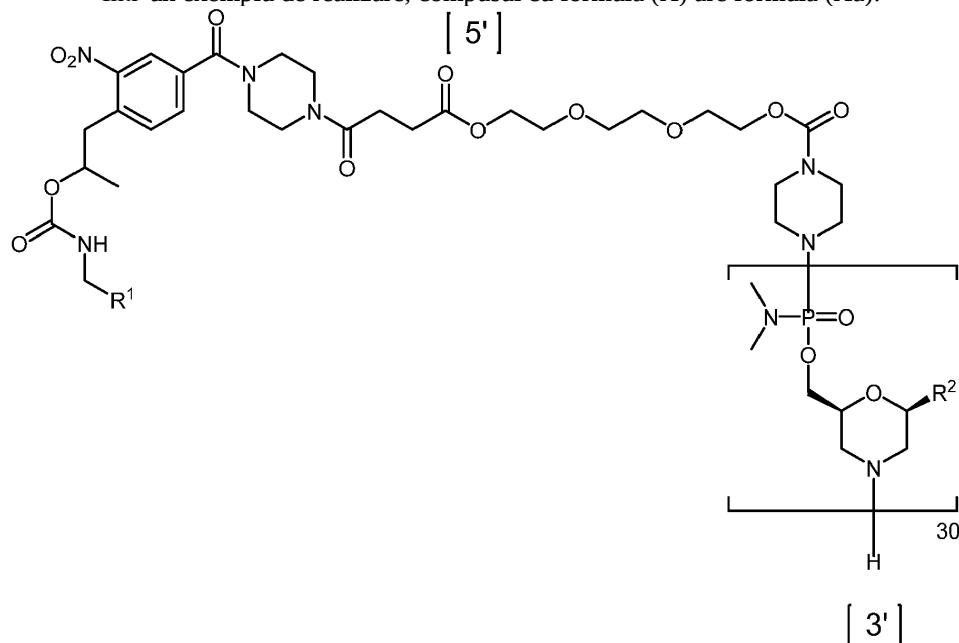
și

10 în care R² este la fiecare poziție de la 1 la 30 și de la 5' la 3':

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
1	PC	11	PA	21	DPG
2	T	12	PA	22	PC
3	PC	13	DPG	23	PA
4	PC	14	DPG	24	T
5	PA	15	PA	25	T

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
6	PA	16	PA	26	T
7	PC	17	DPG	27	PC
8	PA	18	PA	28	T
9	T	19	T	29	PA
10	PC	20	DPG	30	DPG

Într-un exemplu de realizare, compusul cu formula (X) are formula (Xa):

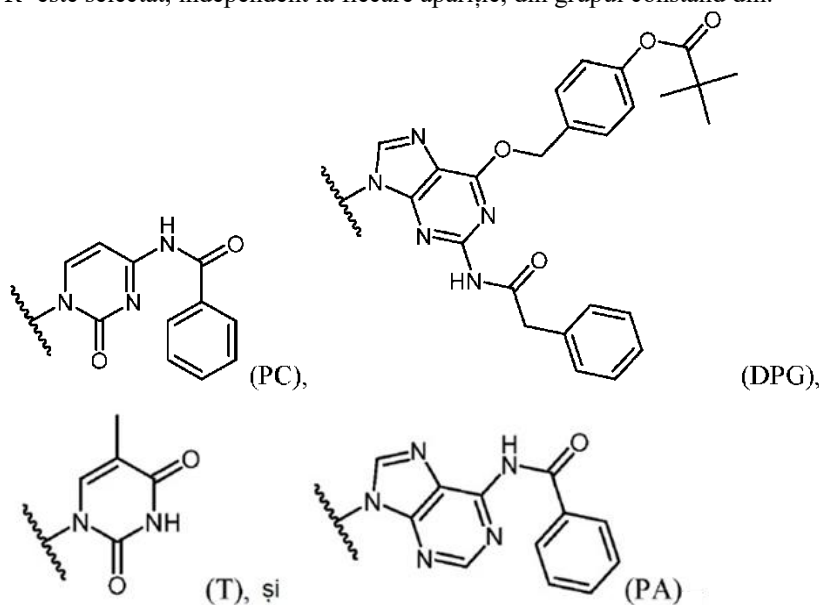


(Xa),

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care

5 $\mathbb{R}^1$ este un mediu-suport și

R^2 este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:

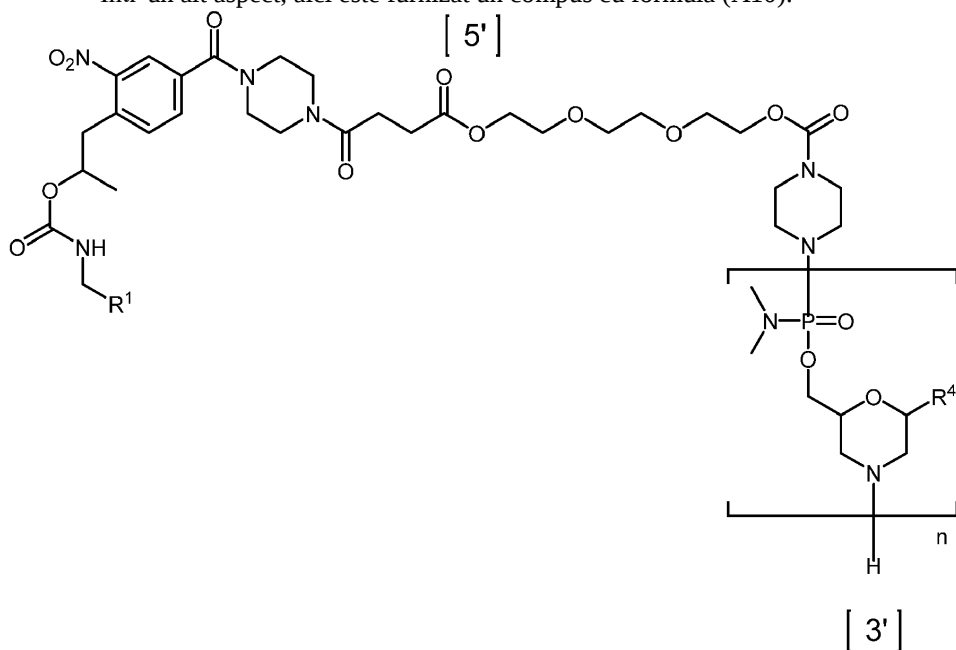


Si

10 în care R^2 este la fiecare poziție de la 1 la 30 și de la 5' la 3':

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
1	PC	11	PA	21	DPG
2	T	12	PA	22	PC
3	PC	13	DPG	23	PA
4	PC	14	DPG	24	T
5	PA	15	PA	25	T
6	PA	16	PA	26	T
7	PC	17	DPG	27	PC
8	PA	18	PA	28	T
9	T	19	T	29	PA
10	PC	20	DPG	30	DPG

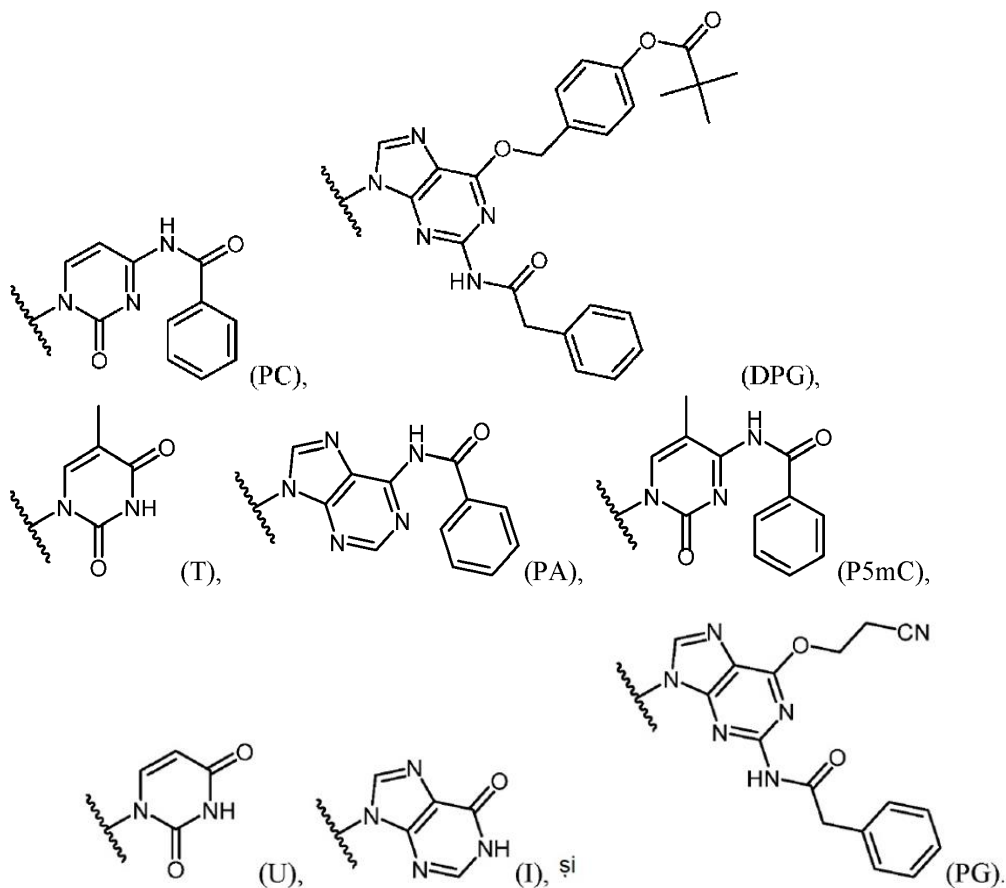
Într-un alt aspect, aici este furnizat un compus cu formula (A10):



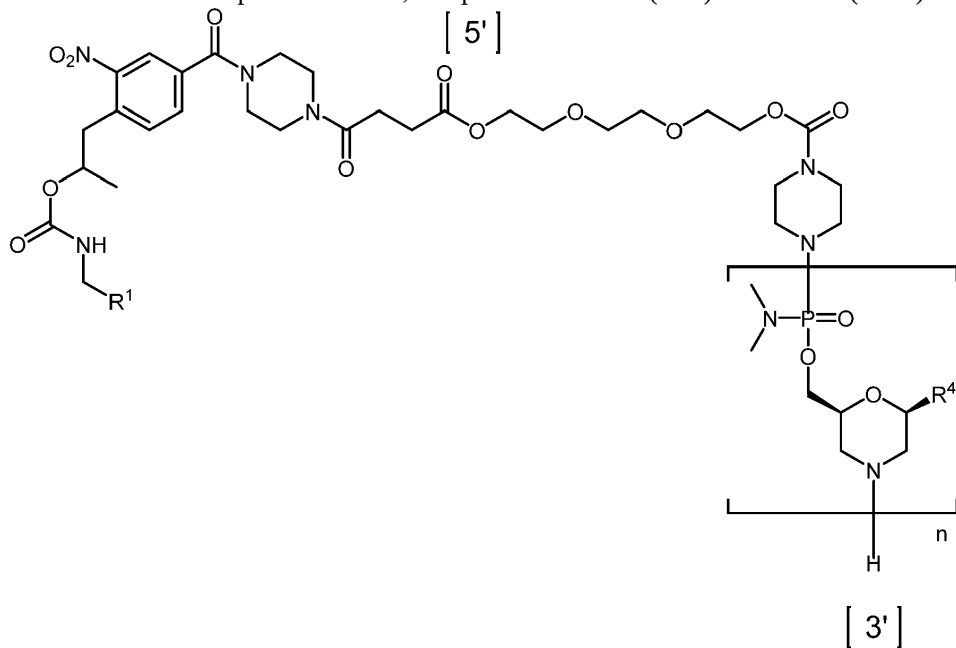
(A10),

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

- 5 n este un număr întreg de la 10 la 40;
R¹ este un mediu-suport;
R³ este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil; și
R⁴ este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:



Într-un exemplu de realizare, compusul cu formula (A10) are formula (A10a):



(A10a),

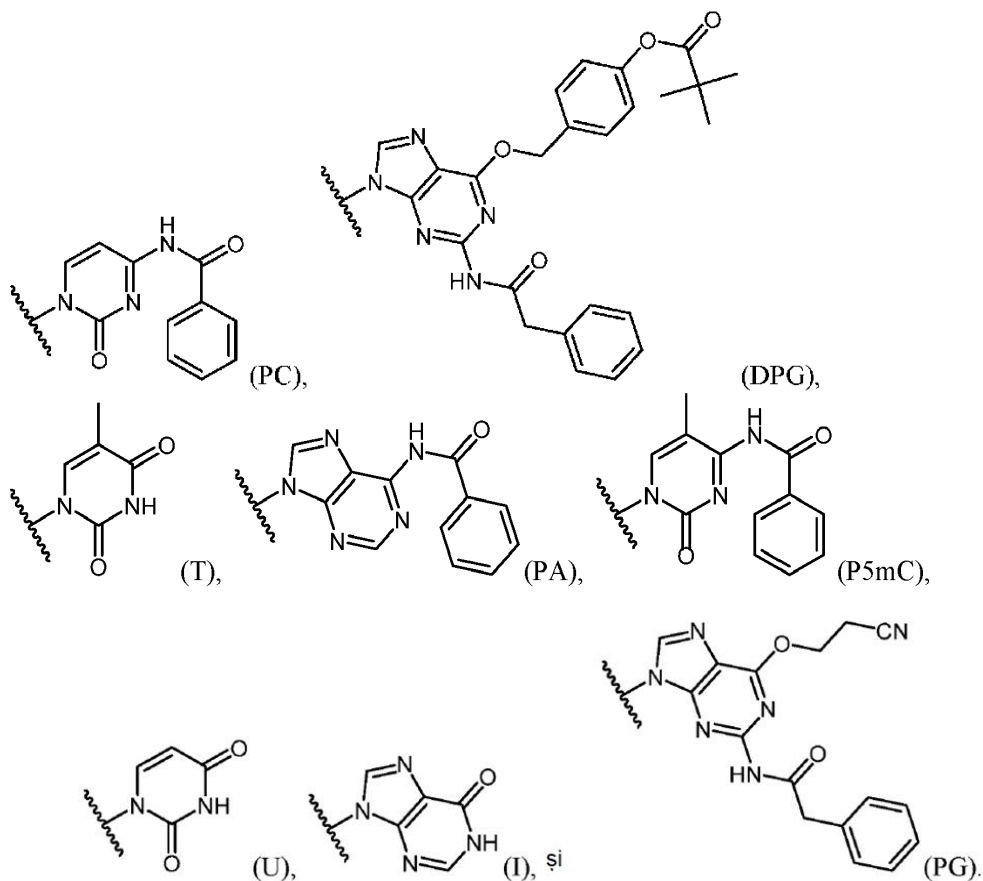
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

n este un număr întreg de la 10 la 40;

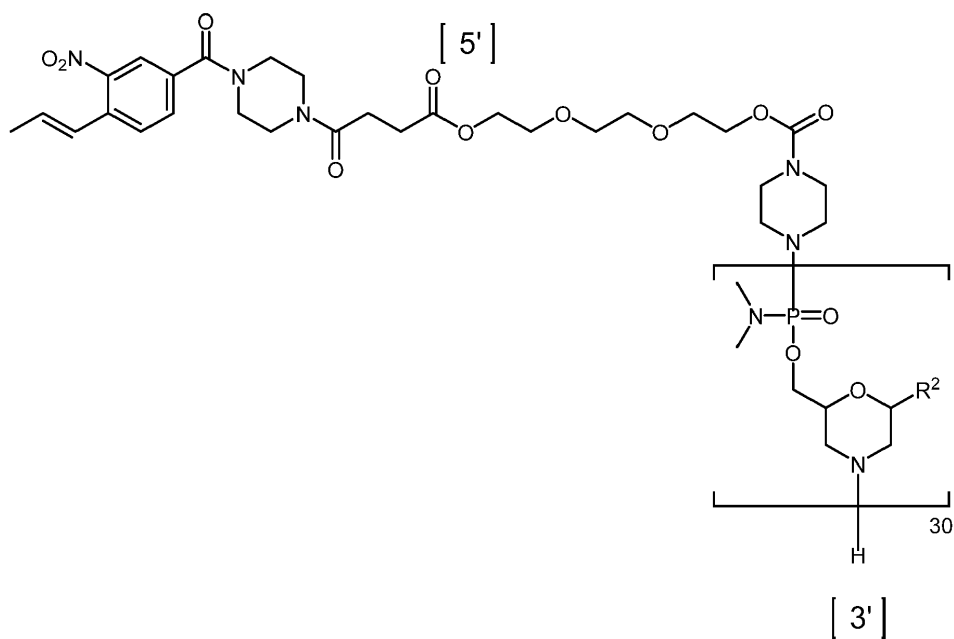
R^1 este un mediu-suport;

R^3 este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil; și

R^4 este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:

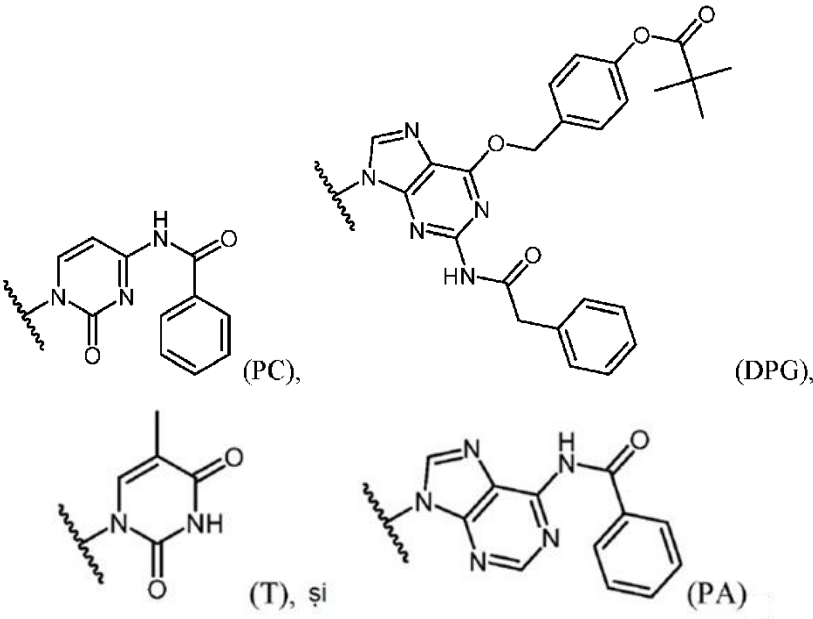


- Într-un alt exemplu de realizare, compusul cu formula (A10) are formula (X), prezentată mai sus.
 Într-un alt exemplu de realizare a acestor compuși, mediul-suport cuprinde polistiren cu 1% divinilbenzen reticulat.
 Într-un alt aspect, aici este furnizat un compus cu formula (XI):



(XI),

- 10 sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, în care:
 R^2 este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:

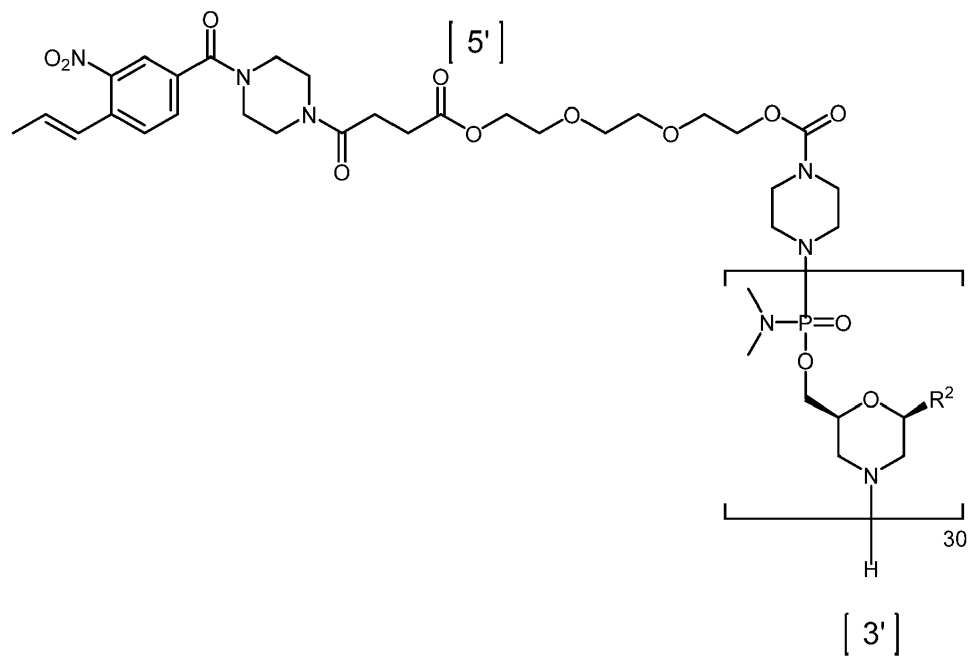


și
în care R² este la fiecare poziție de la 1 la 30 și de la 5' la 3':

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
1	PC	11	PA	21	DPG
2	T	12	PA	22	PC
3	PC	13	DPG	23	PA
4	PC	14	DPG	24	T
5	PA	15	PA	25	T
6	PA	16	PA	26	T
7	PC	17	DPG	27	PC
8	PA	18	PA	28	T
9	T	19	T	29	PA
10	PC	20	DPG	30	DPG

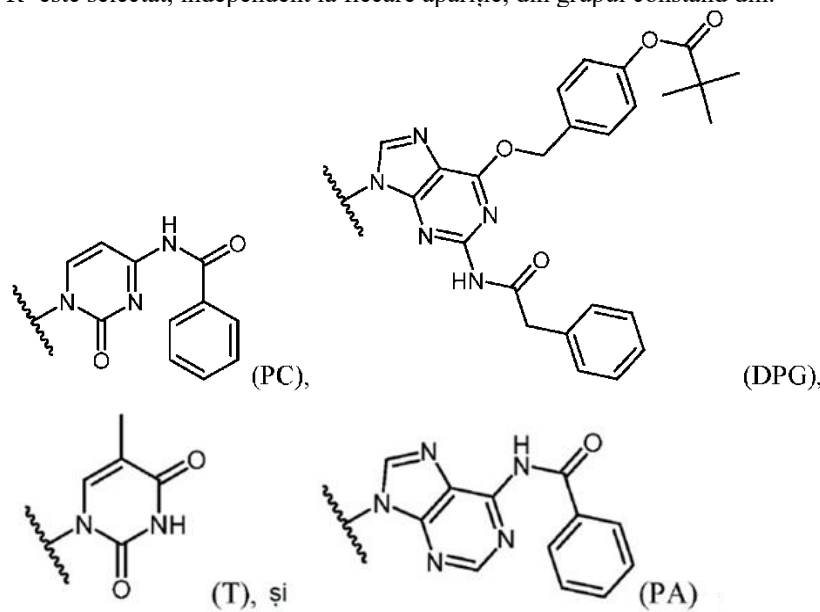
5

Într-un exemplu de realizare, compusul cu formula (XI) are formula (XIa):



(XIIa),

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care R² este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:



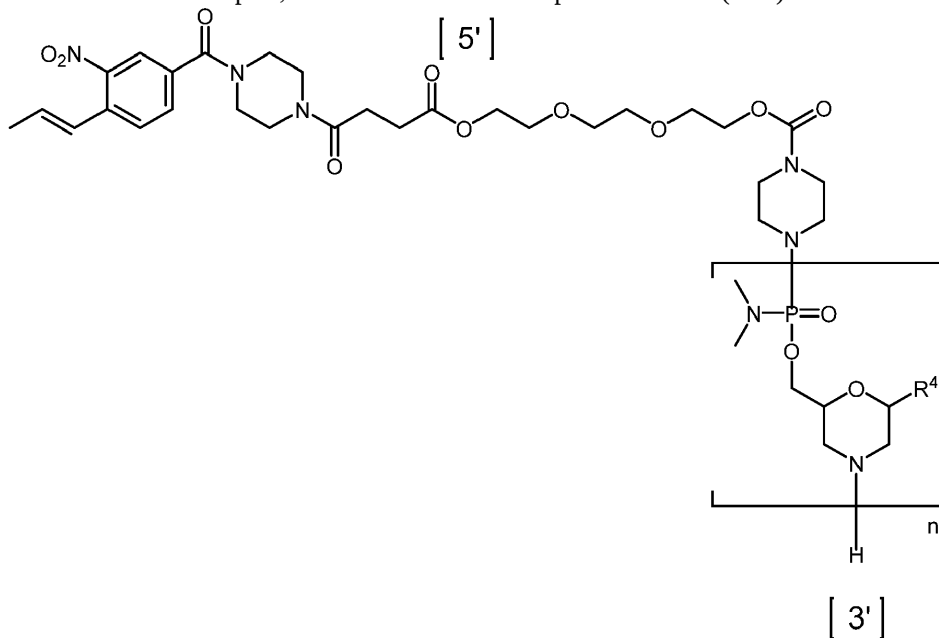
5

și în care R² este la fiecare poziție de la 1 la 30 și de la 5' la 3':

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
1	PC	11	PA	21	DPG
2	T	12	PA	22	PC
3	PC	13	DPG	23	PA
4	PC	14	DPG	24	T
5	PA	15	PA	25	T
6	PA	16	PA	26	T
7	PC	17	DPG	27	PC

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
8	PA	18	PA	28	T
9	T	19	T	29	PA
10	PC	20	DPG	30	DPG

Într-un alt aspect, aici este furnizat un compus cu formula (A11):



(A11),

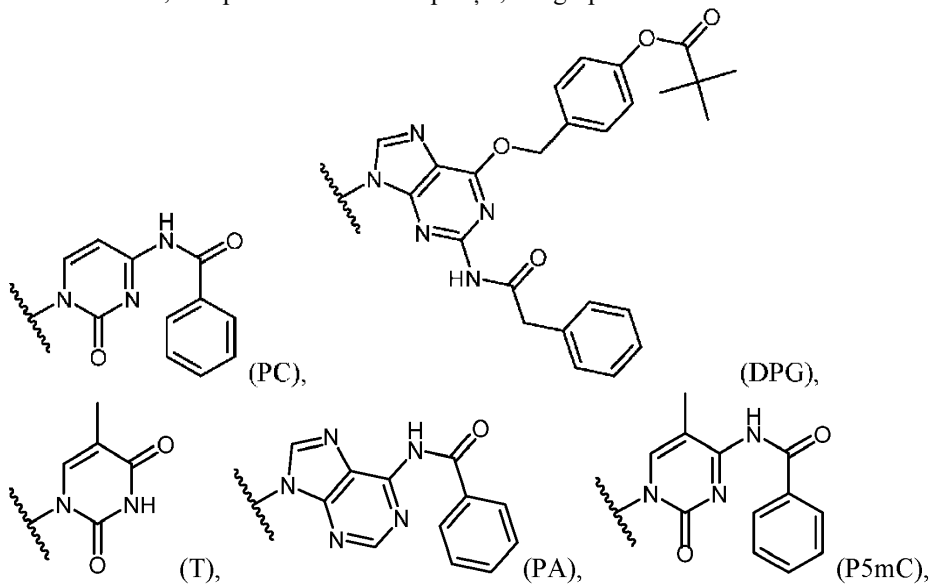
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

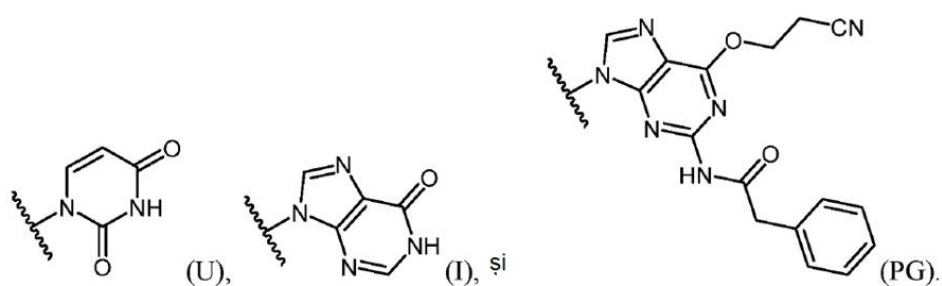
5 n este un număr întreg de la 10 la 40;

R¹ este un mediu-suport;

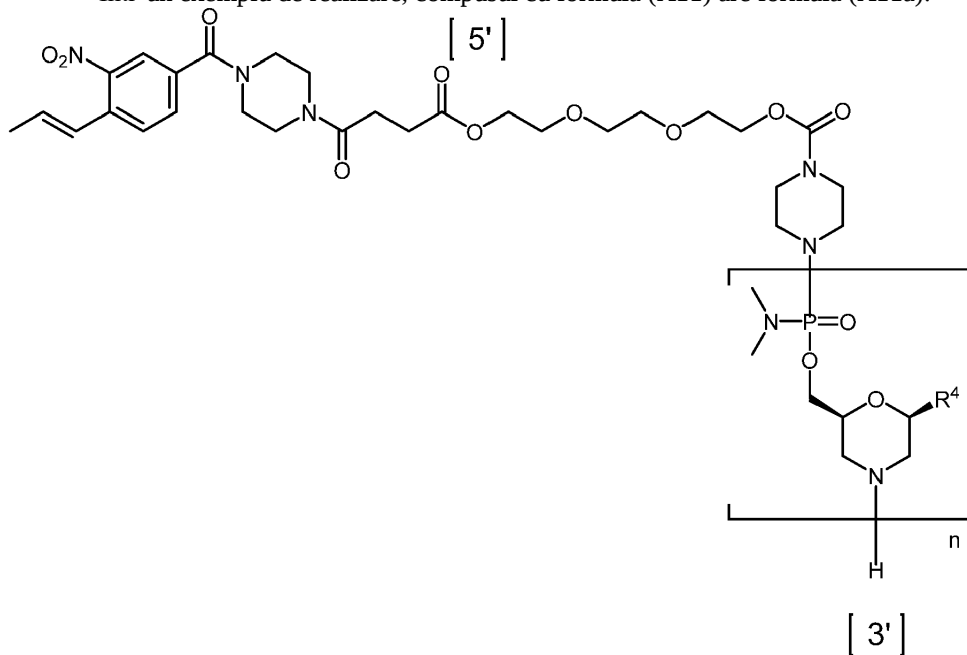
R³ este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil; și

R⁴ este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:





Într-un exemplu de realizare, compusul cu formula (A11) are formula (A11a):



(A11a),

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

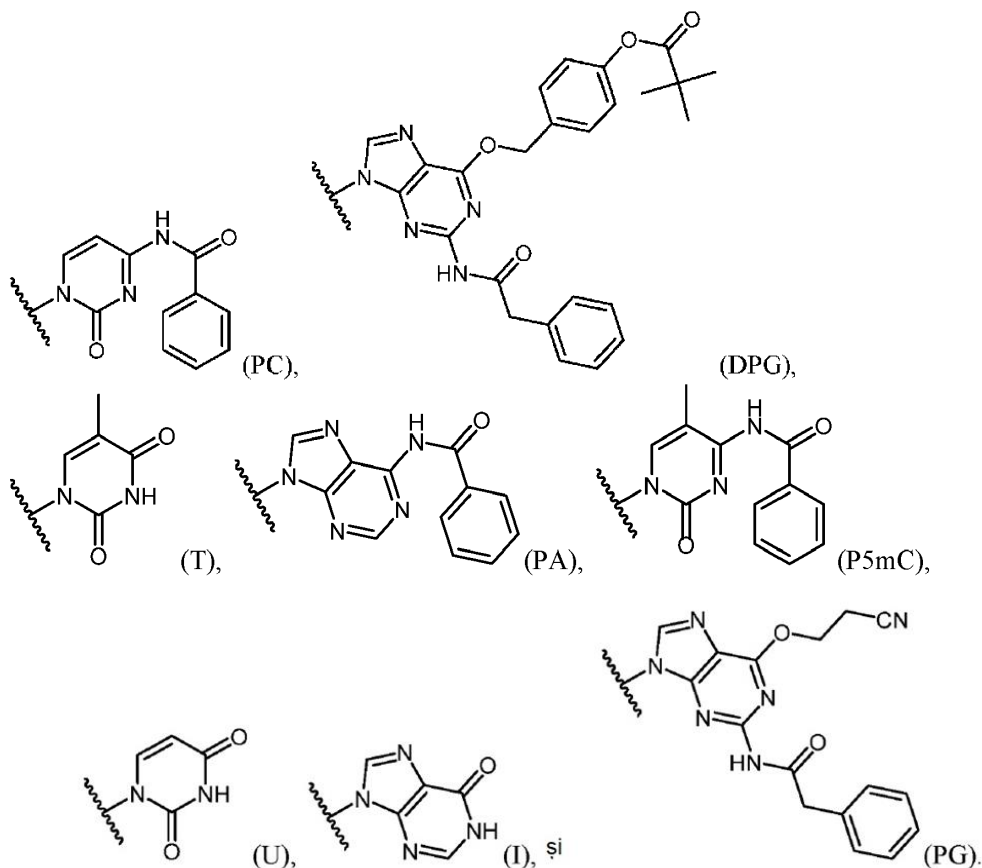
5

n este un număr întreg de la 10 la 40;

R¹ este un mediu-suport;

R³ este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil; și

R⁴ este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:



Într-un exemplu de realizare, compusul cu formula (A11) are formula (XI), prezentată mai sus.

Oligomeri

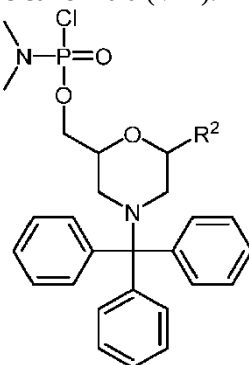
Proprietățile importante ale subunităților pe bază de morfolino includ: 1) capacitatea de a fi legate într-o formă oligomerică prin legături structurale stabile, neîncărcate sau încărcate pozitiv; 2) capacitatea de a susține o bază nucleotidă (de exemplu, adenină, citozină, guanină, timidină, uracil, 5-metil-citozină și hipoxantină) astfel încât polimerul format să poată hibridiza cu un acid nucleic țintă cu bază complementară, incluzând ARN țintă; 3) capacitatea oligomerului de a fi transportat activ sau pasiv în celulele de mamifere; și 4) capacitatea oligomerului și a heteroduplexului oligomer:ARN de a rezista degradării ARN-azei și, respectiv, RNazei H.

În unele exemple de realizare, oligomerii antisens conțin modificări de baze sau substituții. De exemplu, anumite nucleobaze pot fi selectate pentru a crește afinitatea de legare a oligomerilor antisens descriși aici. S-a demonstrat că substituțiile 5-metilcitozinei cresc stabilitatea duplexului acidului nucleic cu 0,6-1,2°C și pot fi încorporate în oligomerii antisens descriși aici. Într-un exemplu de realizare, cel puțin o bază pirimidină a oligomerului cuprinde o bază pirimidină 5-substituită, în care baza pirimidină este selectată din grupul constând din citozină, timidină și uracil. Într-un exemplu de realizare, baza pirimidină 5-substituită este 5-metilcitozină. Într-un alt exemplu de realizare, cel puțin o bază purinică a oligomerului cuprinde hipoxantină.

Oligomerii pe bază de morfolino (inclusiv oligomerii antisens) sunt detaliați, de exemplu, în brev. SUA nr. 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.185.444, 5.521.063, 5.506.337, 8.299.206, și 8.076.476, pub. cererii de brevet internațional nr. WO 2009/064471 și WO 2012/043730, și Summerton și colab. (1997, Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 7, 187-195).

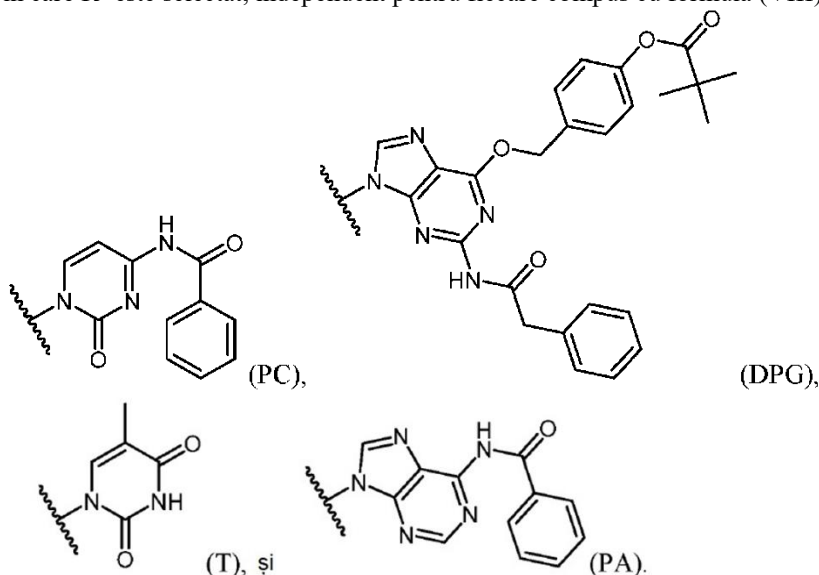
Compușii oligomerici din dezvăluire pot avea centri asimetrici, axe chirale și planuri chirale (așa cum este descris, de exemplu, în: E. L. Eliel și S. H. Wilen, Stereo-chemistry of Carbon Compounds, John Wiley & Sons, New York, 1994, paginile 1119-1190, și March, J., Advanced Organic Chemistry, ed. a 3-a cap. 4, John Wiley & Sons, New York (1985)), și pot apărea ca racemați, amestecuri racemice și ca diastereomeri individuali, cu toți posibii izomeri și amestecuri ale acestora, inclusiv izomeri optici. Compușii oligomerici conform dezvăluirii menționați în mod specific aici, fără nicio indicație a stereo-chimiei lor, sunt intenționați să reprezinte toți posibii izomeri și amestecuri ale acestora.

În mod specific, fără a dori să fie legați de vreo teorie particulară, compușii oligomerici conform dezvăluirii sunt preparați, așa cum s-a discutat aici, din subunități morfolino activate incluzând astfel de exemple nelimitative, cum ar fi un compus cu formula (VIII):

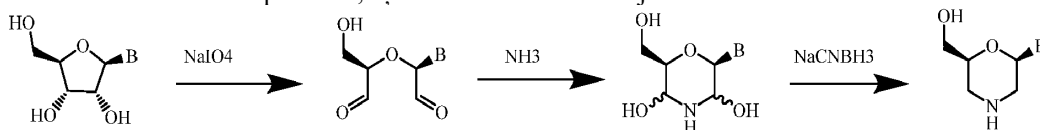


(VIII);

- 5 în care R² este selectat, independent pentru fiecare compus cu formula (VIII), din grupul constând din:

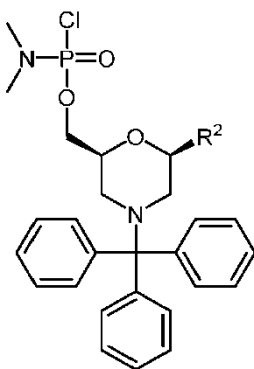


Fiecare dintre compușii menționați mai sus cu formula (VIII) poate fi preparat, de exemplu, din beta-D-ribofuranozilul corespunzător, așa cum este descris mai jos:



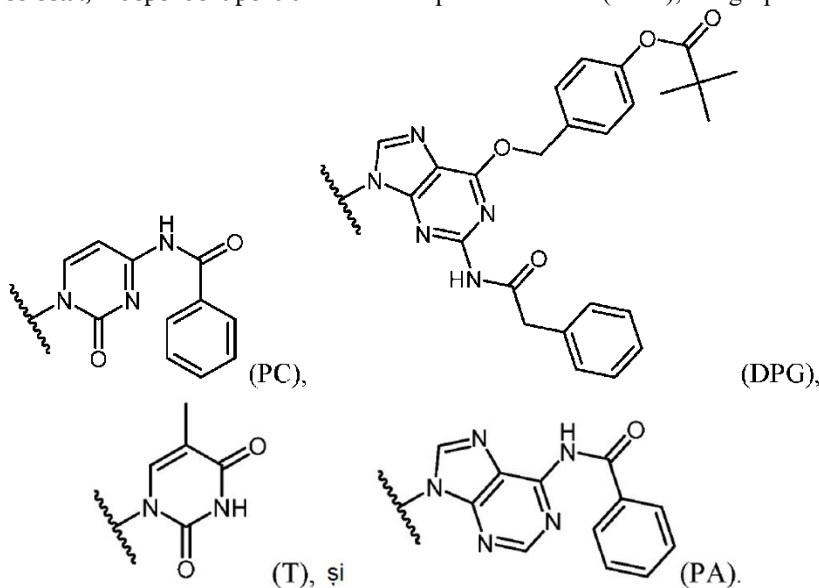
10 Vezi Summerton și colab., *Antisense & Nucleic Acid Drug Dev.* 7:187-195 (1997). Fără a fi legat de vreo teorie specială, stereochemia celor doi atomi de carbon chirali este reținută în condiții sintetice astfel încât un număr de posibili stereoisomeri ai fiecărei subunități morfolino să poată fi produs pe baza selecției, de exemplu, a unui material de pornire alfa-L-ribofuranozil, alf-D-ribofuranozil, beta-L-ribofuranozil sau beta-D-ribofuranozil.

15 De exemplu, în unele exemple de realizare, un compus cu formula (VIII) conform dezvăluirii poate avea formula (VIIIa):



(VIIIa);

în care R^2 este selectat, independent pentru fiecare compus cu formula (VIIIa), din grupul constând din:



Fără a fi legat de vreo teorie particulară, încorporarea a 10 până la 40 de compuși cu formula (VIII), de exemplu, într-un compus oligomeric conform dezvoltării poate avea ca rezultat numeroși stereoizomeri posibili.

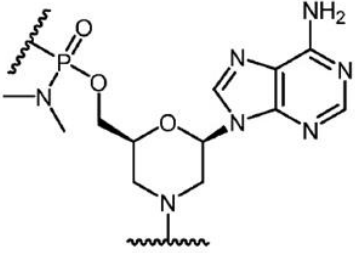
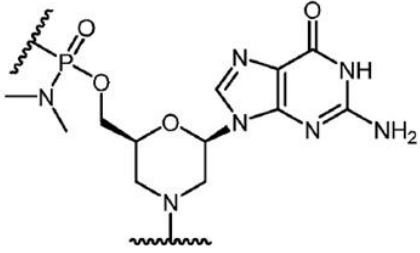
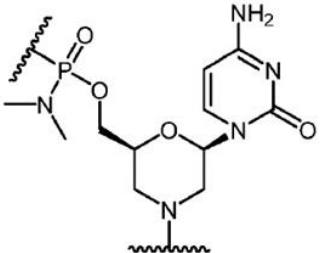
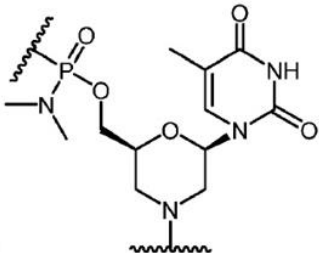
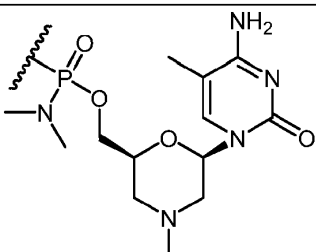
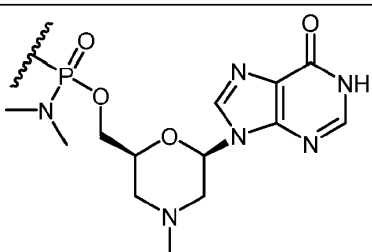
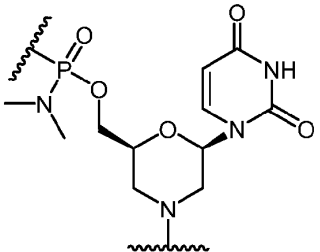
Fără a dori legarea de vreo teorie particulară, compușii oligomerici ai dezvoltării cuprind una sau mai multe intersubunități care conțin fosfor, care creează un centru chiral la fiecare fosfor, fiecare fiind desemnat fie ca o configurație "Sp", fie "Rp", așa cum se înțelege în domeniu. Fără a dori legarea de vreo teorie particulară, această chiralitate creează stereoizomeri, care au o compoziție chimică identică, dar o aranjare tridimensională diferită a atomilor lor.

Fără a dori legarea de vreo teorie particulară, configurația fiecărei legături de intersubunitate fosforoasă are loc aleatoriu în timpul sintezei, de exemplu, a compușilor oligomerici conform dezvoltării. Fără a dori legarea de vreo teorie particulară, procesul de sinteză generează un număr exponențial de mare de stereoizomeri ai unui compus oligomeric conform dezvoltării, deoarece compușii oligomerici conform dezvoltării sunt compuși din numeroase legături de intersubunitate fosforoasă - fiecare legătură de intersubunitate fosforoasă având o configurație chirală aleatorie. În mod specific, fără a dori legarea de vreo teorie particulară, fiecare legătură de intersubunitate a unei subunități morfolino suplimentare dublează numărul de stereoizomeri ai produsului, astfel încât un preparat convențional al unui compus oligomeric conform dezvoltării este de fapt un amestec foarte eterogen de 2^N stereoizomeri, unde N reprezintă numărul de legături de intersubunitate fosforoasă.

Astfel, dacă nu se indică altfel, toți izomerii de acest fel, inclusiv amestecurile diastereomerice și enantiomerice, și enantiomerii și diastereomerii puri sunt incluși, cum ar fi, de exemplu, atunci când una sau mai multe legături de la unul sau mai mulți stereocentri este indicată prin "-" sau "~" sau un echivalent, așa cum se înțelege în domeniu.

Tabelul 1 prezintă diferite exemple de realizare ale subunităților morfolino furnizate în procedeele descrise aici.

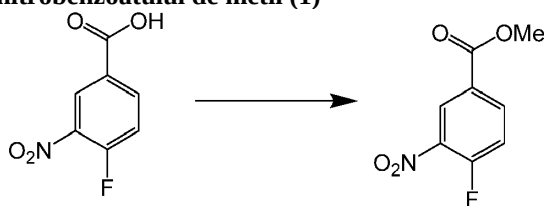
Tabelul 1: Diferite exemple de realizare a subunităților morfolino.

 A =	 G =
 C =	 T =
 5-Me-C =	 I =
 U =	

EXEMPLE

- 5 Exemplele au fost prezentate mai jos în scopul ilustrării și pentru a descrie anumite exemple de realizare specifice ale dezvăluirii. Cu toate acestea, sfera de aplicare a revendicărilor nu trebuie să fie limitată în niciun fel de exemplele prezentate aici. Definițiile variabilelor din structurile din schemele de aici sunt proporționale cu cele ale pozițiilor corespunzătoare din formulele prezentate aici.

10 **Exemplul 1: Sinteza ancorei NCP2**
1. Prepararea 4-fluoro-3-nitrobenzoatului de metil (1)



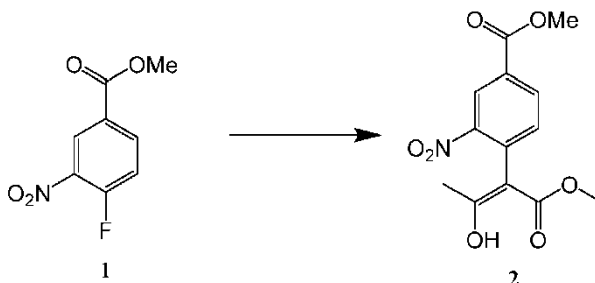
1

- 15 Într-un balon de 100 l s-au încărcat 12,7 kg de acid 4-fluoro-3-nitrobenzoic, s-au adăugat 40 kg de metanol și 2,82 kg de acid sulfuric concentrat. Amestecul a fost agitat la reflux (65°C) timp de 36 ore. Amestecul de reacție a fost răcit la 0°C. S-au format cristale la 38°C. Amestecul a fost menținut la 0°C

5 timp de 4 ore apoi filtrat sub azot. Balonul de 100 l a fost spălat și turta de filtrare a fost spălată cu 10 kg de metanol care a fost răcit la 0° C. Turta de filtrare solidă a fost uscată pe pâlnie timp de 1 oră, transferată în tăvi și uscată într-un cuptor cu vid la temperatura camerei până la o greutate constantă de 13,695 kg de 4-fluor-3-nitrobenzoat de metil (randament 100%; HPLC 99%).

2. Prepararea acidului 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoic

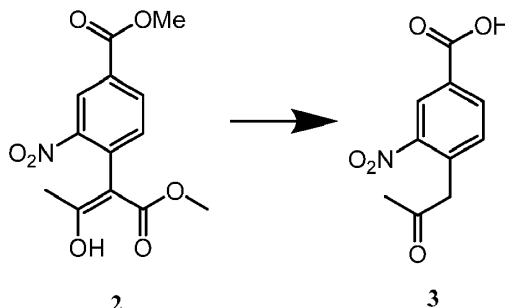
A. 4-(3-Hidroxi-1-metoksi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoat de (Z)-metil (2)



10 Într-un balon de 100 l s-au încărcat 3,98 kg de 4-fluoro-3-nitrobenzoat de metil (1) din etapa anterioară, 9,8 kg de DMF, 2,81 kg de acetoacetat de metil. Amestecul a fost agitat și răcit la 0°C. La acesta s-au adăugat 3,66 kg DBU timp de aproximativ 4 ore, în timp ce temperatura a fost menținută la sau sub 5°C. Amestecul a fost agitat încă 1 oră. În balonul de reacție s-a adăugat o soluție de 8,15 kg de acid citric în 37,5 kg de apă purificată în timp ce temperatura de reacție a fost menținută la sau sub 15°C.

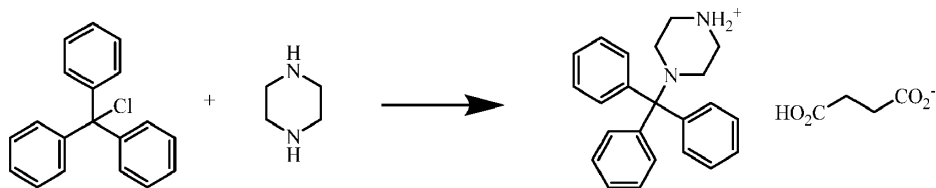
15 După adăugare, amestecul de reacție a fost agitat timp de încă 30 de minute, apoi a fost filtrat sub azot. Turta de filtrare umedă a fost returnată în balonul de 100 l împreună cu 14,8 kg de apă purificată. Suspensia a fost agitată timp de 10 minute apoi filtrată. Turta umedă a fost din nou returnată în balonul de 100 l, amestecată cu 14,8 kg de apă purificată timp de 10 minute și filtrată pentru a obține 4-(3-hidroxi-1-metoksi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoat de (Z)-metil brut.

B. Acid 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoic



25 4-(3-Hidroxi-1-metoksi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoatul de (Z)-metil brut a fost încărcat într-un balon de reacție de 100 l sub azot. La acesta s-au adăugat 14,2 kg de 1,4-dioxan și s-a agitat. La amestec s-a adăugat o soluție de 16,655 kg HCl concentrat și 13,33 kg apă purificată (HCl 6M) timp de 2 ore, în timp ce temperatura amestecului de reacție a fost menținută sub 15°C. Când adăugarea a fost finalizată, amestecul de reacție a fost încălzit la reflux (80°C) timp de 24 ore, răcit la temperatura camerei și filtrat sub azot. Turta de filtrare solidă a fost triturată cu 14,8 kg apă purificată, filtrată, triturată din nou cu 14,8 kg apă purificată și filtrată. Solidul a fost returnat în balonul de 100 l cu 39,9 kg de DCM și refluxat cu agitare timp de 1 oră. S-au adăugat 1,5 kg de apă purificată pentru a dizolva solidele rămase. Stratul organic inferior a fost împărțit într-un balon preîncălzit de 72 l, apoi returnat într-un balon curat uscat de 100 l. Soluția a fost răcită la 0°C, ținută timp de 1 oră, apoi filtrată. Turta de filtrare solidă a fost spălată de câte două ori cu o soluție de 9,8 kg DCM și 5 kg heptan, apoi uscată pe pâlnie. Solidul a fost transferat în tăvi și uscat la o greutate constantă de 1,855 kg acid 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoic. Randament total 42% din compus 1. HPLC 99,45%.

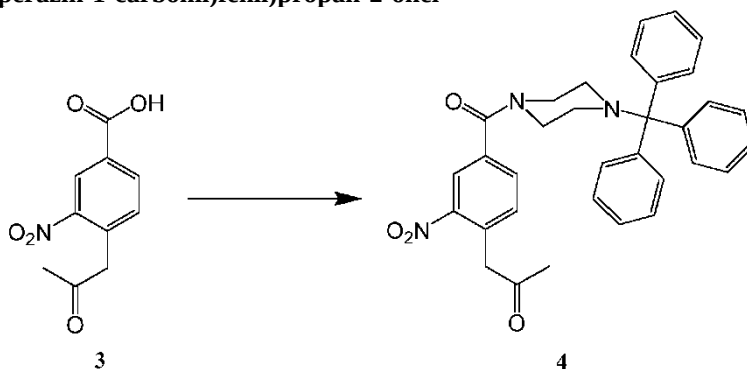
3. Prepararea succinatului de N-tritilpiperazină (NTP)



Într-un balon cu manta de 72 l s-au încărcat sub azot 1,805 kg clorură de trifenilmetil și 8,3 kg toluen (soluție TPC). Amestecul a fost agitat până când solidele s-au dizolvat. Într-un balon de reacție cu manta de 100 l s-au adăugat sub azot 5,61 kg piperazină, 19,9 kg toluen și 3,72 kg metanol. Amestecul a fost agitat și răcit la 0°C. La acesta a fost adăugată încet, în porții, soluția de TPC timp de 4 ore, în timp ce temperatura de reacție a fost menținută la sau sub 10°C. Amestecul a fost agitat timp de 1,5 ore la 10°C, apoi lăsat să se încălzească la 14°C. 32,6 kg de apă purificată au fost încărcate în balonul de 72 l, apoi transferate în balonul de 100 l în timp ce temperatura internă a lotului a fost menținută la 20 +/-5°C. Straturile au fost lăsate să se despartă și stratul apos inferior a fost separat și depozitat. Stratul organic a fost extras de trei ori cu câte 32 kg de apă purificată, iar straturile apoase au fost separate și combinate cu soluția apoasă stocată.

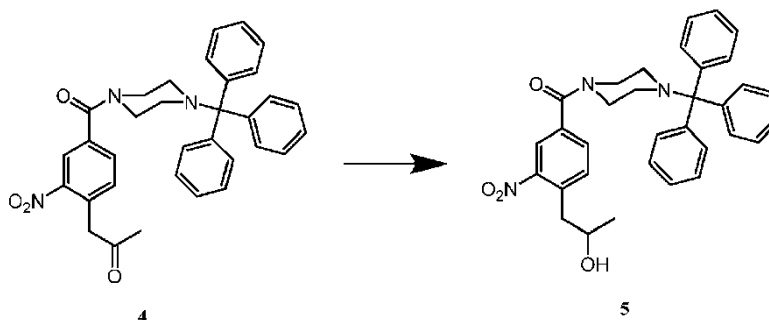
Stratul organic rămas a fost răcit la 18°C și o soluție de 847 g de acid succinic în 10,87 kg de apă purificată a fost adăugată încet, în porții, la stratul organic. Amestecul a fost agitat timp de 1,75 ore la 20 +/-5°C. Amestecul a fost filtrat, iar solidele au fost spălate cu 2 kg de TBME și 2 kg de acetonă, apoi uscate pe pâlnie. Turta de filtrare a fost triturată de două ori cu câte 5,7 kg de acetonă și filtrată și spălată cu 1 kg de acetonă între triturări. Solidul a fost uscat pe pâlnie, apoi transferat în tăvi și uscat într-un cuptor cu vid la temperatura camerei până la o greutate constantă de 2,32 kg de NTP. Randament 80%.

4. Prepararea (4-(2-hidroxiopropil)-3-nitrofenil)(4-tritilpiperazin-1-il)metanonei A. Prepararea 1-(2-nitro-4(4-tritilpiperazin-1-carbonil)fenil)propan-2-onei



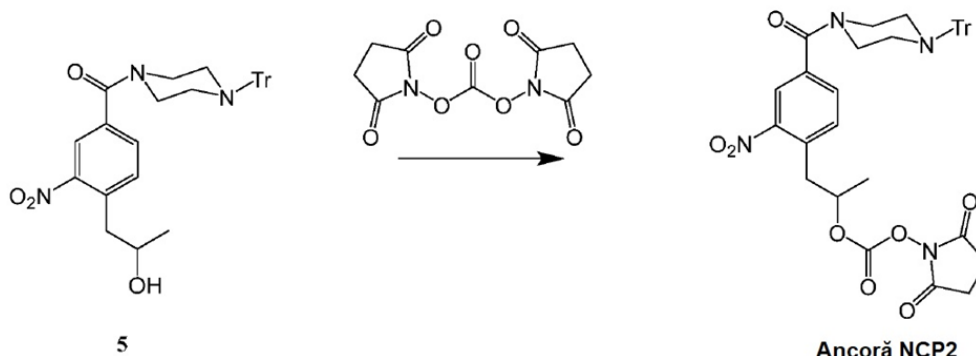
Într-un balon cu manta de 100 l s-au încărcat sub azot 2 kg de acid 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoic (3), 18,3 kg DCM, 1,845 kg clorhidrat de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimidă (EDC HCl). Soluția a fost agitată până când s-a format un amestec omogen. S-au adăugat 3,048 kg de NTP timp de 30 de minute la temperatura camerei și s-au agitat timp de 8 ore. La amestecul de reacție s-au adăugat 5,44 kg de apă purificată și s-au agitat timp de 30 de minute. Straturile au fost lăsate să se separe și stratul organic inferior conținând produsul a fost scurs și depozitat. Stratul apos a fost extras de două ori cu 5,65 kg de DCM. Straturile organice combinate au fost spălate cu o soluție de 1,08 kg clorură de sodiu în 4,08 kg apă purificată. Straturile organice au fost uscate pe 1,068 kg de sulfat de sodiu și filtrate. Sulfatul de sodiu a fost spălat cu 1,3 kg de DCM. Straturile organice combinate au fost suspendate cu 252 g de silicagel și filtrate printr-o pâlnie de filtrare conținând un pat de 252 g de silicagel. Patul de silicagel a fost spălat cu 2 kg de DCM. Straturile organice combinate au fost evaporate pe un evaporator rotativ. La reziduu s-au adăugat 4,8 kg de THF și apoi s-au evaporat pe evaporatorul rotativ până când s-au atins 2,5 volume de 1-(2-nitro-4(4-tritilpiperazin-1-carbonil)fenil)propan-2-onă brută în THF.

B. Prepararea (4-(2-hidroxiopropil)-3-nitrofenil)(4-tritilpiperazin-1-il)metanonei (5)



Într-un balon cu manta de 100 l s-au încărcat sub azot 3600 g de 4 din etapa anterioară și 9800 g de THF. Soluția agitată a fost răcită la $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Soluția a fost diluată cu 11525 g etanol și s-au adăugat 194 g de borohidru de sodiu timp de aproximativ 2 ore la $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Amestecul de reacție a fost agitat încă 2 ore la $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Reacția a fost stinsă cu o soluție de aproximativ 1,1 kg clorură de amoniu în aproximativ 3 kg de apă prin adăugare lentă pentru a menține temperatura la $\leq 10^{\circ}\text{C}$. Amestecul de reacție a fost agitat încă 30 de minute, filtrat pentru a îndepărta substanțele anorganice și reîncărcat într-un balon cu manta de 100 l și extras cu 23 kg de DCM. Stratul organic a fost separat și soluția apoasă a fost extrasă de încă două ori cu câte 4,7 kg de DCM. Straturile organice combinate au fost spălate cu o soluție de aproximativ 800 g de clorură de sodiu în aproximativ 3 kg de apă, apoi uscate pe 2,7 kg de sulfat de sodiu. Suspensia a fost filtrată și turta de filtrare a fost spălată cu 2 kg de DCM. Filtratele combinate au fost concentrate la 2,0 volume, diluate cu aproximativ 360 g de acetat de etil și evaporate. Produsul brut a fost încărcat pe o coloană de silicagel de 4 kg de silice umplut cu DCM sub azot și eluat cu 2,3 kg acetat de etil în 7,2 kg DCM. Frațiunile combinate au fost evaporate și reziduul a fost preluat în 11,7 kg de toluen. Soluția de toluen a fost filtrată și turta de filtrare a fost spălată de două ori cu câte 2 kg de toluen. Turta de filtrare a fost uscată la o greutate constantă de 2,275 kg de compus 5 (randament de 46% din compus 3) HPLC 96,99%.

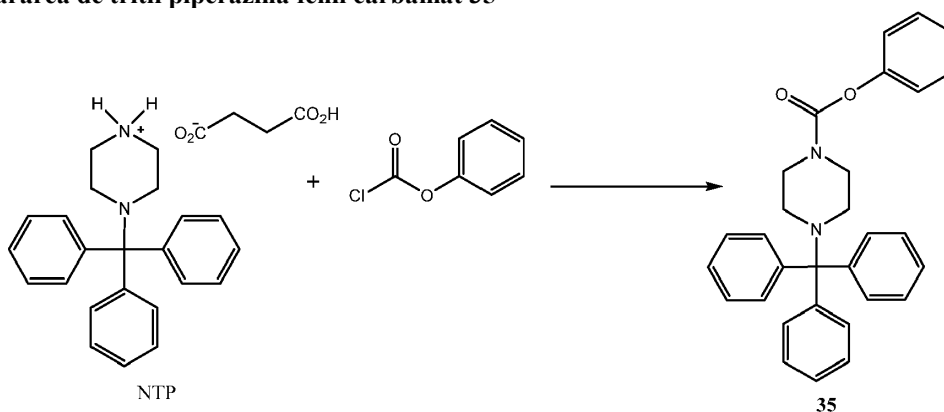
5. Prepararea carbonatului de 2,5-dioxopirolidin-1-il(1-(2-nitro-4-(4-trifenilmetilpiperazin-1-carbonil)fenil)propan-2-il) (Ancoră NCP2)



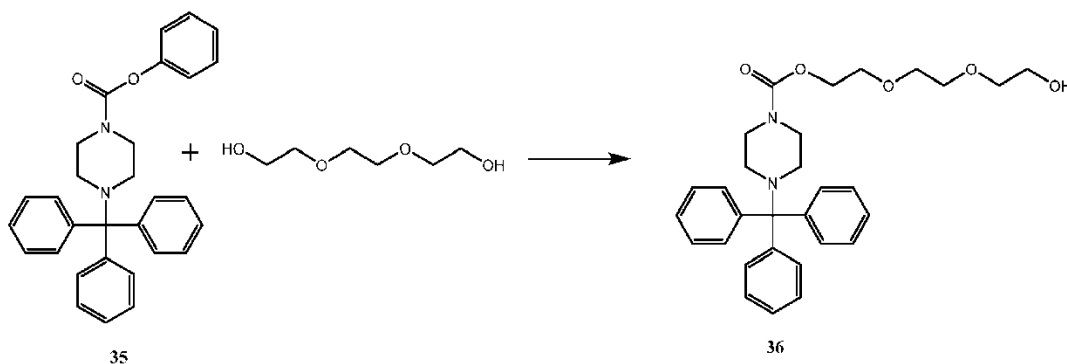
Într-un balon cu manta de 100 l s-au încărcat sub azot 4,3 kg de compus 5 (greutate ajustată pe baza toluenului rezidual prin H^1 RMN; ulterior, toți reactivii au fost scalați corespunzător) și 12,7 kg de piridină. Pentru aceasta au fost încărcate 3,160 kg de DSC (78,91 % în greutate prin H^1 RMN) în timp ce temperatura internă a fost menținută la $\leq 35^{\circ}\text{C}$. Amestecul de reacție a fost maturat timp de aproximativ 22 de ore la ambianță, apoi a fost filtrat. Turta de filtrare a fost spălată cu 200 g de piridină. În două loturi, fiecare cuprinzând $\frac{1}{2}$ din volumul filtratului, apa de spălare a filtratului s-a încărcat lent într-un balon cu manta de 100 l conținând o soluție de aproximativ 11 kg de acid citric în aproximativ 50 kg de apă și s-a agitat timp de 30 de minute pentru a permite precipitarea solidă. Solidul a fost colectat cu o pâlnie de filtrare, spălat de două ori cu 4,3 kg de apă per spălare și uscat pe pâlnia de filtrare sub vid. Solidele combinate au fost încărcate într-un balon cu manta de 100 l și dizolvate în 28 kg de DCM și spălate cu o soluție de 900 g de carbonat de potasiu în 4,3 kg de apă. După 1 oră, straturile au fost lăsate să se separe și stratul apos a fost îndepărtat. Stratul organic a fost spălat cu 10 kg de apă, separat și uscat pe 3,5 kg de sulfat de sodiu. DCM a fost filtrat, evaporat și uscat sub vid la 6,16 kg de ancoră NCP2 (randament 114%).

Exemplul 2: Sinteza rășinii încărcate cu ancoră

Într-un reactor de sinteză în fază solidă de 75 l cu un robinet cu trei căi din teflon s-au încărcat aproximativ 52 l de NMP și 2300 g de rășină de aminometil polistiren. Rășina a fost agitată în NMP pentru a se umfla timp de aproximativ 2 ore, apoi a fost scursă. Rășina a fost spălată de două ori cu aproximativ 4 l DCM per spălare, apoi de două ori cu 39 l soluție de neutralizare per spălare, apoi de două ori cu 39 l de DCM per spălare. Soluția de ancoră NCP2 a fost adăugată lent la soluția de rășină cu agitare, agitată timp de 24 de ore la temperatura camerei și scursă. Rășina a fost spălată de patru ori cu 39 l de NMP per spălare și de șase ori cu 39 l de DCM per spălare. Rășina a fost tratată și agitată cu ½ soluție de capsulare DEDC timp de 30 de minute, scursă și a fost tratată și agitată cu a doua ½ din soluția de capsulare DEDC timp de 30 de minute și scursă. Rășina a fost spălată de șase ori cu 39 l de DCM per spălare apoi uscată într-un cuptor până la o greutate constantă de 3573,71 g de rășină încărcată cu ancoră.

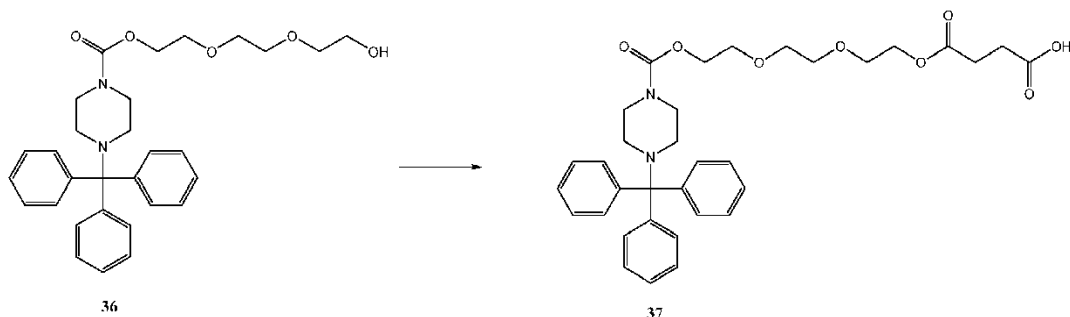
Exemplul 3: Prepararea cozii EG3 activate (vezi FIG. [2])**1. Prepararea de tritil piperazină fenil carbamat 35**

La o suspensie răcită de NTP în diclormetan (6 ml/g NTP) s-a adăugat o soluție de carbonat de potasiu (3,2 echiv.) în apă (4 ml/g carbonat de potasiu). La acest amestec în două faze s-a adăugat încet o soluție de cloroformiat de fenil (1,03 echiv.) în diclormetan (2 g/g cloroformiat de fenil). Amestecul de reacție a fost încălzit la 20°C. După terminarea reacției (1-2 ore), straturile au fost separate. Stratul organic a fost spălat cu apă și uscat pe carbonat de potasiu anhidru. Produsul 35 a fost izolat prin cristalizare din acetonitril. Randament=80%

2. Prepararea alcoolului carbamat 36

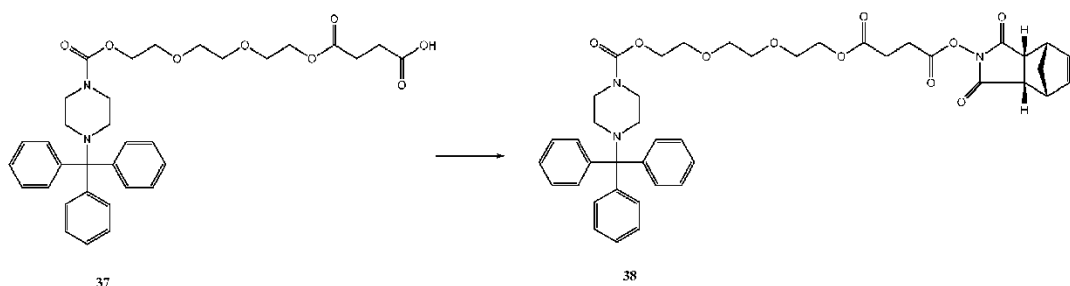
Hidrura de sodiu (1,2 echiv.) a fost suspendată în 1-metil-2-pirolidinonă (32 ml/g hidrură de sodiu). La această suspensie s-au adăugat trietilenglicol (10,0 echiv.) și compusul 35 (1,0 echiv.). Suspensia rezultată a fost încălzită la 95°C. După terminarea reacției (1-2 ore), amestecul a fost răcit la 20°C. La acest amestec s-au adăugat 30% diclormetan/metil terț-butil eter (v:v) și apă. Stratul organic conținând produsul a fost spălat succesiv cu NaOH apos, acid succinic apos și clorură de sodiu apoasă saturată. Produsul 36 a fost izolat prin cristalizare din diclormetan/metil terț-butil eter/heptan. Randament=90%.

3. Prepararea acidului coadă EG3 37



La o soluție de compus 36 în tetrahidrofuran (7 ml/g 36) s-au adăugat anhidridă succinică (2,0 echiv.) și DMAP (0,5 echiv.). Amestecul a fost încălzit la 50°C. După terminarea reacției (5 ore), amestecul a fost răcit la 20°C și ajustat la pH 8,5 cu NaHCO₃ apos. S-a adăugat metil terț-butil eter și produsul a fost extras în stratul apos. S-a adăugat diclormetan și amestecul a fost ajustat la pH 3 cu acid citric apos. Stratul organic conținând produsul a fost spălat cu un amestec de tampon citrat pH=3 și clorură de sodiu apoasă saturată. Această soluție de diclormetan a 37 a fost utilizată fără izolare la prepararea compusului 38.

4. Prepararea cozii EG3 activate 38



La soluția de compus 37 s-au adăugat imida acidului N-hidroxi-5-norbornen-2,3-dicarboxilic (HONB) (1,02 echiv.), 4-dimetilaminopiridină (DMAP) (0,34 echiv.) și apoi clorhidrat de 1-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimidă (EDC) (1,1 echiv.). Amestecul a fost încălzit la 55°C. După terminarea reacției (4-5 ore), amestecul a fost răcit la 20°C și spălat succesiv cu 1: 1 0,2 M acid citric/saramură și saramură. Soluția de diclormetan a suferit un schimb de solvent în acetonă și apoi în N,N-dimetilformamidă, iar produsul a fost izolat prin precipitare din acetonă/N,N-dimetilformamidă în clorură de sodiu apoasă saturată. Produsul brut a fost resuspendat de câteva ori în apă pentru a îndepărta N,N-dimetilformamida reziduală și sărurile. Randament = 70% coadă EG3 activată 38 din compusul 36.

Exemplul 4: 50L Sinteză în fază solidă a

Eteplirsenui [Compus oligomeric (XII)] Substanță medicamentoasă brută

1. Materiale

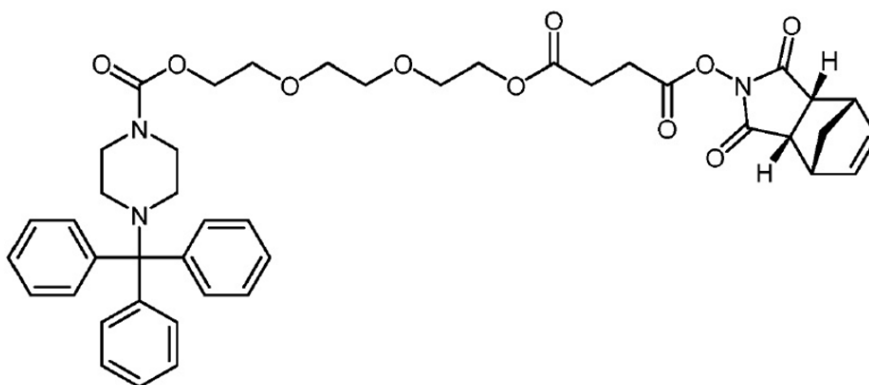
Tabelul 2: Materiale de pornire

Denumire material	Denumire chimică	Număr CAS	Formulă chimică	Greutate moleculară
Subunitate activată A	Acid fosforamidocloridic, ester de N,N-dimetil-, [6-[6-(benzoilamino)-9H-purin-9-il]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metil	1155373-30-0	C ₃₈ H ₃₇ ClN ₇ O ₄ P	722,2
Subunitate activată C	Acid fosforamidocloridic, ester de N,N-dimetil-, [6-[4-(benzoilamino)-2-oxo-1(2H)-pirimidinil]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metil	1155373-31-1	C ₃₇ H ₃₇ ClN ₅ O ₅ P	698,2

Denumire material	Denumire chimică	Număr CAS	Formulă chimică	Greutate moleculară
Subunitate DPG activată	Acid propanoic, ester de 2,2-dimetil-4-[[[9-[6-[[[cloro(dimetilamino)fosfinil]oxi]metil]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]-2-[(2-fenilacetil)amino]-9H-purin-6-il]oxi]metil]fenil	1155309-89-9	$C_{51}H_{53}ClN_7O_7P$	942,2
Subunitate activată	T Acid fosforamidocloridic, ester de N,N-dimetil-, [6-(3,4-dihidro-5-metil-2,4-dioxo-1(2H)-pirimidinil)]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metil	1155373-34-4	$C_{31}H_{34}ClN_4O_5P$	609,1
Coadă activată	EG3 Acid butandioic, ester de 1-[3aR,4S,7R,7aS)-1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-1,3-dioxo-4,7-metano-2H-izoindol-2-il]4-[2-[2-[2-[[[4-(trifenilmetil)-1-piperazinil]carbonil]oxi]etoxi]etoxi]etil]	1380600-06-5	$C_{43}H_{47}N_3O_{10}$	765,9

Structuri chimice ale materialelor de pornire:

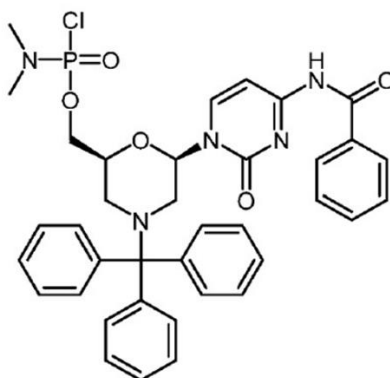
A. Coadă EG3 activată



Compus (B)

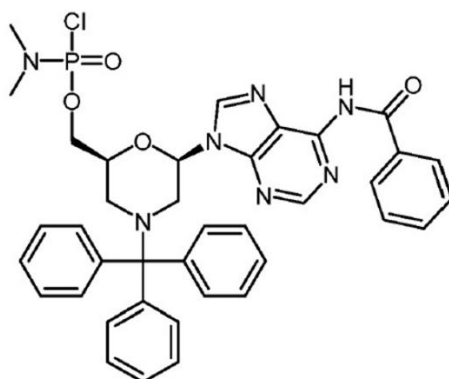
5

B. Subunitate C activată (pentru preparare, vezi brev. SUA nr. 8.067.571)



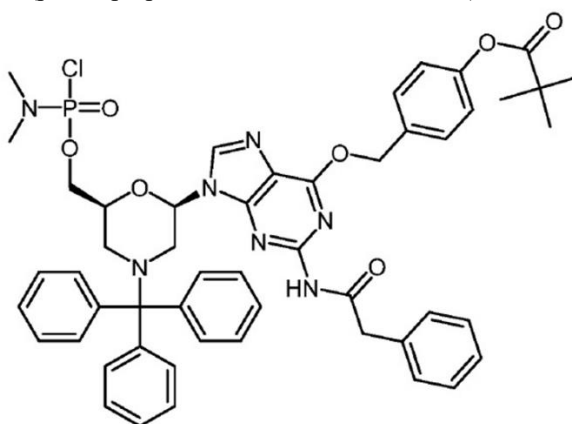
Compus (C1)

C. Subunitate A activată (pentru preparare, vezi brev. SUA nr. 8.067.571)



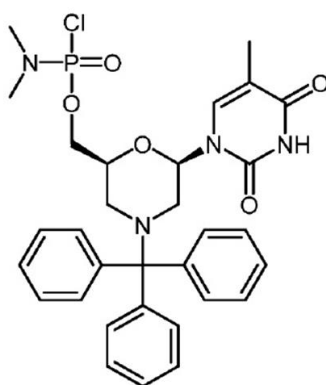
Compus (D1)

D. Subunitate DPG activată (pentru preparare, vezi WO 2009/064471)



Compus (E1)

E. Subunitate T activată (pentru preparare, vezi WO 2013/082551)

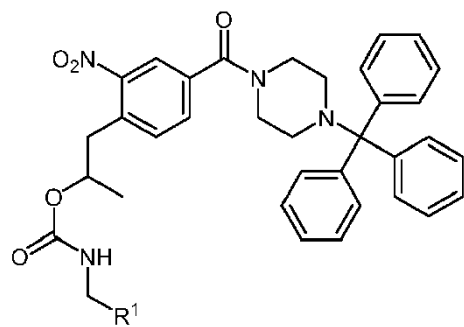


Compus (F1)

5

F. Rășină încărcată cu ancoră

75



Formula (I)

în care R¹ este un mediu-suport.

Tabelul 3: Descrierea soluțiilor pentru sinteza oligomerului în fază solidă a substanței medicamentoase brute Eteplirsen

Denumirea soluției	Compoziția soluției
Soluție ancoră NCP2	Ancoră 37,5 l NMP și 1292 g NCP2
Soluție de capsulare DEDC	4,16 l dietil dicarbonat (DEDC), 3,64 l NEM și 33,8 l DCM
Soluție CYTFA	2,02 kg 4-cianopiridină, 158 l DCM, 1,42 l TFA, 39 l TFE, și 2 l apă purificată
Soluție de neutralizare	35,3 l IPA, 7,5 l DIPEA și 106,5 l DCM
Soluție de clivare	1.530,04 g DTT, 6,96 l NMP și 2,98 l DBU

2. Sinteza substanței medicamentoase brute Eteplirsen

A. Umflarea rășinii

750 g de rășină încărcată cu ancoră și 10,5 l de NMP au fost încărcate într-un reactor silanizat de 50 l și agitate timp de 3 ore. NMP a fost scurs și rășina încărcată cu ancoră a fost spălată de două ori cu câte 5,5 l de DCM și de două ori cu câte 5,5 l de 30% TFE/DCM.

B. Ciclu 0: Cuplarea cozii EG3

Rășina încărcată cu ancoră a fost spălată de trei ori cu câte 5,5 l de 30% TFE/DCM și scursă, spălată cu 5,5 l de soluție CYTFA timp de 15 minute și scursă și spălată din nou cu 5,5 l de soluție CYTFA timp de 15 minute fără scurgere la care s-au încărcat 122 ml de NEM/DCM 1:1 și suspensia a fost agitată timp de 2 minute și scursă. Rășina a fost spălată de două ori cu 5,5 l de soluție de neutralizare timp de 5 minute și scursă, apoi de două ori cu câte 5,5 l de DCM și scursă. O soluție de 706,2 g de coadă EG3 activată (MW 765,85) și 234 ml de NEM în 3 l de DMI a fost încărcată în rășină și agitată timp de 3 ore la temperatura camerei și scursă. Rășina a fost spălată de două ori cu câte 5,5 l de soluție de neutralizare timp de 5 minute per fiecare spălare și o dată cu 5,5 l de DCM și a fost scursă. O soluție de 374,8 g de anhidridă benzoică și 195 ml NEM în 2680 ml NMP a fost încărcată și agitată timp de 15 minute și scursă. Rășina a fost agitată cu 5,5 l de soluție de neutralizare timp de 5 minute, apoi a fost spălată o dată cu 5,5 l de DCM și de două ori cu câte 5,5 l de 30% TFE/DCM. Rășina a fost suspendată în 5,5 l de 30% TFE/DCM și menținută timp de 14 ore.

C. Cicluri de cuplare a subunității 1-30

i. Tratamente pre-cuplare

Înainte de fiecare ciclu de cuplare, așa cum este descris în Tabelul 4, rășina a fost: 1) spălată cu 30% TFE/DCM; 2) a) tratată cu soluție CYTFA 15 minute și scursă, și b) tratată cu soluție CYTFA timp de 15 minute la care s-a adăugat 1: 1 NEM/DCM, s-a agitat și s-a scurs; 3) s-a agitat de trei ori cu soluție de neutralizare; și 4) s-a spălat de două ori cu DCM. Vezi tabelul 4.

ii. Tratamente post-cuplare

După ce fiecare soluție de subunitate a fost scursă așa cum este descris în Tabelul 4, rășina a fost: 1) spălată cu DCM; și 2) spălată de două ori cu 30% TFE/DCM. Dacă rășina a fost menținută pentru o perioadă de timp înainte de următorul ciclu de cuplare, a doua soluție de spălare TFE/DCM nu a fost scursă și rășina a fost reținută în respectiva soluție de spălare TFE/DCM. Vezi tabelul 4.

5

iii. Cicluri de cuplare a subunității activate

Ciclurile de cuplare au fost efectuate așa cum este descris în Tabelul 4.

iv. Spălare IPA finală

10

După ce etapa finală de cuplare a fost efectuată așa cum este descris în Tabelul 4, rășina a fost spălată de 8 ori cu câte 19,5 l de IPA și uscată sub vid la temperatura camerei timp de aproximativ 63,5 ore până la o greutate uscată de 5.579,8 g.

C. Clivare

15

Substanța medicamentoasă brută Eteplirsén legată de rășină de mai sus a fost împărțită în două loturi, fiecare lot a fost tratat după cum urmează. Un lot de 2.789,9 g de rășină a fost: 1) agitat cu 10 l de NMP timp de 2 ore, apoi NMP a fost scurs; 2) spălat de trei ori cu câte 10 l de 30% TFE/DCM; 3) tratat cu 10 l soluție CYTFA timp de 15 minute; și 4) 10 l de soluție CYTFA timp de 15 minute la care s-au adăugat apoi 130 ml NEM/DCM 1:1 și s-au agitat timp de 2 minute și s-au scurs. Rășina a fost tratată de trei ori cu câte 10 l de soluție de neutralizare, spălată de șase ori cu 10 l de DCM și de opt ori cu câte 10 l de NMP. Rășina a fost tratată cu o soluție de clivare de 1530,4 g DTT și 2980 DBU în 6,96 l NMP timp de 2 ore pentru a detașa substanța medicamentoasă brută Eteplirsén din rășină. Soluția de clivare a fost scursă și reținută într-un vas separat. Reactorul și rășina au fost spălate cu 4,97 l de NMP care a fost combinat cu soluția de clivare.

20

Tabelul 4:

Ciclu nr.: subunitate (SU)	Tratament pre-cuplare				Ciclu cuplare		Tratament post-cuplare	
	1	2	3	4			1	2
	Spălare 30% TFE/DCM	Soluție CYTFA 1	Soluție de neutralizare	Spălare DCM	Cantitate SU (g) NEM (L) DMI (L)	Timp cuplare RT (ore)	Spălare DCM	Spălare 30% TFE/DCM
1:C	5.5L	a) 5,5L b) 5.5L, 122ml	3x5.5L	5.5L	536.7g; 195 ml NEM; 3.2L DMI	5	5.5L	2x5.5L
2:T	7.0L	a) 7L b) 7L, 158ml	3x7L	2x7L	468.2g și 195ml NEM 3.2L DMI	4.25	7L	2x7L ²
3:C	8L	a) 8L b) 8L, 182ml	3x8L	2x8L	536.7g; 195ml NEM; 3.4L DMI	4.25	8L	2x8L
4:C	9L	a) 9L b) 9L, 206ml	3x9L	2x9L	536.7g; 195ml NEM; 3.6L DMI	4.25	9L	2x9L ³
5:A	9.5L	a) 9.5L b) 9.5L, 220ml	3x9.5L	2x9.5 L	555.2g; 195ml NEM; 3.4L DMI	4.25	9.5L	2x9.5L
6:A	10L	a) 10L b) 10L, 232ml	3x10L	2x10 L	555.2g; 195ml NEM; 3.45L DMI	4.25	10L	2x10L ⁴

¹ ml indică cantitatea de NEM/DCM 1:1² Rășină ținută la această etapă timp de ½ zi³ Rășină ținută la această etapă timp de ½ zi⁴ Rășină ținută la această etapă timp de 0,4 zile

Tabelul 4 cont.

Ciclu nr.: subunitate (SU)	Tratament pre-cuplare				Ciclu cuplare		Tratament post-cuplare	
	1	2	3	4			1	2
	Spălare 30% TFE/DCM	Soluție CYTFA	Soluție de neutralizare	Spălare DCM	Cantitate SU (g) NEM (L) DMI (L)	Timp cuplare RT (ore)	Spălar e DCM	Spălare 30% TFE/DCM
7:C	11L	a) 11L b) 11L, 256ml	3x11L	2x11 L	536.7g; 195ml NEM; 3.57L DMI	4.25	11L	2x11L
8:A	11L	a) 11L b) 11L, 256ml	3x11L	2x11 L	555.2g; 195ml NEM; 3.64L DMI	4.25	11L	2x11L ⁵
9:T	11.5L	a) 11.5L b) 11.5L 268ml	3x11.5L	2x 11.5L	468.2g; 195ml NEM; 3.72L DMI	4.25	11.5 L	2x11.5L
10:C	12L	a) 12L b) 12L, 280ml	3x12L	2x12 L	536.7g; 195ml NEM; 3.96L DMI	4.25	12L	2x12L ⁶
11:A	13.5L	a) 13.5L b) 13.5L, 204ml	3x13.5L	2x 13.5L	721.7g; 253ml NEM; 4.02L DMI	4.25	13.5 L	2x13.5L
12:A	13.5L	a) 13.5L b) 13.5L, 204ml	3x13.5L	2x 13.5L	721.7g; 253ml NEM; 4.02L DMI	4.25	13.5 L	2x13.5L ⁷

⁵ Rășină ținută la această etapă timp de 2,5 zile

⁶ Rășină ținută la această etapă timp de ½ zi

⁷ Rășină ținută la această etapă timp de 0,4 zile

Tabelul 4 cont.

Ciclu nr.: subunitate (SU)	Tratament pre-cuplare				Ciclu cuplare		Tratament post-cuplare	
	1	2	3	4			1	2
	Spălare 30% TFE/DCM	Soluție CYTFA	Soluție de neutralizare	Spălare DCM	Cantitate SU (g) NEM (L) DMI (L)	Timp cuplare RT (ore)	Spălar e DCM	Spălare 30% TFE/DCM
13:DP G	14L	a) 14L b) 14L, 216ml	3x14L	2x14 L	941.9g; 253ml NEM; 4.02L DMI	4.25	14L	2x14L
14:DP G	14.5L	a) 14.5L b) 14.5L, 228ml	3x14.5L	2x 14.5L	941.9g; 253ml NEM; 4.1L DMI	4.25	14.5 L	2x14.5L ⁸
15:A	15.5L	a) 15.5L b) 15.5L, 254ml	3x15.5L	2x 15.5L	721.7g; 253ml NEM; 4.26L DMI	4.25	15.5 L	2x15.5L
16:A	15.5L	a) 15.5L b) 15.5L, 254ml	3x15.5L	2x 15.5L	721.7g; 253ml NEM; 4.26L DMI	4.25	15.5 L	2x15.5L ⁹
17:DP G	16L	a) 16L b) 16L, 366ml	3x16L	2x16 L	941.9g; 253ml NEM; 4.4L DMI	4.75	16L	2x16L
18:A	16.5L	a) 16.5L b) 16.5L, 378ml	3x16.5L	2x 16.5L	721.7g; 253ml NEM; 4.4L DMI	4.25	16.5 L	2x16.5L ¹⁰

⁸ Rășină ținută la această etapă timp de 0,4 zile⁹ Rășină ținută la această etapă timp de 0,4 zile¹⁰ Rășină ținută la această etapă timp de 1,5 zile

Tabelul 4 cont.

Ciclu nr.: subunitate (SU)	Tratament pre-cuplare				Ciclu cuplare		Tratament post-cuplare	
	1	2	3	4			1	2
	Spălare 30% TFE/DCM	Soluție CYTFA	Soluție de neutralizare	Spălare DCM	Cantitate SU (g) NEM (L) DMI (L)	Timp cuplare RT (ore)	Spălare DCM	Spălare 30% TFE/ DCM
19:T	16.5L	a) 16.5L b) 16.5L, 378ml	3x16.5L	2x 16.5L	608.7g; 253ml NEM; 4.57L DMI	4.25	16.5L	2x16.5 L
20:DPG	17L	a) 17L b) 17L, 390ml	3x17L	2x17L	941.9g; 253ml NEM; 4.57L DMI	4.75	17L	2x17L ¹¹
21:DPG	17L	a) 17L b) 17L, 390ml	3x17L	2x17L	1159.2g ; 311ml NEM; 4.72L DMI	4.25	17L	2x17L
22:C	17.5L	a) 17.5L b) 17.5L, 402ml	3x17.5L	2x 17.5L	858.7g; 311ml NEM; 4.72L DMI	4.75	17.5L	2x17.5 L ¹²
23:A	17.5L	a) 17.5L b) 17.5L, 402ml	3x17.5L	2x 17.5L	888.3g; 311ml NEM; 4.88L DMI	4.25	17.5L	2x17.5 L
24:T	18L	a) 18L b) 18L, 414ml	3x18L	2x18L	749.1g; 311ml NEM; 4.95L DMI	4.25	18L	2x18L ¹³

¹¹ Rășină ținută la această etapă timp de 0,3 zile¹² Rășină ținută la această etapă timp de 0,4 zile¹³ Rășină ținută la această etapă timp de 0,4 zile

Tabelul 4 cont.

Ciclu nr.: subunitate (SU)	Tratament pre-cuplare				Ciclu cuplare		Tratament post-cuplare	
	1	2	3	4			1	2
	Spălare 30% TFE/DCM	Soluție CYTFA	Soluție de neutralizare	Spălare DCM	Cantitate SU (g) NEM (L) DMI (L)	Timp de cuplare RT (ore)	Spălar e DCM	Spălare 30% TFE/ DCM
25:T	18L	a) 18L b) 18L, 414ml	3x18L	2x18L	749.1g; 311ml NEM; 5.1L DMI	4.25	18L	2x18L
26:T	18.5L	a) 18.5L b) 18.5L, 426ml	3x18.5L	2x 18. 5L	749.1g; 311ml NEM; 5.1L DMI	4.25	18.5 L	2x18.5L ¹⁴
27:C	18.5L	a) 18.5L b) 18.5L, 426ml	3x18.5L	2x 18. 5L	858.7g; 311ml NEM; 5.25L DMI	4.25	18.5 L	2x18.5L
28:T	19L	a) 19L b) 19L, 438ml	3x19L	2x1 9L	749.1g; 311ml NEM; 5.25L DMI	4.25	19L	2x19L ¹⁵
29:A	19L	a) 19L b) 19L, 438ml	3x19L	2x1 9L	888.3g; 311ml NEM; 5.41L DMI	4.25	19L	2x19L
30:DPG	19.5L	a) 19.5L b) 19.5L, 450ml	3x19.5L	2x 19. 5L	1159.2g ; 311ml NEM; 5.44L DMI	4.75	19.5 L	2x19.5L

¹⁴ Rășină ținută la această etapă timp de 0,4 zile

¹⁵ Rășină ținută la această etapă timp de 0,3 zile

D. Deprotejare

- 5 Soluția de clivare combinată și soluția de spălare NMP au fost transferate într-un vas sub presiune la care s-au adăugat 39,8 l de NH_4OH ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) care a fost răcit la o temperatură de -10° până la -25°C într-un răcitor. Vasul sub presiune a fost sigilat și încălzit la 45°C timp de 16 ore, apoi lăsat să se răcească la 25°C . Această soluție de deprotejare conținând substanța medicamentoasă brută Eteplirsen a fost diluată 3:1 cu apă purificată și pH-ul ajustat la 3,0 cu acid fosforic 2M, apoi la pH 8,03 cu NH_4OH .
- 10 HPLC (C18) 73-74% (figura 1).

Tabelul 5. Date din figura 1

Vârf nr.	Denumire compus	Timp retenție (min)	Timp ret. rel. Produs	Suprafață {mAu*min)	Supraf. rel. %	Plăci (USP)
1		2,488	0,381	0,821928	0,18	1105
2		3,047	0,467	17,661449	3,91	4047
3		3,324	0,509	0,818258	0,18	n.a.
4		3,605	0,552	0,465598	0,10	7
5		4,213	0,645	6,558899	1,45	301
6		4,504	0,690	3,324238	0,74	191690
7		5,160	0,790	5,644073	1,25	651
8	AVI-4658	6,531	1,000	332,238891	73,47	2313
9		7,269	1,113	2,063159	0,46	n.a.
10		7,643	1,170	5,556411	1,23	2734
11		8,139	1,246	8,711530	1,93	3572
12		8,382	1,283	4,654783	1,03	1835
13		8,678	1,329	0,562426	0,12	n.a.
14		9,009	1,379	12,031923	2,66	6078
15		9,500	1,455	0,385563	0,09	n.a.
16		9,626	1,474	1,171507	0,26	46084
17		9,898	1,516	0,484362	0,11	21328
18		10,598	1,623	14,589918	3,23	n.a.
19		10,680	1,635	7,520577	1,66	918
20		10,811	1,656	8,604558	1,90	296
21		11,045	1,691	18,351689	4,06	49919

Exemplul 5: Purificarea substanței medicamentoase brute Eteplirsen

Soluția de deprotejare din Exemplul 2, partea D, conținând substanța medicamentoasă brută Eteplirsen a fost încărcată pe o coloană de rășină schimbătoare de anioni ToyoPearl Super-Q 650S (Tosoh Bioscience) și eluată cu un gradient de 0-35% B pe 17 volum de coloană (Tampon A: 10 mM hidroxid de sodiu; Tampon B: 1 M clorură de sodiu în 10 mM hidroxid de sodiu) și fracțiunile de puritate acceptabilă (C18 și SCX HPLC) au fost reunite într-o soluție purificată de produs medicamentos. HPLC (Figura 2): 97,74% (C18) 94,58% (SCX).

Soluția de substanță medicamentoasă purificată a fost desărată și liofilizată la 1959 g de substanță medicamentoasă Eteplirsen purificată. Randament 61,4%; HPLC (Figura 3): 97,7% (C18) 94,6% (SCX).

Tabelul 6. Date din figura 2

Vârf nr.	Denumire compus	Timp retenție (min)	Timp ret. rel. (Produs)	Suprafață {mAu*min)	Procent suprafață	Plăci (USP)
1		6,837	0,750	0,050757	0,058	41574
2		7,405	0,813	0,303271	0,344	841
3		8,086	0,887	1,130007	1,280	13
4		8,615	0,946	2,265128	2,567	761
5	AVI-4658	9,111	1,000	83,468700	94,583	4405
6		10,019	1,100	0,704599	0,798	n.a.

Vârf nr.	Denumire compus	Timp retenție (min)	Timp ret. rel. (Produs)	Suprafață {mAu*min}	Procent suprafață	Plăci (USP)
7		11,069	1,215	0,326550	0,370	3044

Tabelul 7. Date din figura 3

Vârf nr.	Denumire compus	Timp retenție (min)	Timp ret. rel. (Produs)	Suprafață {mAu*min}	Procent suprafață	Plăci (USP)
1		6,866	0,751	0,044399	0,063	608
2		7,794	0,852	0,280589	0,397	n.a.
3		8,188	0,895	0,816793	1,156	209
4		8,644	0,945	1,842896	2,608	1147
5	AVI-4658	9,145	1,000	66,857088	94,622	4664
6		10,058	1,100	0,575793	0,815	n.a.
7		11,103	1,214	0,239454	0,339	4375

Tabelul 8. Acronime

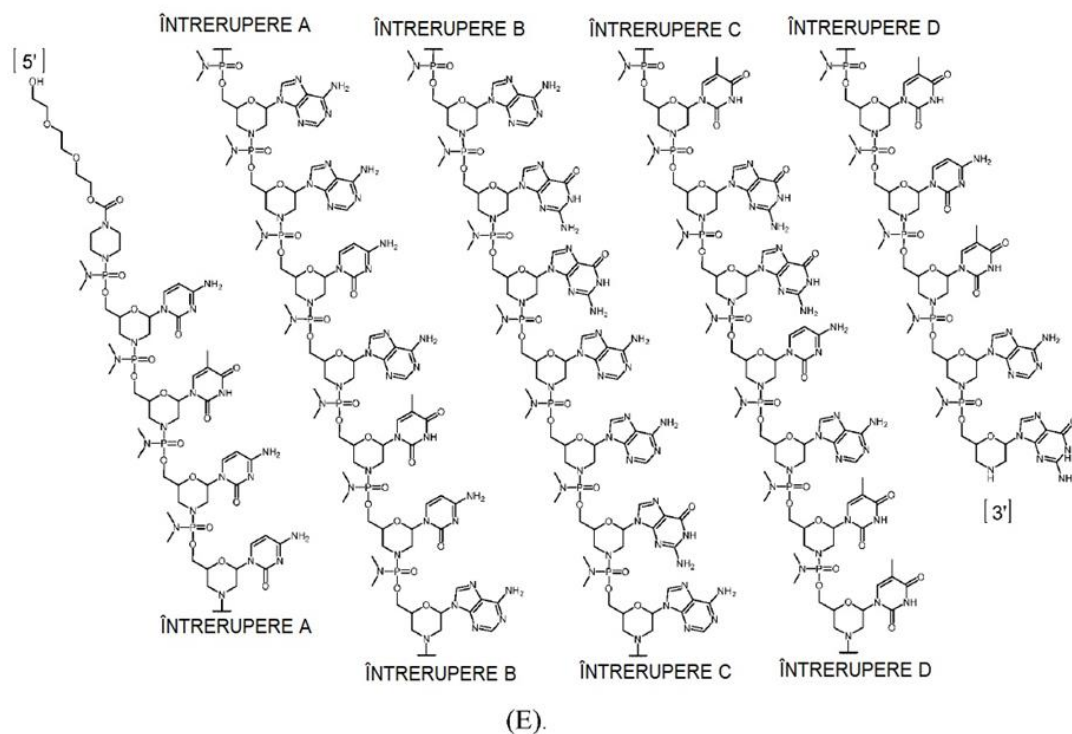
Acronim	Denumire
DBU	1,8-Diazabicycloundec-7-enă
DCM	Diclorometan
DIPEA	N,N-Diizopropiletilamină
DMI	1,3-Dimetil-2-imidazolidinonă
DTT	Ditiotreitol
IPA	Alcool izopropilic
MW	Greutate moleculară
NEM	N-Etilmorfolină
NMP	N-Metil-2-pirolidonă
RT	Temperatura camerei
TFA	Acid 2,2,2-trifluoroacetic
TFE	2,2,2-Trifluoroetanol

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- VIRTÀ P ET AL: "Solid-supported synthesis of oligomeric bioconjugates", TETRAHE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 59, no. 28, 7 July 2003 (2003-07-07), pages 5137-5174, XP004434882, ISSN: 0040-4020, DOI: 10.1016/S0040-4020(03)00704-X
- WO-A1-2013/082551
- WO-A2-2011/150408
- WO-A2-2014/153240

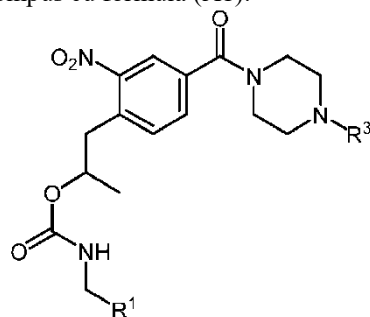
(57) Revendicări:

1. Procedeu pentru prepararea unui compus oligomeric cu formula (E):

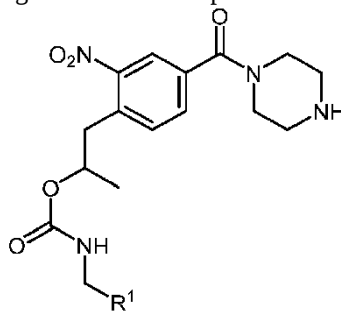


sau a unei sări acceptabile farmaceutic a acestuia,
în care procedeul cuprinde etapele secvențiale de:

(a) punerea în contact a unui compus cu formula (A1):



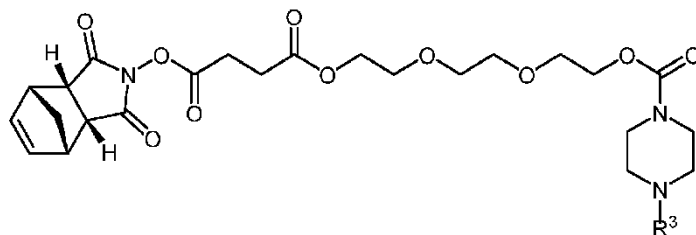
în care R^1 este un mediu-suport și R^3 este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil; cu un agent de deblocare pentru a forma compusul cu formula (II):



în care R^1 este un mediu-suport;

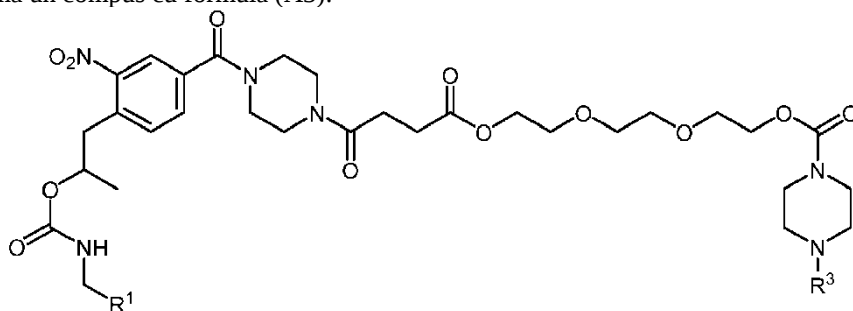
(b) punerea în contact a compusului cu formula (II) cu compusul cu formula (A2):

85



(A2);

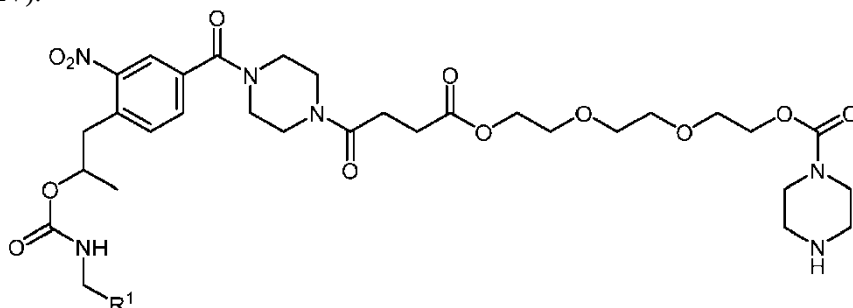
în care R^3 este selectat din grupul constând din tritol, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil; pentru a forma un compus cu formula (A3):



(A3);

în care R^1 este un mediu-suport și R^3 este selectat din grupul constând din tritol, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil;

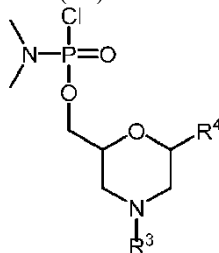
(c) punerea în contact a compusului cu formula (A3) cu un agent de deblocare pentru a forma un compus cu formula (IV):



(IV);

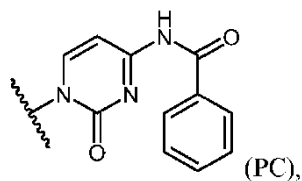
în care R^1 este un mediu-suport;

(d) punerea în contact a compusului cu formula (IV) cu un compus cu formula (A4):

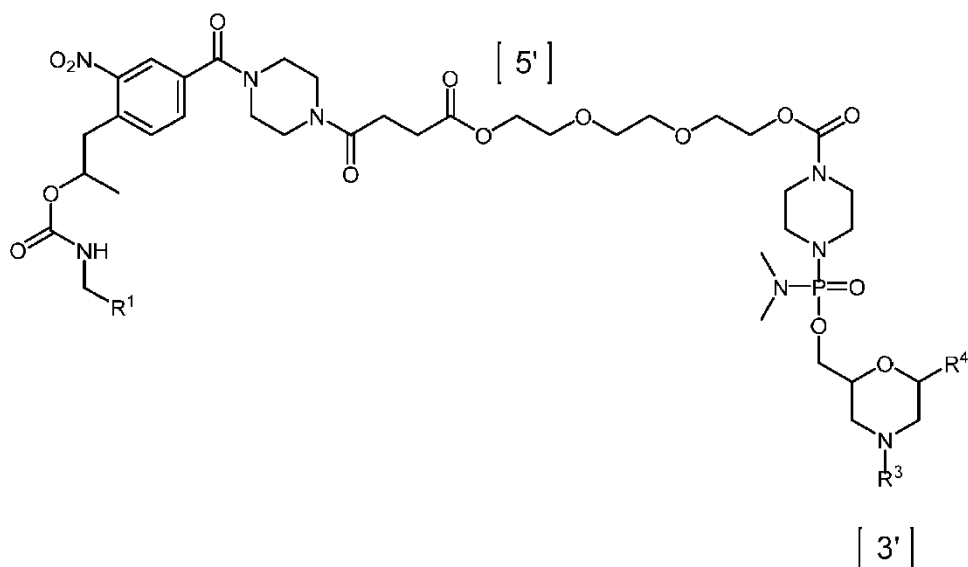


(A4);

în care R^3 este selectat din grupul constând din tritol, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil și R^4 este:

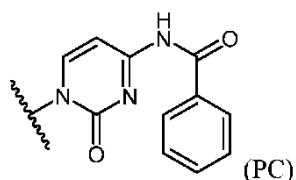


pentru a forma un compus cu formula (A5):



(A5);

în care R^1 este un mediu-suport, R^3 este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil și R^4 este:

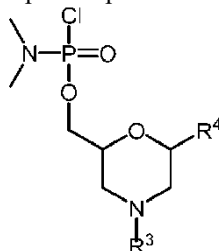


;

(e) efectuarea a 29 de iterații ale etapelor secvențiale de:

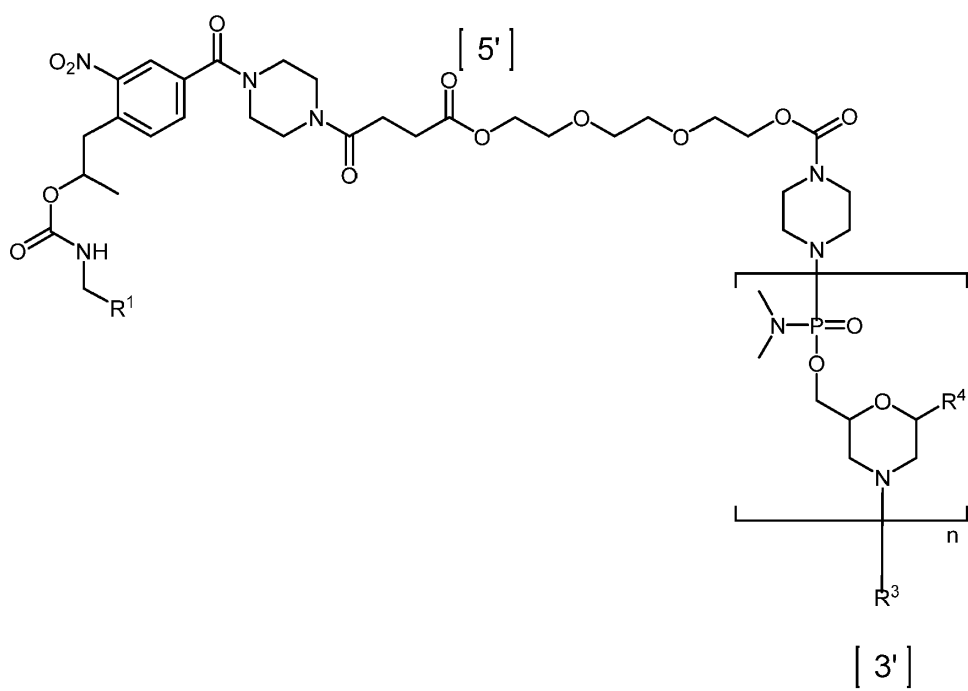
(e1) punerea în contact a produsului format prin etapa imediat anterioară cu un agent de deblocare; și

(e2) punerea în contact a compusului format prin etapa imediat anterioară cu un compus cu formula (A8):

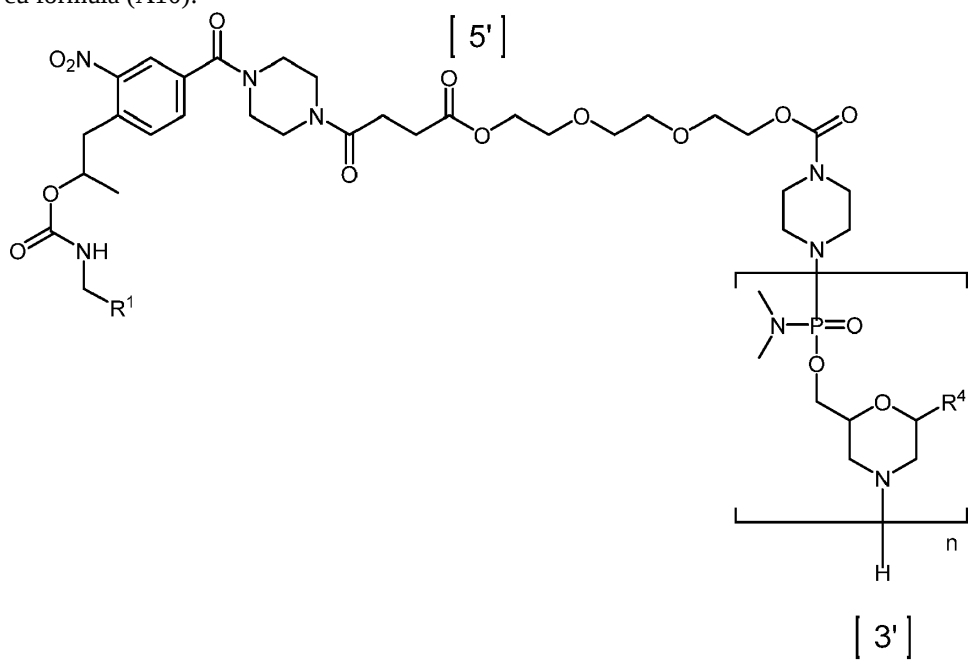
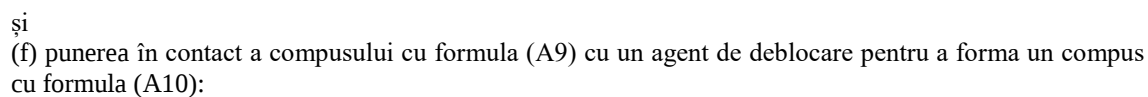


(A8);

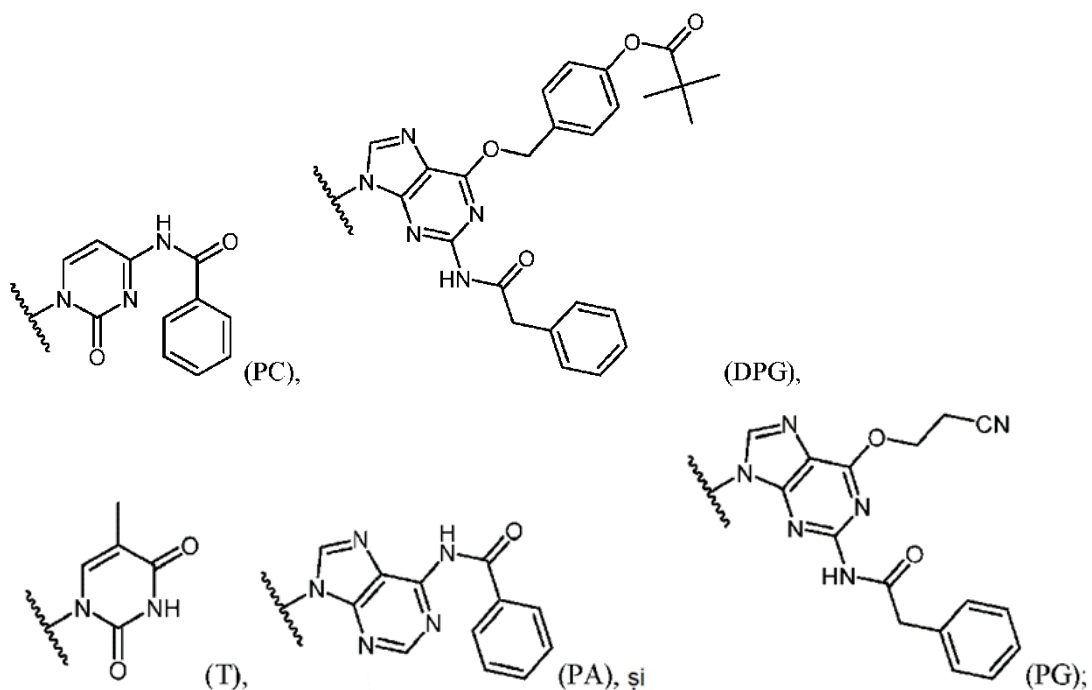
în care R^3 este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil și R^4 este selectat, în funcție de numărul poziției, din grupul constând din:



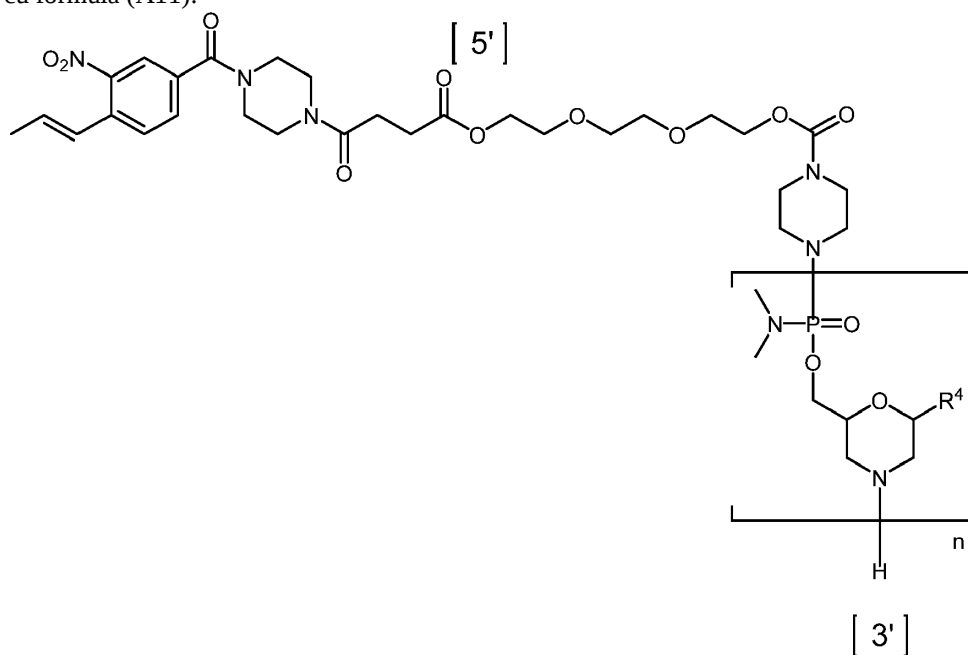
în care n este 30, R^1 este un mediu-suport, R^3 este selectat din grupul constând din tritol, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil și R^4 este selectat, în funcție de numărul poziției, din grupul constând din:



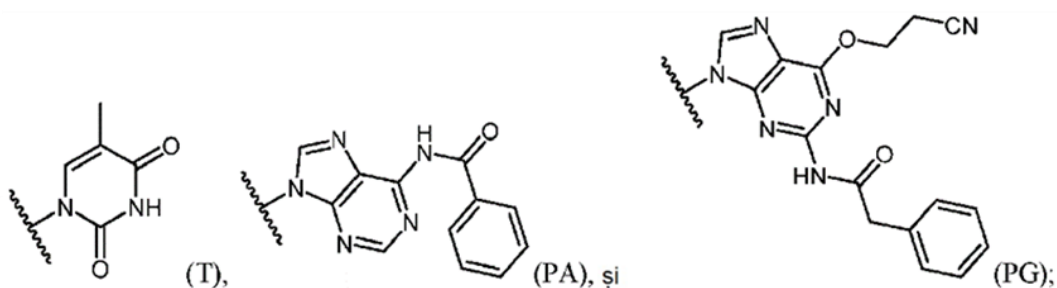
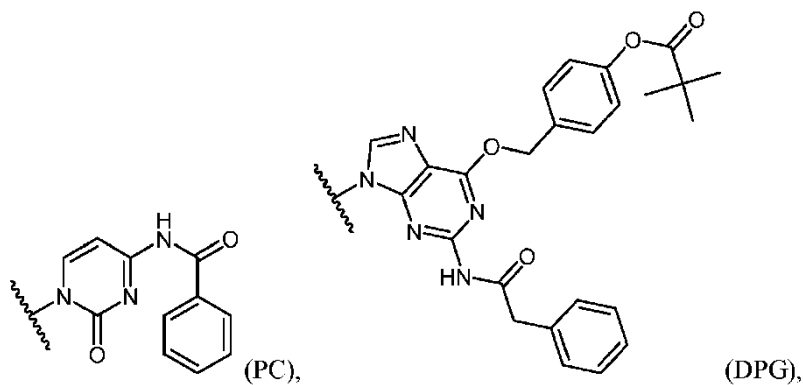
în care n este 30, R^1 este un mediu-suport și R^4 este selectat, în funcție de numărul poziției, din grupul constând din:



(g) punerea în contact a compusului cu formula (A10) cu un agent de clivare pentru a forma un compus cu formula (A11):



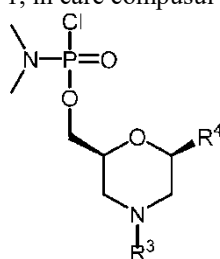
(A11);
în care n este 30 și R⁴ este selectat, în funcție de numărul poziției, din grupul constând din:



și

(h) punerea în contact a compusului cu formula (A11) cu un agent de deprotejare pentru a forma compusul oligomeric cu formula (E).

2. Procedeu conform revendicării 1, în care compusul cu formula (A4) are formula (A4a):

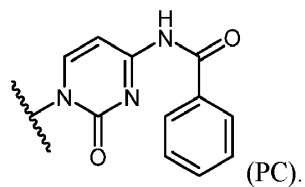


(A4a);

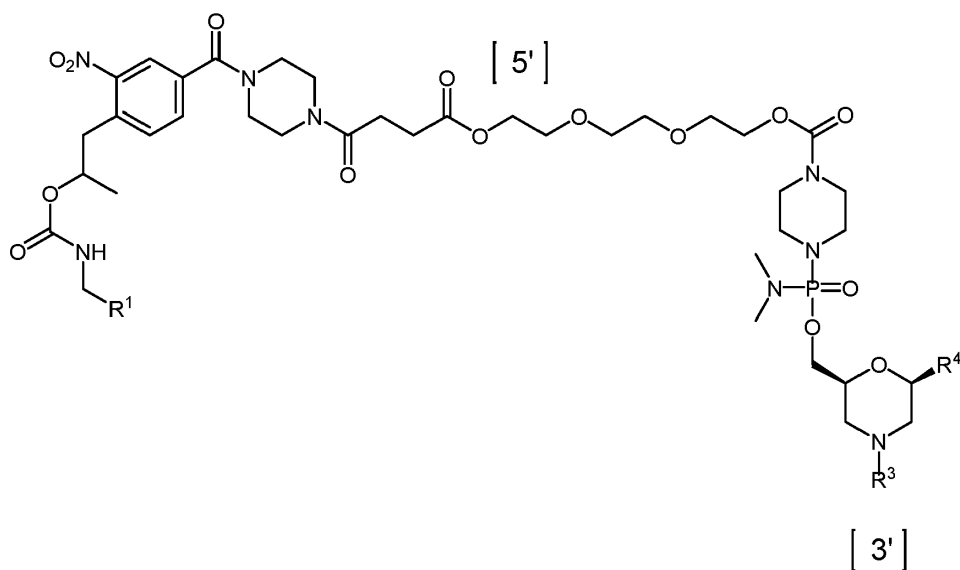
în care:

R³ este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil și

R⁴ este:

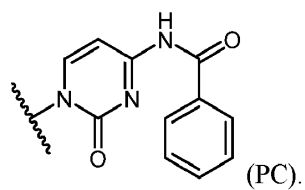


3. Procedeu conform revendicării 1 sau 2, în care compusul cu formula (A5) are formula (A5a):

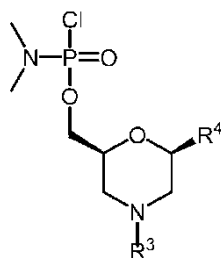


(A5a);

în care:

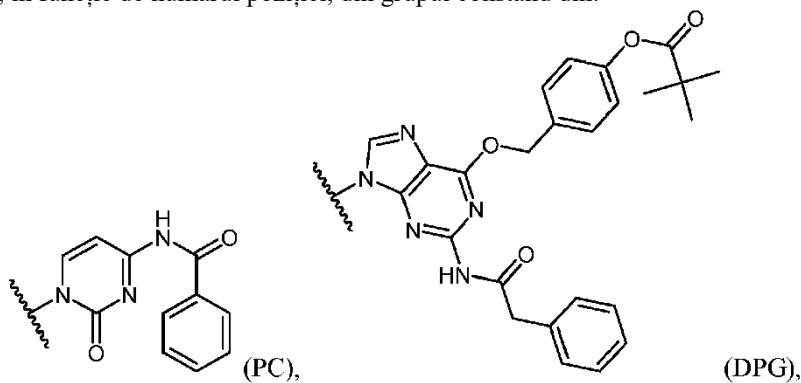
R¹ este un mediu-suportR³ este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil șiR⁴ este:

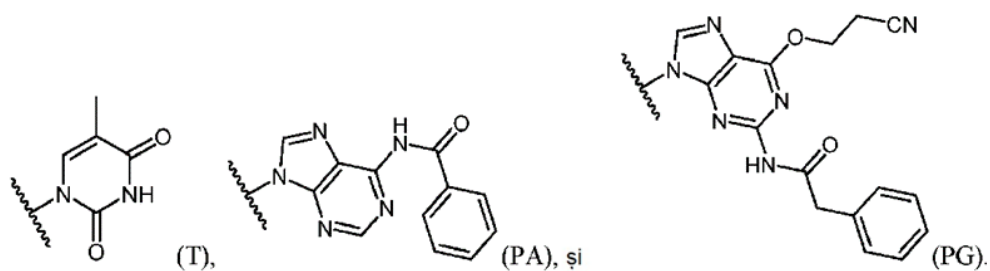
4. Procedeu conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 3, în care compusul cu formula (A8) are formula (A8a):



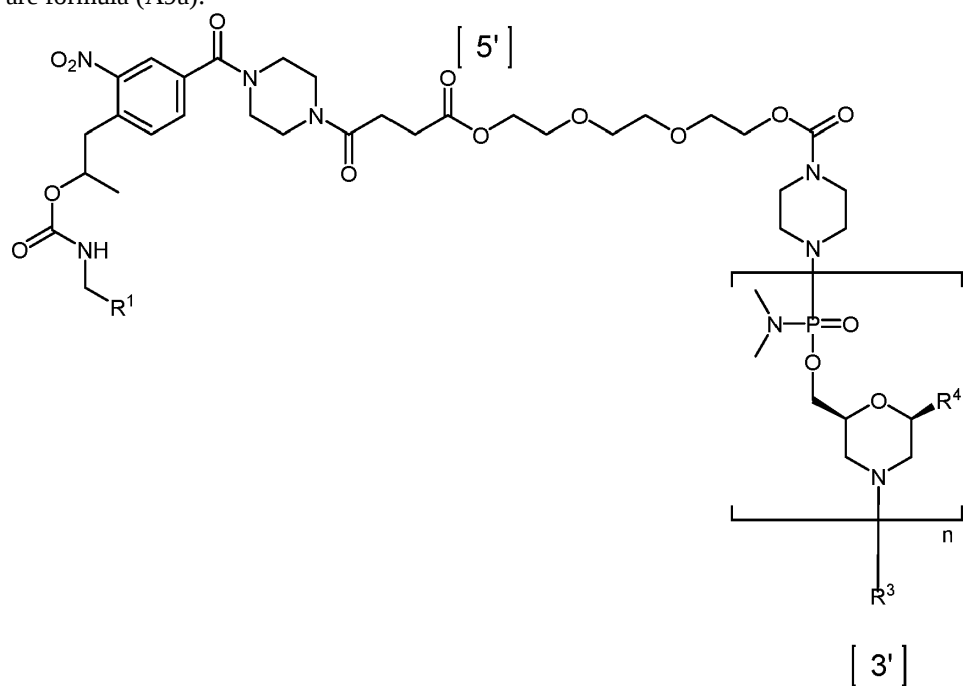
(A8a);

în care:

R³ este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil șiR⁴ este selectat, în funcție de numărul poziției, din grupul constând din:



5. Procedeu conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 4, în care compusul cu formula (A9) are formula (A9a):



(A9a);

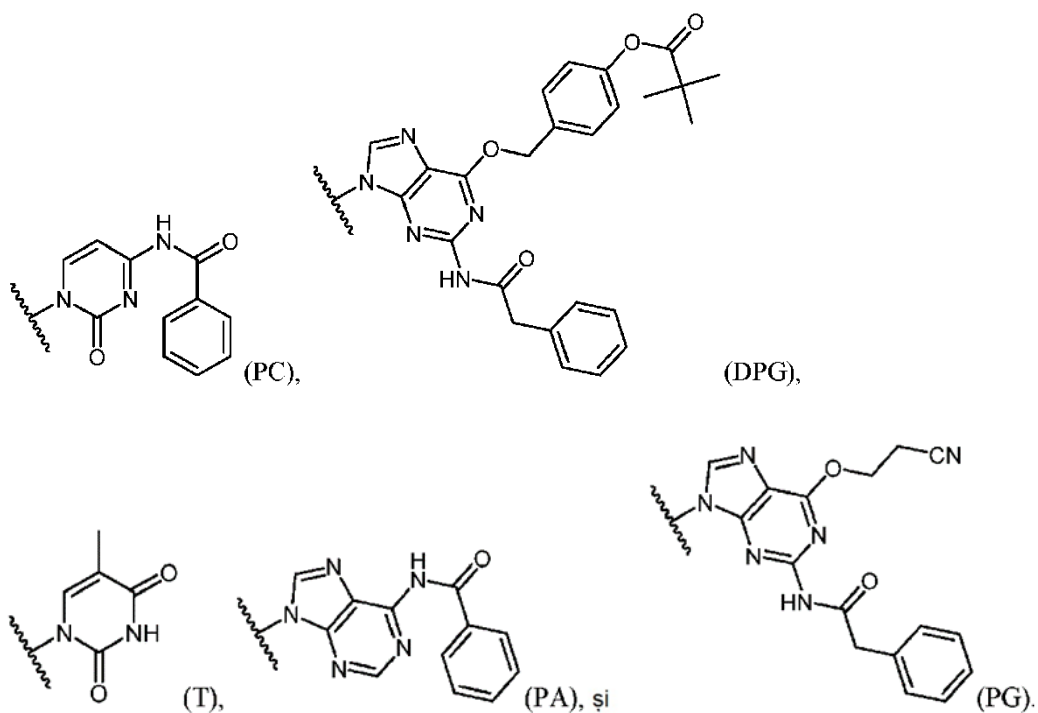
în care:

n este 30,

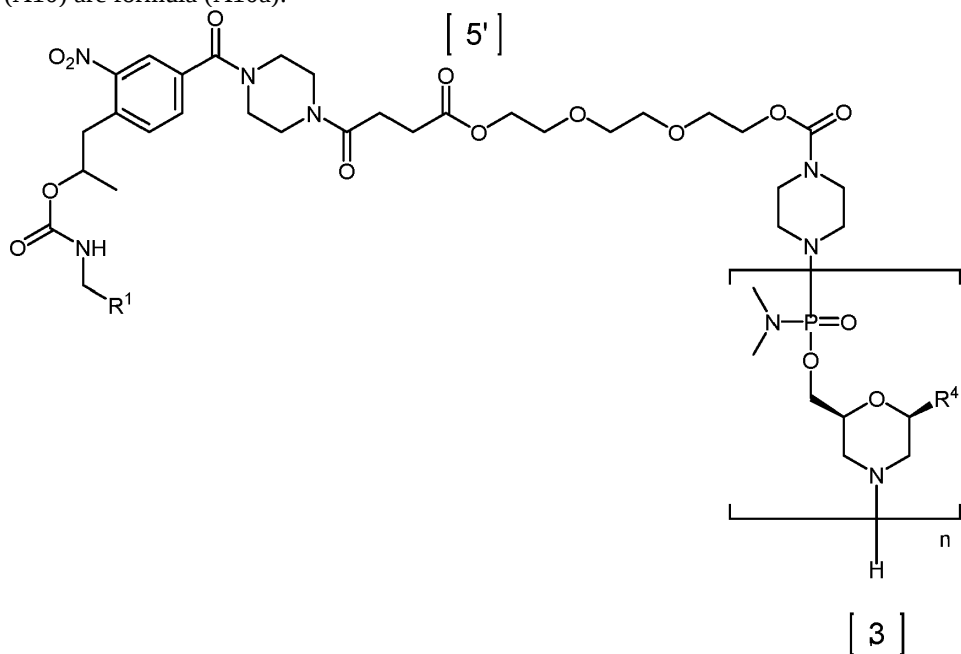
R¹ este un mediu-suport,

R³ este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil și

R⁴ este selectat, în funcție de numărul poziției, din grupul constând din:



6. Procedeu conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 5, în care compusul cu formula (A10) are formula (A10a):



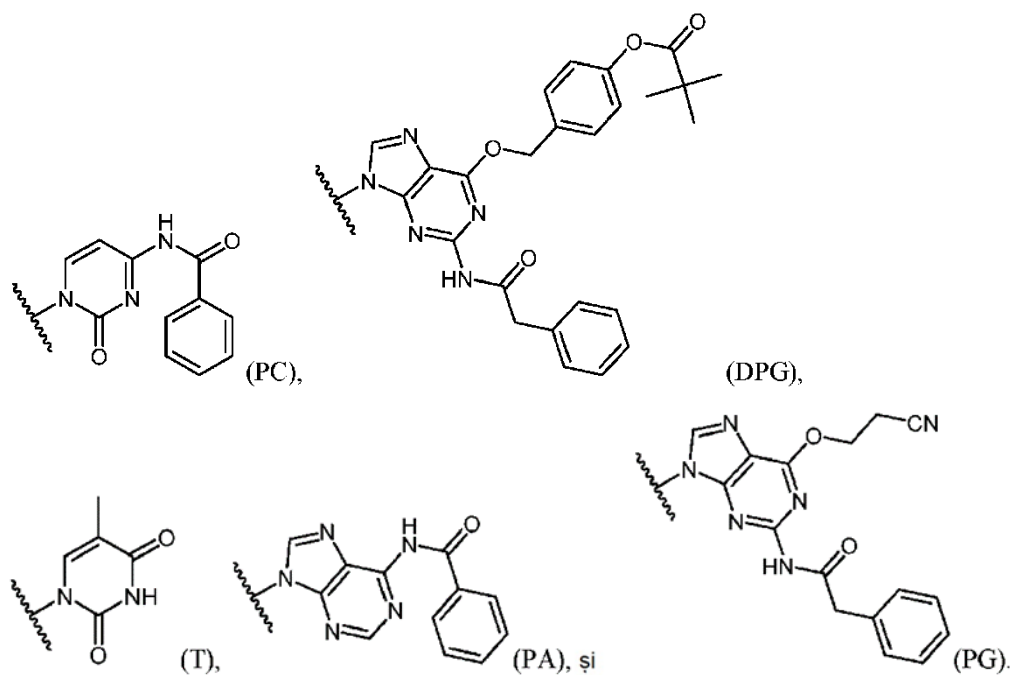
(A10a);

în care:

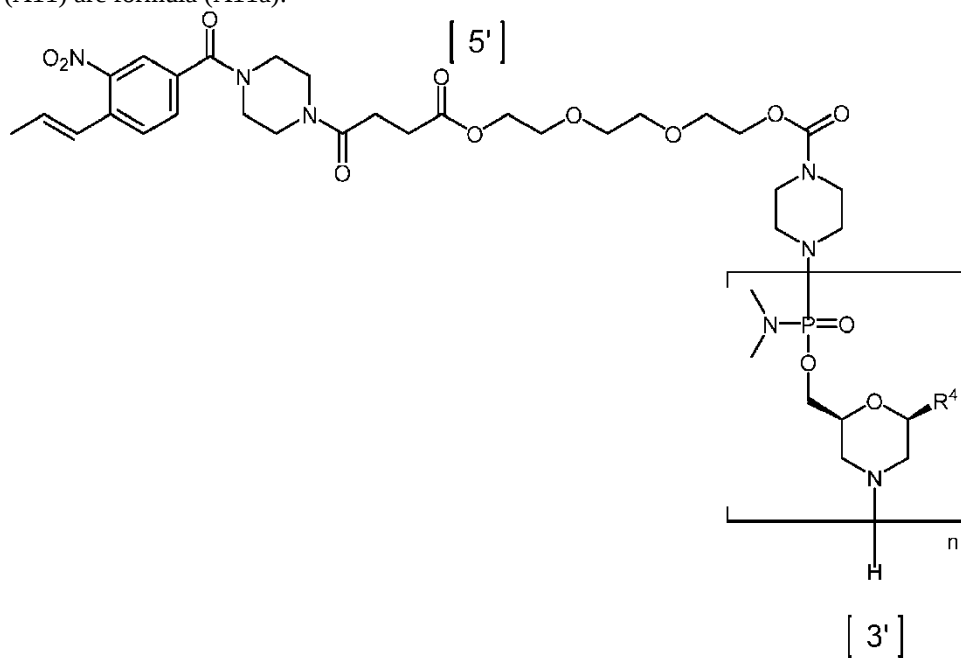
n este 30,

R¹ este un mediu-suport și

R⁴ este selectat, în funcție de numărul poziției, din grupul constând din:



7. Procedeu conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 6, în care compusul cu formula (A11) are formula (A11a):

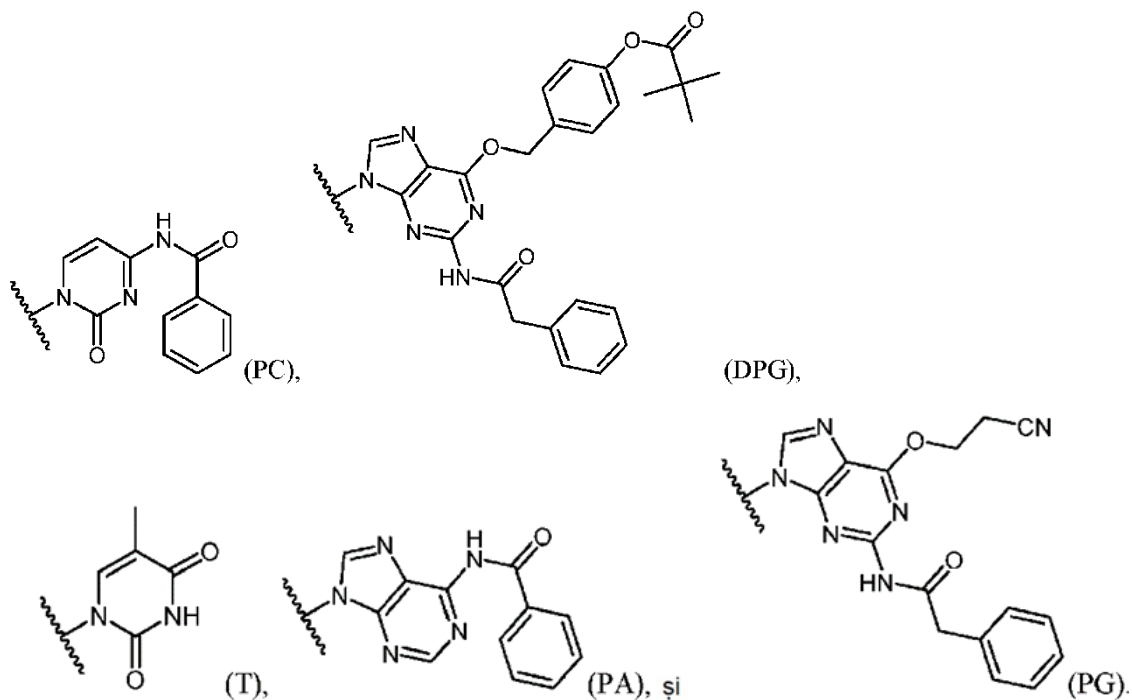


(A11a);

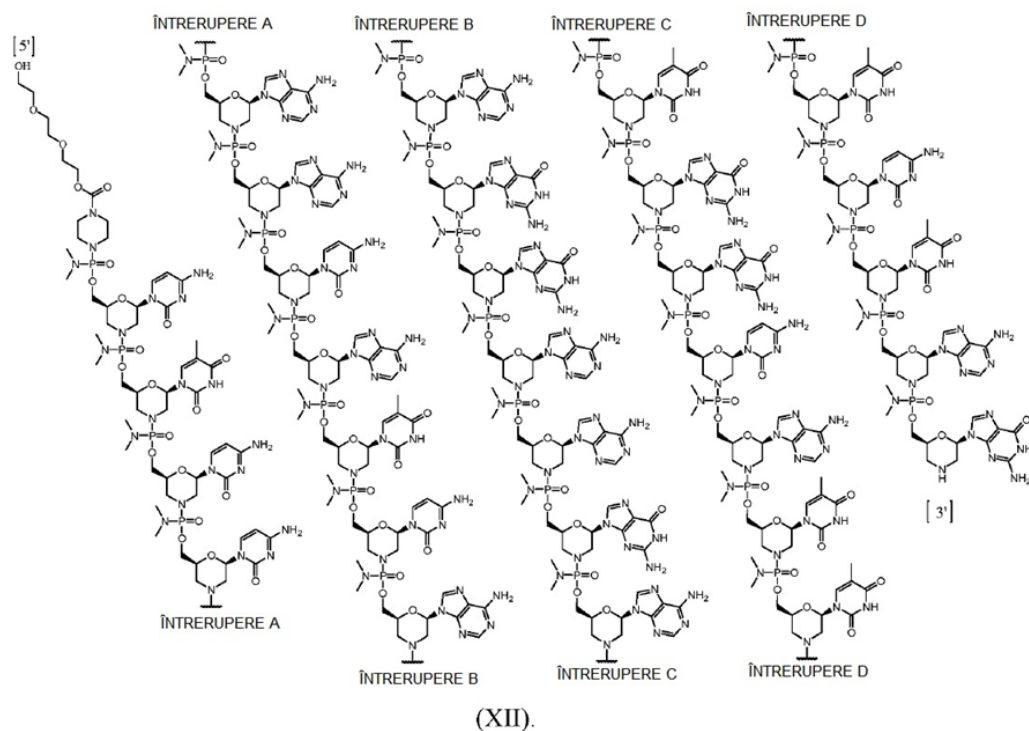
în care:

n este 30 și

R⁴ este selectat, în funcție de numărul poziției, din grupul constând din:



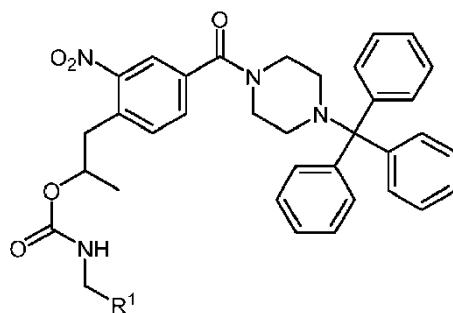
8. Procedeu conform revendicării 1, în care compusul oligomeric cu formula (E) este un compus oligomeric cu formula (XII):



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

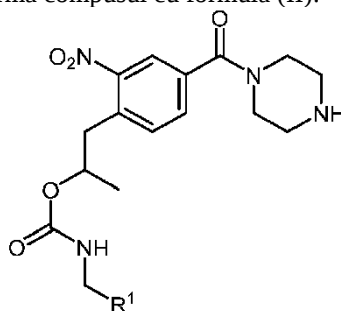
9. Procedeu conform revendicării 1,
în care procedeul cuprinde etapele secvențiale de:
(a) punerea în contact a unui compus cu formula (I):

96



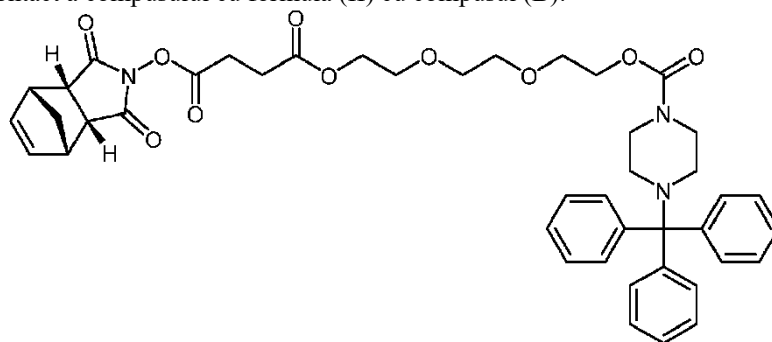
(I);

în care R¹ este un mediu-suport,
cu un agent de deblocare pentru a forma compusul cu formula (II):



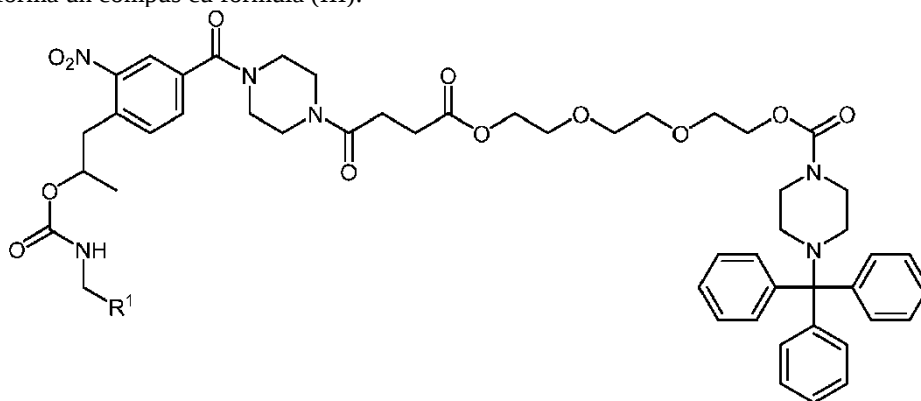
(II);

în care R¹ este un mediu-suport;
(b) punerea în contact a compusului cu formula (II) cu compusul (B):



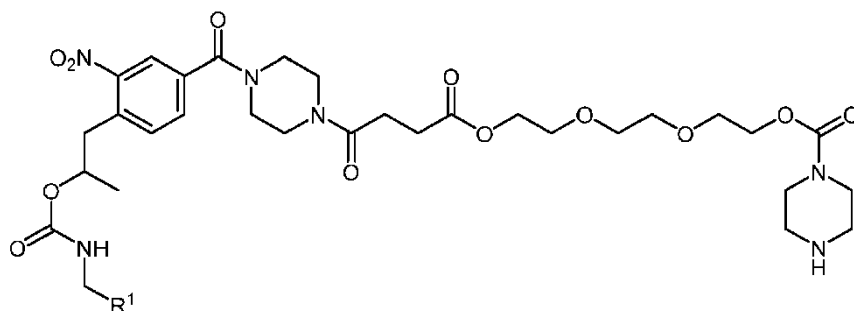
(B);

pentru a forma un compus cu formula (III):



(III);

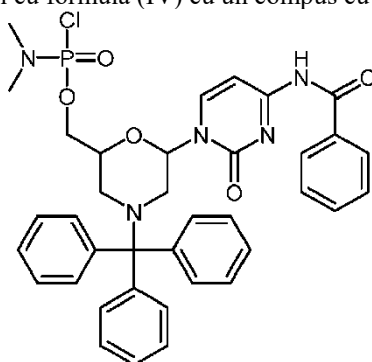
în care R¹ este un mediu-suport;
(c) punerea în contact a compusului cu formula (III) cu un agent de deblocare pentru a forma un compus
cu formula (IV):



(IV);

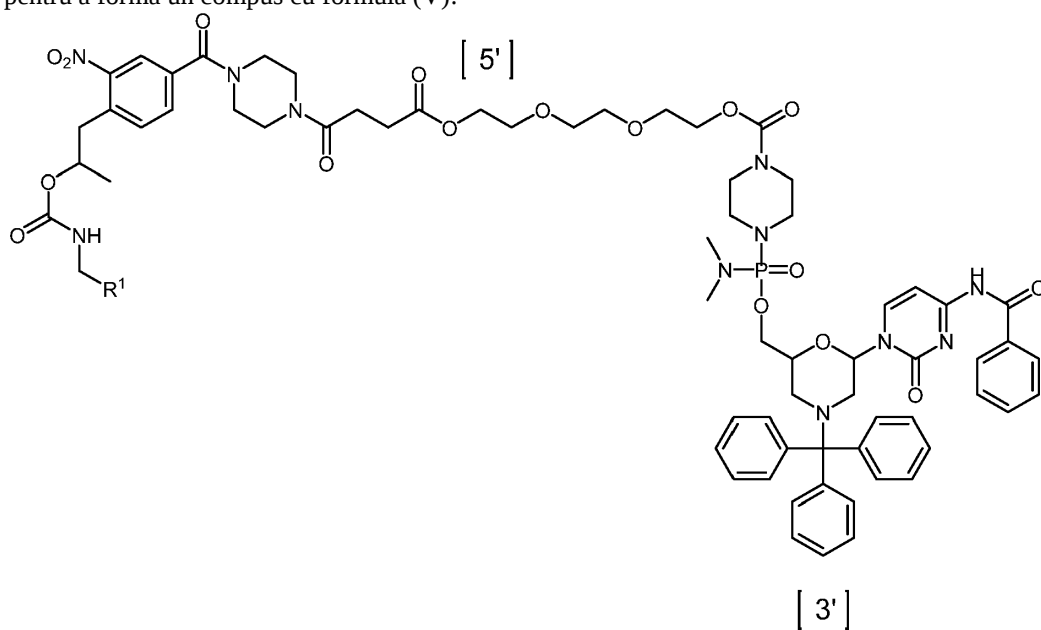
în care R¹ este un mediu-suport;

(d) punerea în contact a compusului cu formula (IV) cu un compus cu formula (C):



(C);

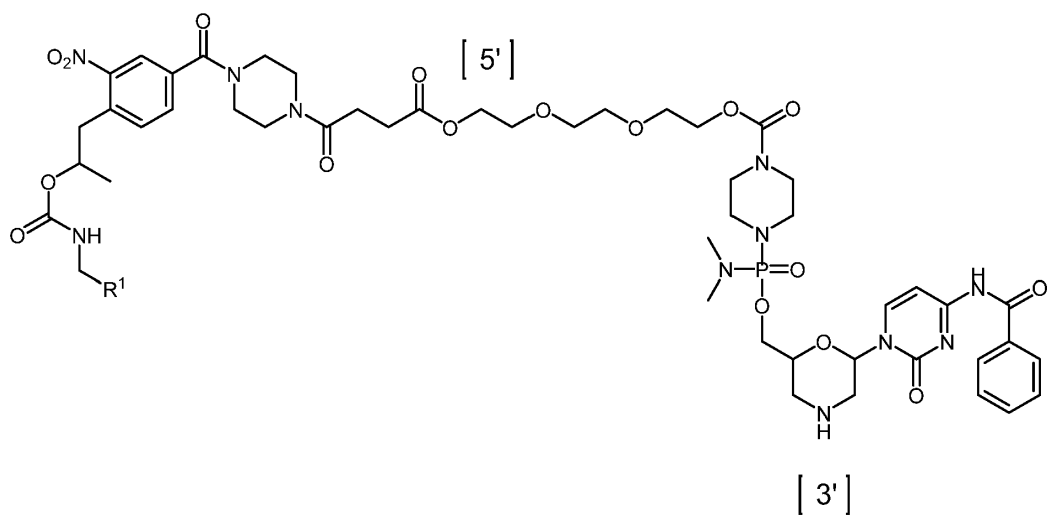
pentru a forma un compus cu formula (V):



(V);

în care R¹ este un mediu-suport;

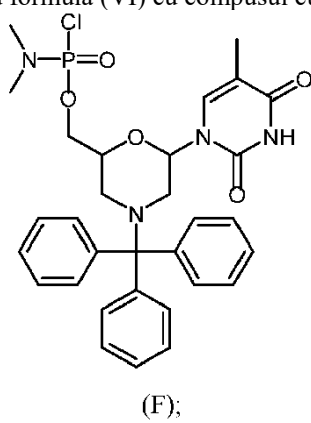
(e) punerea în contact a compusului cu formula (V) cu un agent de deblocare pentru a forma un compus cu formula (VI):



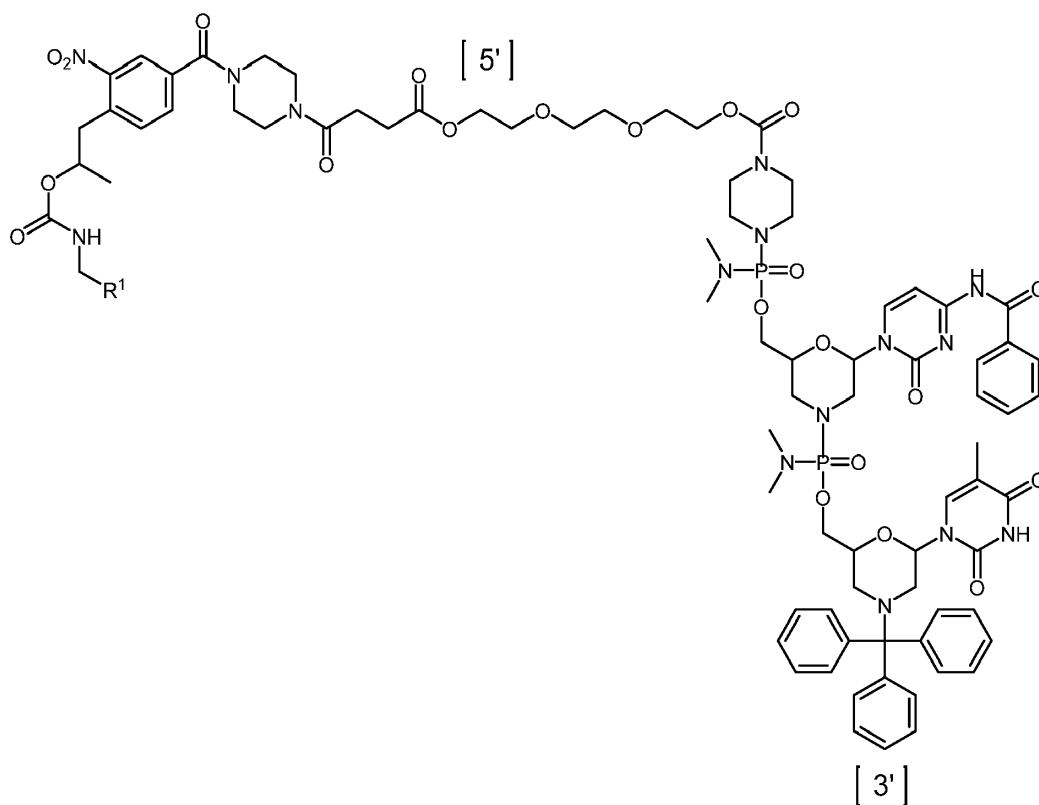
(VI);

în care R¹ este un mediu-suport;

(f) punerea în contact a compusului cu formula (VI) cu compusul cu formula (F):



pentru a forma un compus cu formula (VII):



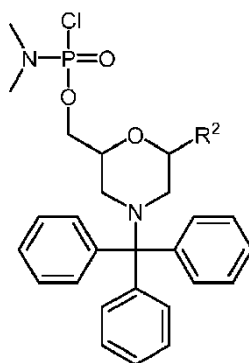
(VII);

în care R^1 este un mediu-suport;

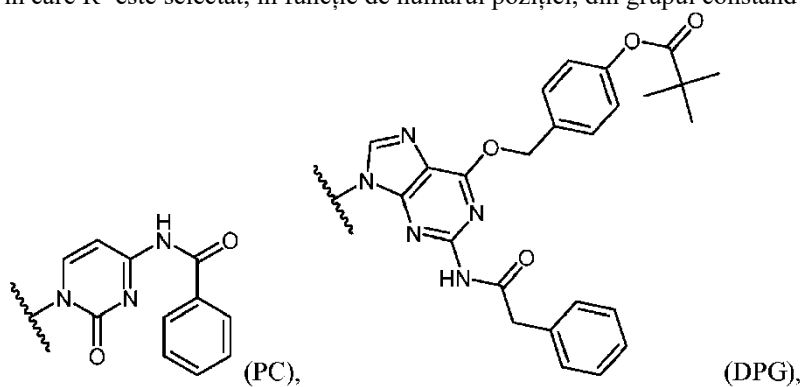
(g) efectuarea a 28 de iterații ale etapelor secvențiale de:

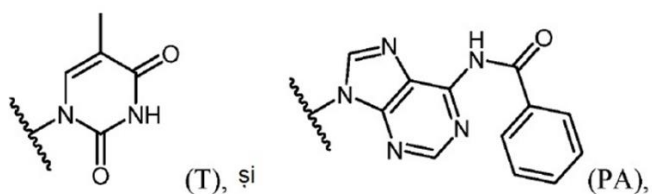
(g1) punerea în contact a produsului format prin etapa imediat anterioară cu un agent de deblocare; și

(g2) punerea în contact a compusului format prin etapa imediat anterioară cu un compus cu formula (VIII):



(VIII);

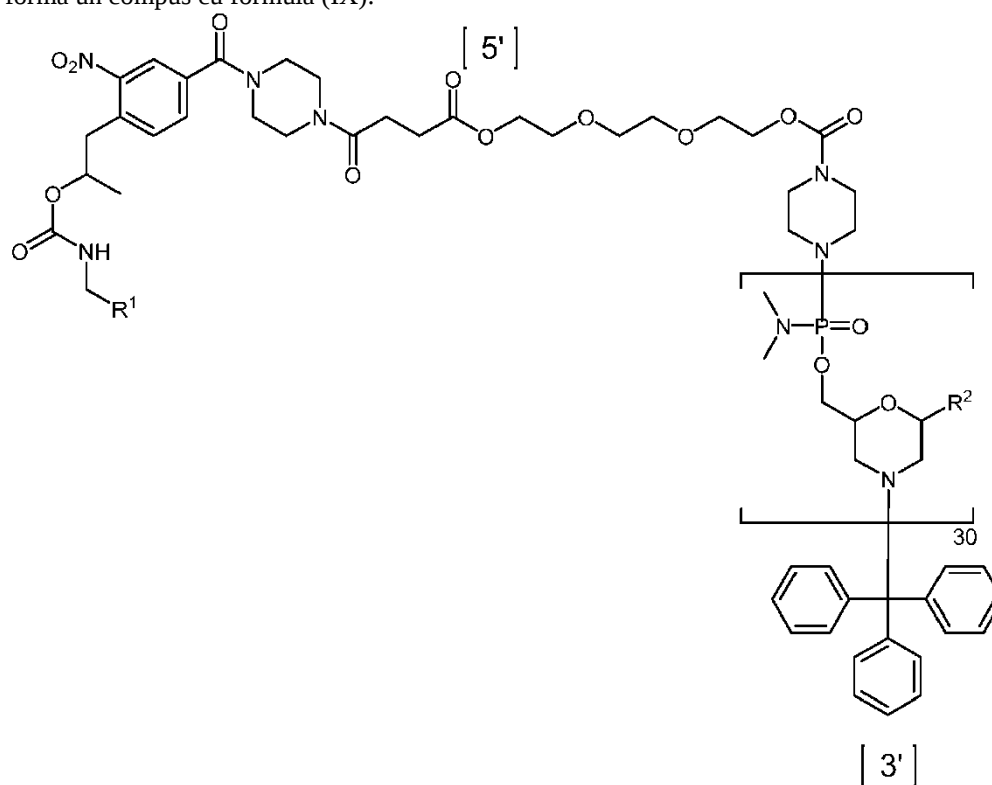
în care R^2 este selectat, în funcție de numărul poziției, din grupul constând din:



în care, pentru fiecare iterație de la 1 la 28, R^2 este:

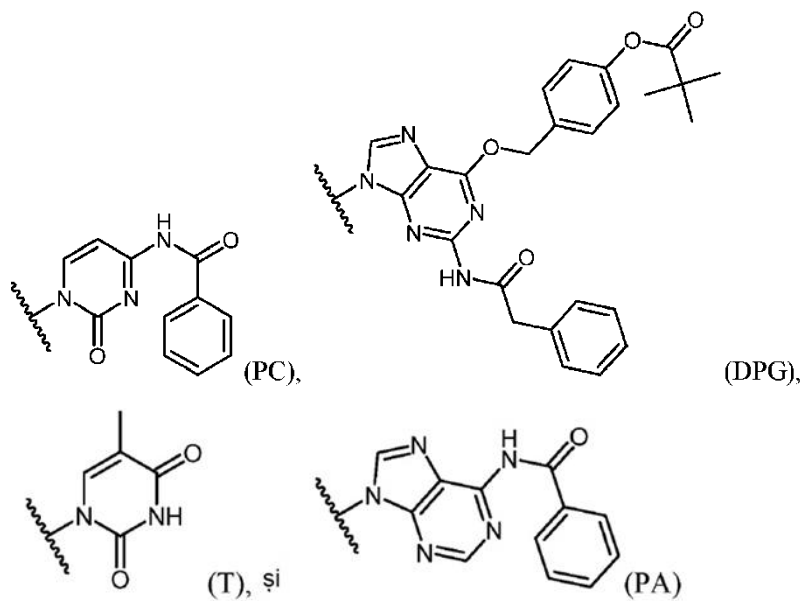
Iterație nr.	R^2	Iterație nr.	R^2	Iterație nr.	R^2
1	PC	11	DPG	21	PA
2	PC	12	DPG	22	T
3	PA	13	PA	23	T
4	PA	14	PA	24	T
5	PC	15	DPG	25	PC
6	PA	16	PA	26	T
7	T	17	T	27	PA
8	PC	18	DPG	28	DPG
9	PA	19	DPG		
10	PA	20	PC		

pentru a forma un compus cu formula (IX):



în care R^1 este un mediu-suport,

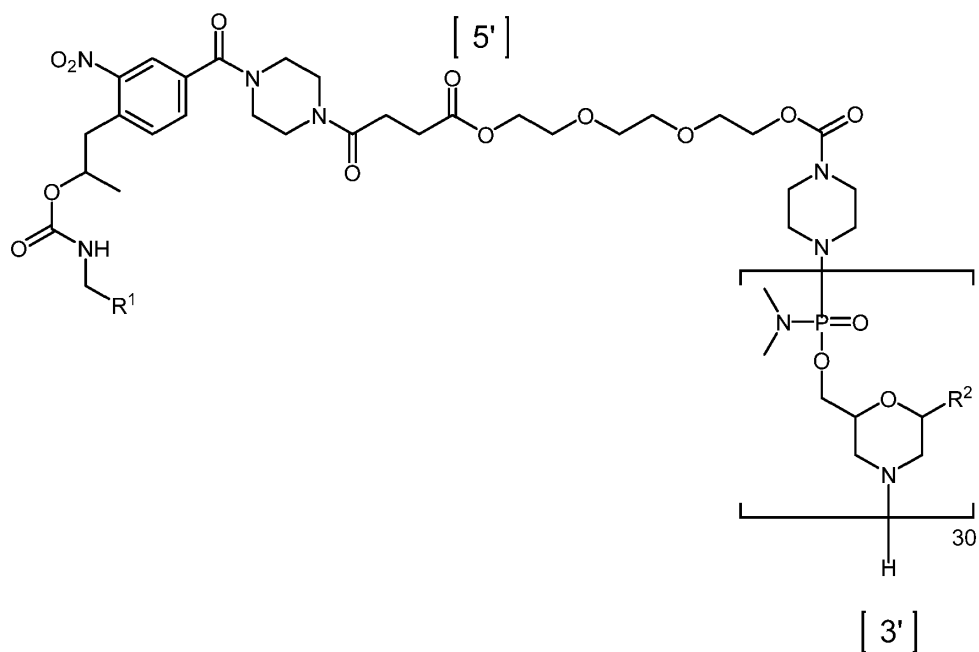
în care R^2 este selectat, în funcție de numărul poziției, din grupul constând din:



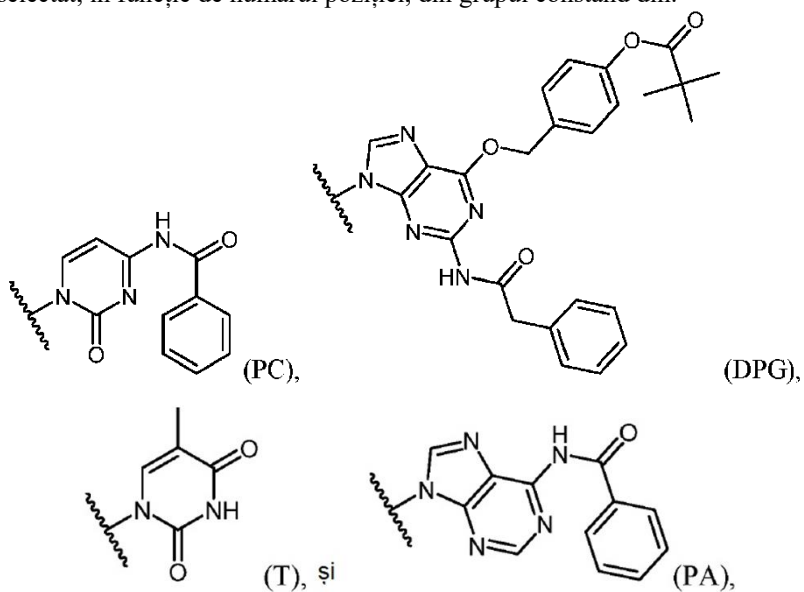
, și
în care R² este la fiecare poziție de la 1 la 30 și de la 5' la 3':

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
1	PC	11	PA	21	DPG
2	T	12	PA	22	PC
3	PC	13	DPG	23	PA
4	PC	14	DPG	24	T
5	PA	15	PA	25	T
6	PA	16	PA	26	T
7	PC	17	DPG	27	PC
8	PA	18	PA	28	T
9	T	19	T	29	PA
10	PC	20	DPG	30	DPG

(h) punerea în contact a compusului cu formula (IX) cu un agent de deblocare pentru a forma un compus cu formula (X):



(X);

în care R¹ este un mediu-suport,în care R² este selectat, în funcție de numărul poziției, din grupul constând din:

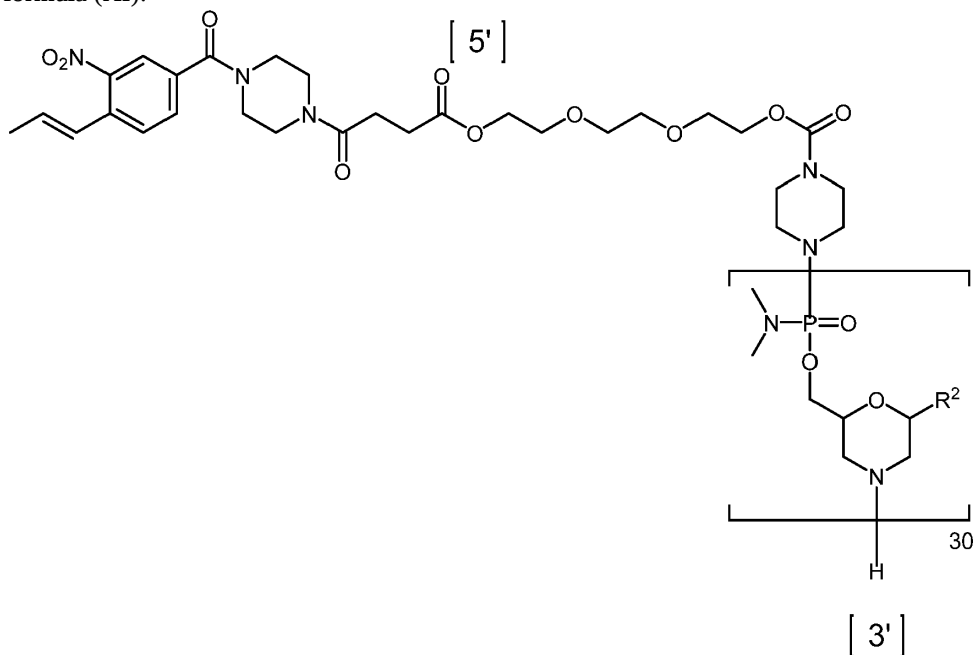
și

în care R² este la fiecare poziție de la 1 la 30 și de la 5' la 3':

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
1	PC	11	PA	21	DPG
2	T	12	PA	22	PC
3	PC	13	DPG	23	PA
4	PC	14	DPG	24	T
5	PA	15	PA	25	T
6	PA	16	PA	26	T
7	PC	17	DPG	27	PC

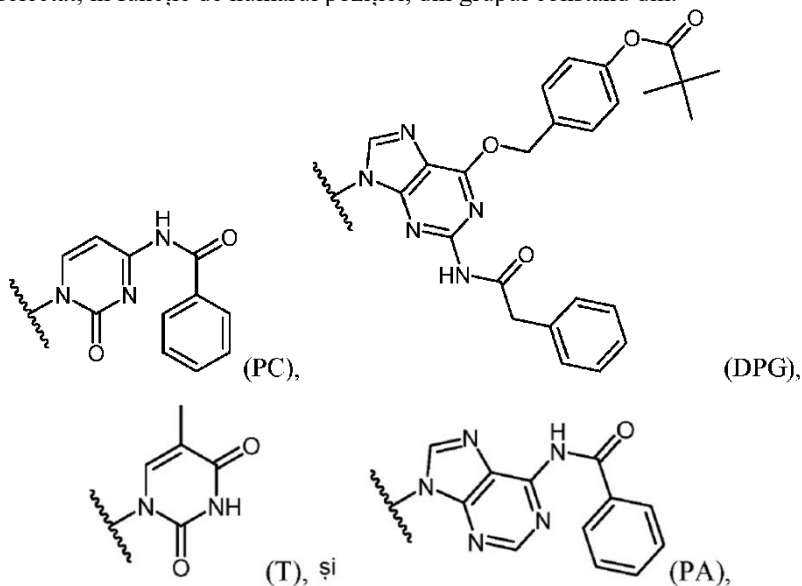
Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
8	PA	18	PA	28	T
9	T	19	T	29	PA
10	PC	20	DPG	30	DPG

(i) punerea în contact a compusului cu formula (X) cu un agent de clivare pentru a forma un compus cu formula (XI):



(XI),

în care R² este selectat, în funcție de numărul poziției, din grupul constând din:



și

în care R² este la fiecare poziție de la 1 la 30 și de la 5' la 3':

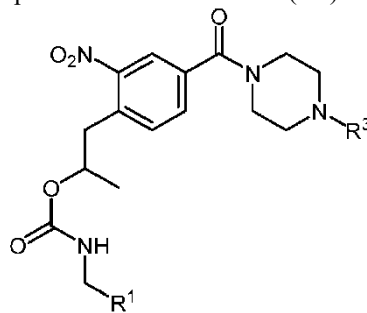
Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
1	PC	11	PA	21	DPG
2	T	12	PA	22	PC

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
3	PC	13	DPG	23	PA
4	PC	14	DPG	24	T
5	PA	15	PA	25	T
6	PA	16	PA	26	T
7	PC	17	DPG	27	PC
8	PA	18	PA	28	T
9	T	19	T	29	PA
10	PC	20	DPG	30	DPG

și

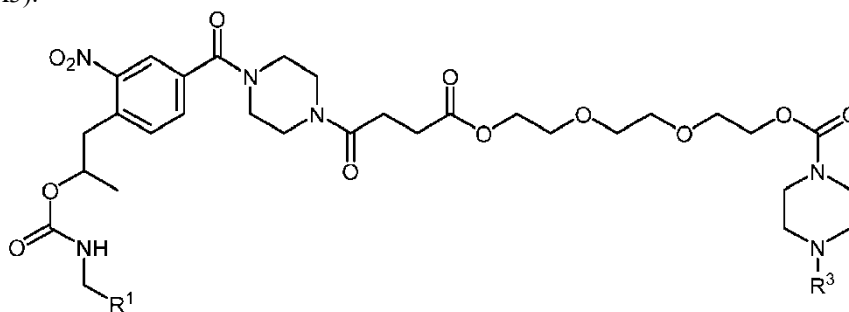
(j) punerea în contact a compusului cu formula (XI) cu un agent de deprotejare pentru a forma compusul oligomeric cu formula (E).

10. Compus selectat din grupul constând din formula (A1):



(A1),

și formula (A3):

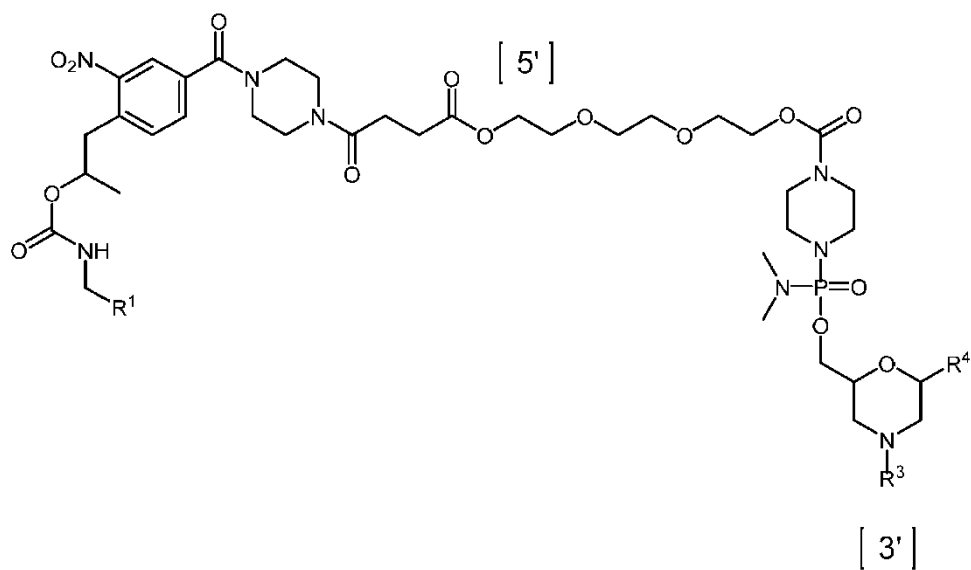


(A3)

sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, în care:

fiecare R¹ este independent un mediu-suport; șifiecare R³ este selectat independent din grupul constând din hidrogen, tritol, monometoxitritol, dimetoxitritol și trimetoxitritol.

11. Compus cu formula (A5):



(A5)

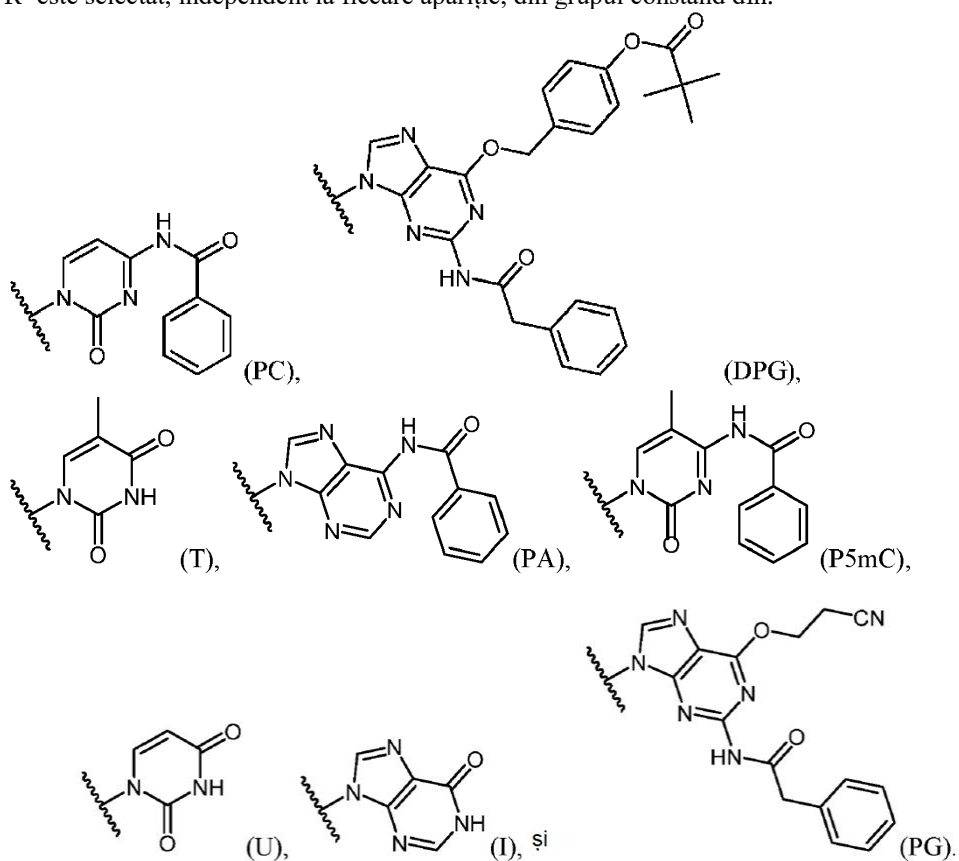
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

R^1 este un mediu-suport;

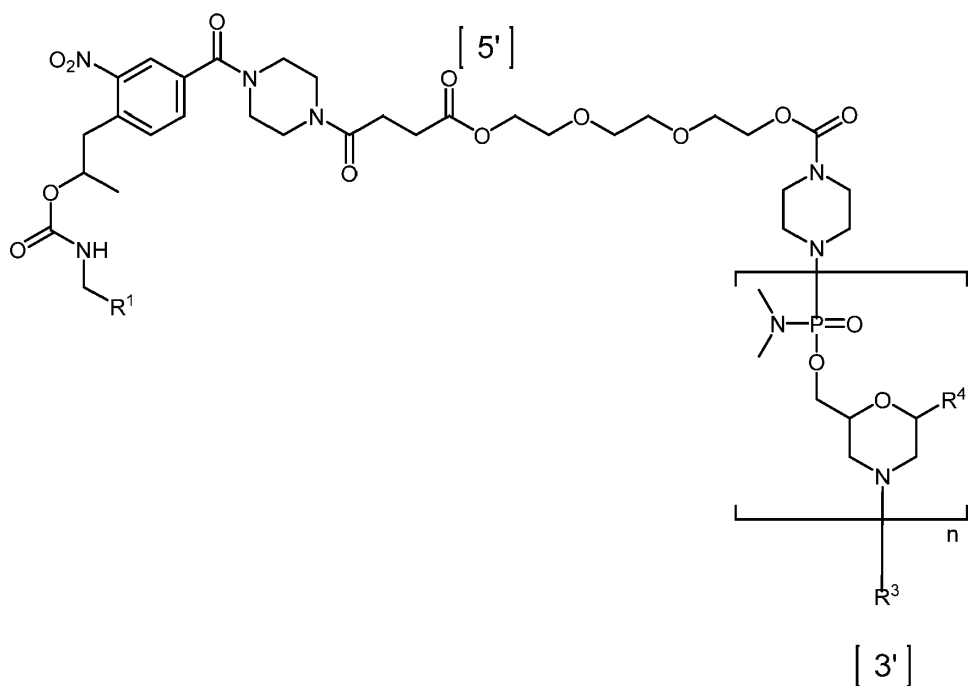
R^3 este selectat din grupul constând din hidrogen, tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil;

și

R^4 este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:



12. Compus cu formula (A9):



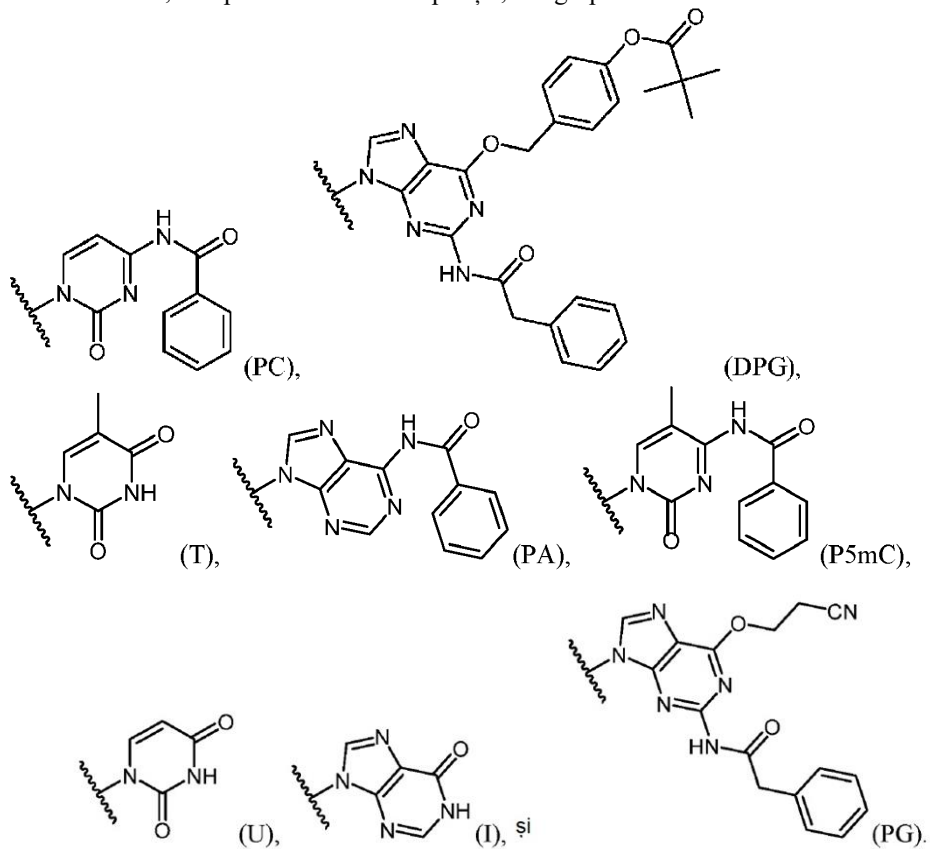
(A9),

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

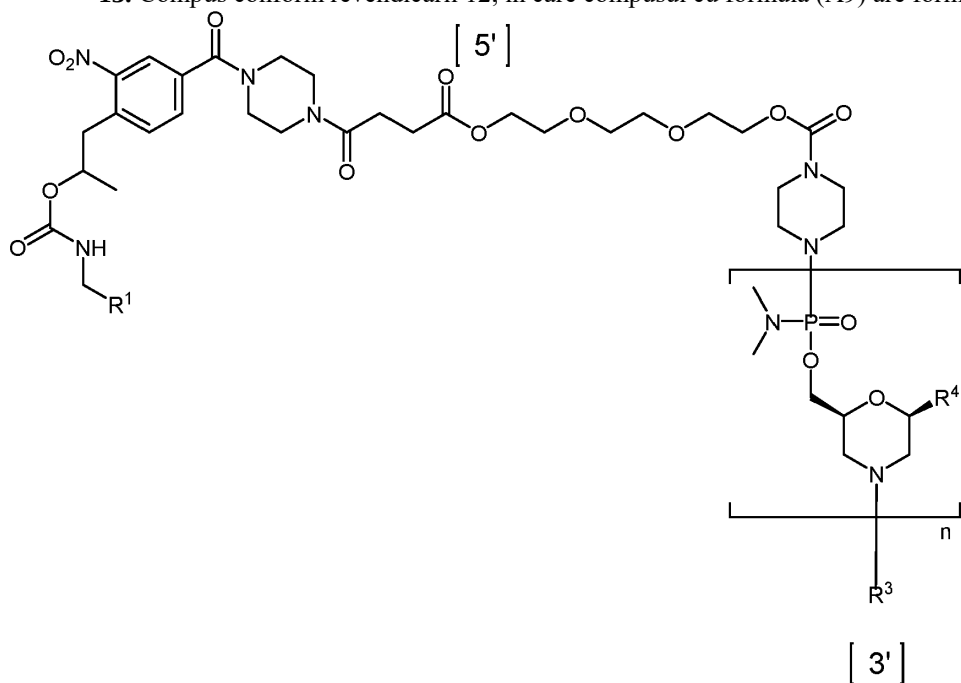
n este un număr întreg de la 10 la 40;

 R^1 este un mediu-suport; R^3 este selectat din grupul constând din hidrogen, tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil;

și

 R^4 este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:

13. Compus conform revendicării 12, în care compusul cu formula (A9) are formula (A9a):



(A9a);

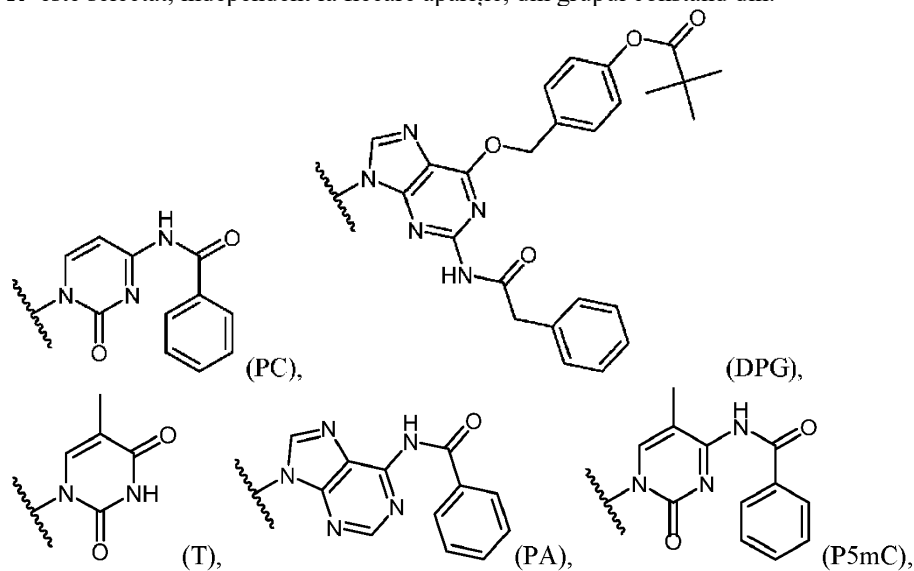
în care:

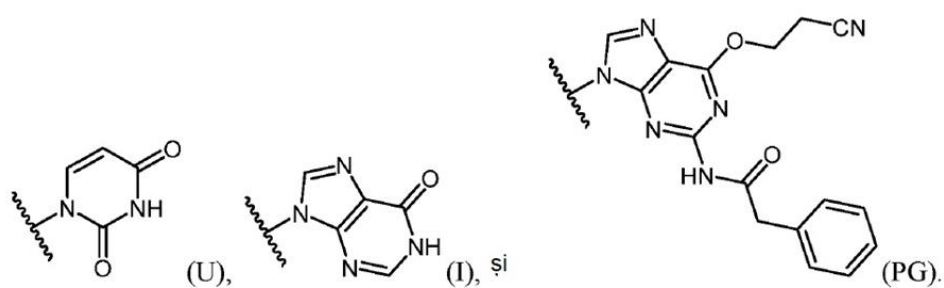
n este un număr întreg de la 10 la 40,

R¹ este un mediu-suport

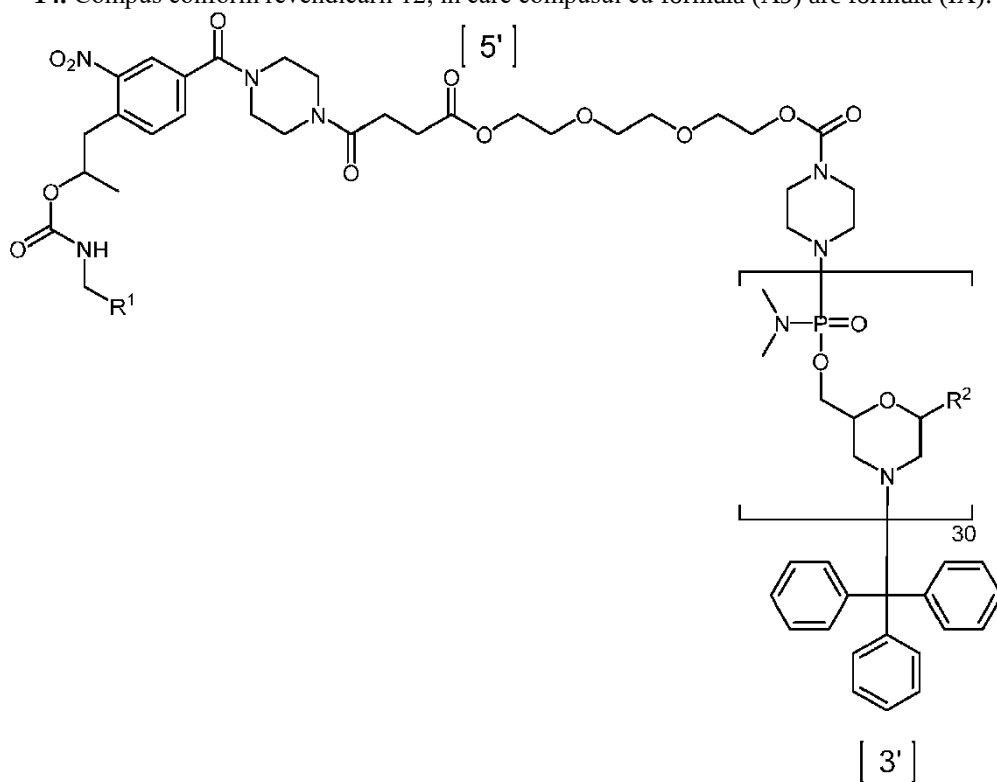
R³ este selectat din grupul constând din tritil, monometoxitritil, dimetoxitritil și trimetoxitritil și

R⁴ este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:





14. Compus conform revendicării 12, în care compusul cu formula (A9) are formula (IX):

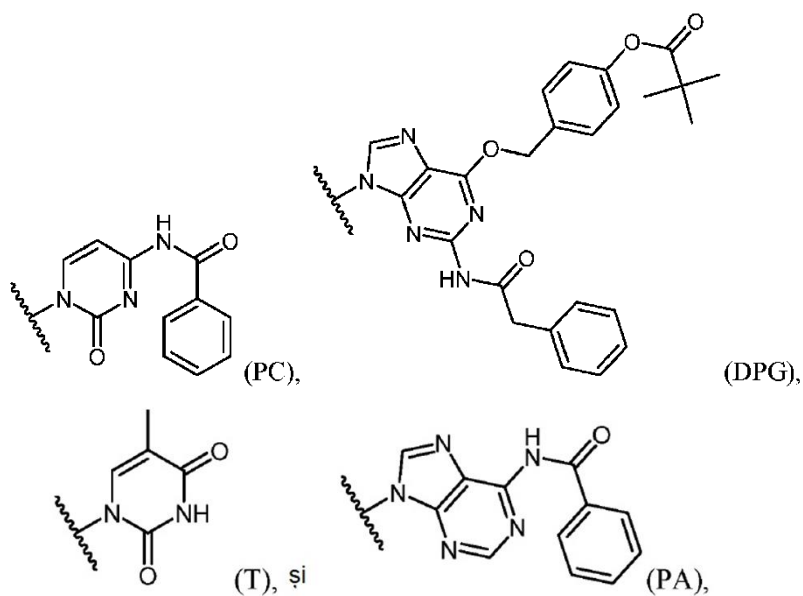


(IX),

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

R¹ este un mediu-suport și

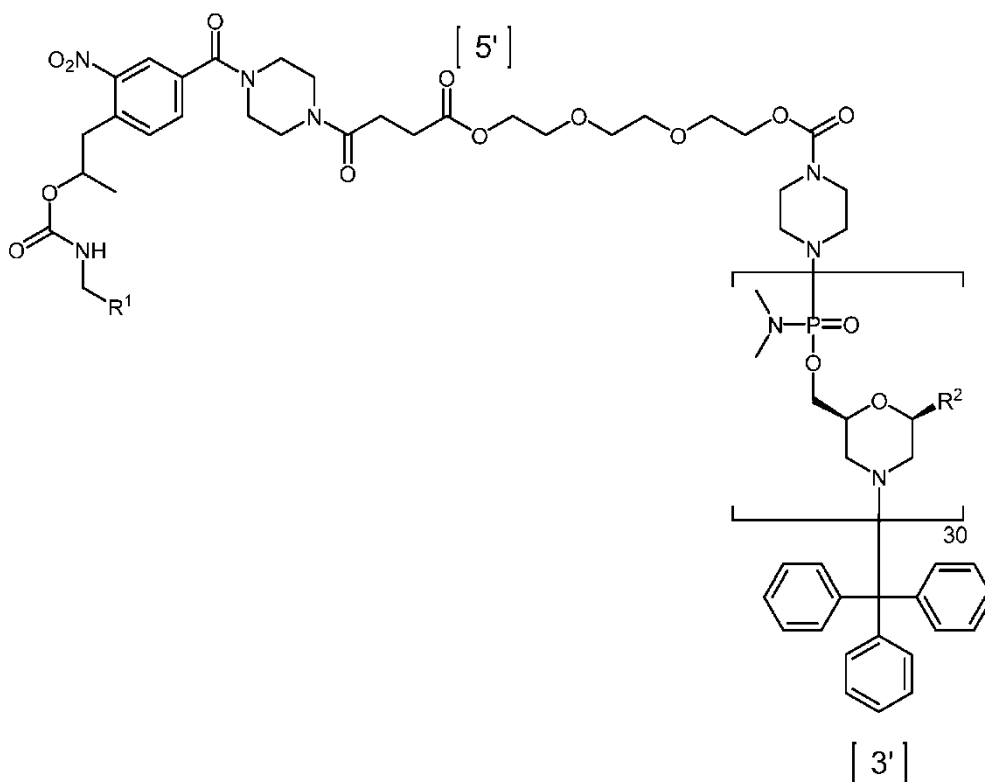
R² este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:



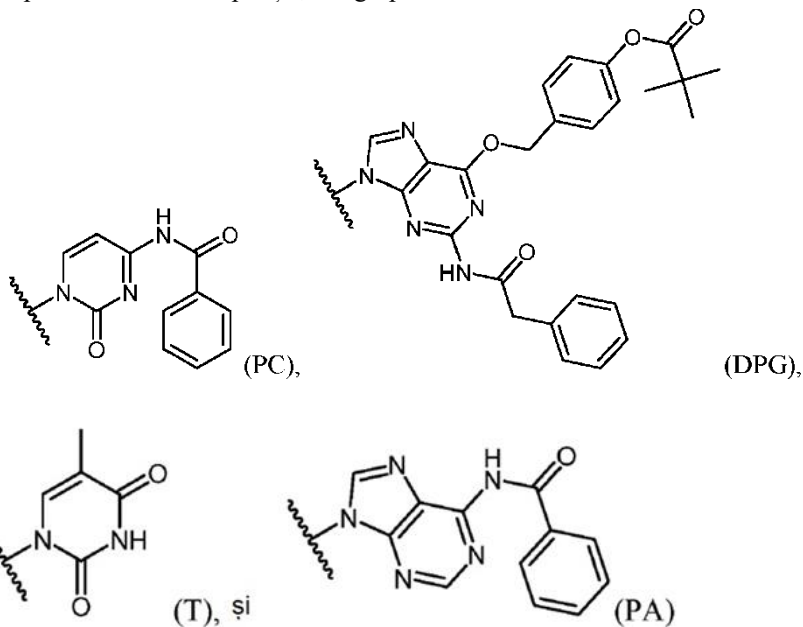
și
în care R² este la fiecare poziție de la 1 la 30 și de la 5' la 3':

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
1	PC	11	PA	21	DPG
2	T	12	PA	22	PC
3	PC	13	DPG	23	PA
4	PC	14	DPG	24	T
5	PA	15	PA	25	T
6	PA	16	PA	26	T
7	PC	17	DPG	27	PC
8	PA	18	PA	28	T
9	T	19	T	29	PA
10	PC	20	DPG	30	DPG

15. Compus conform revendicării 14, în care compusul cu formula (IX) are formula (IXa):

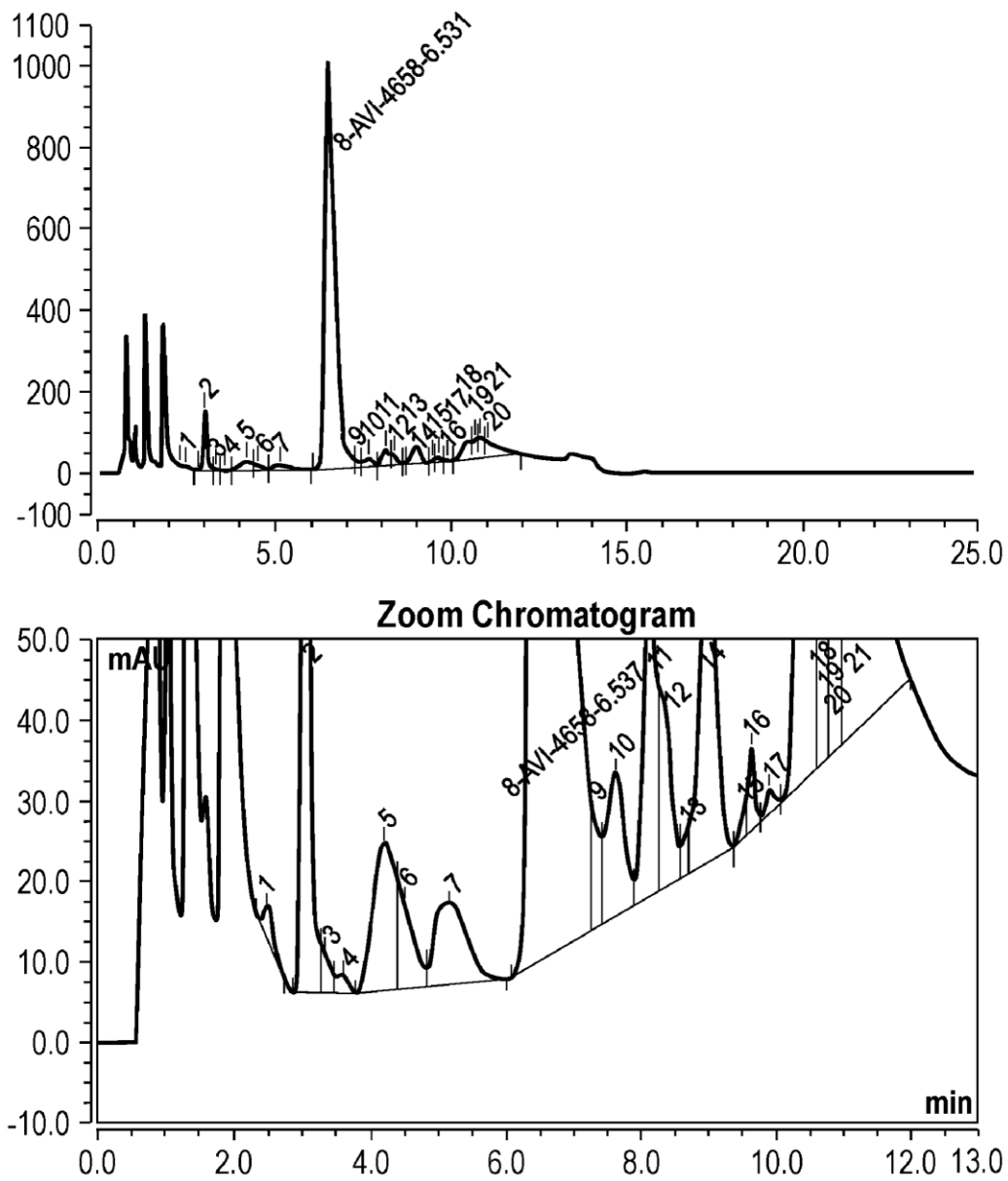


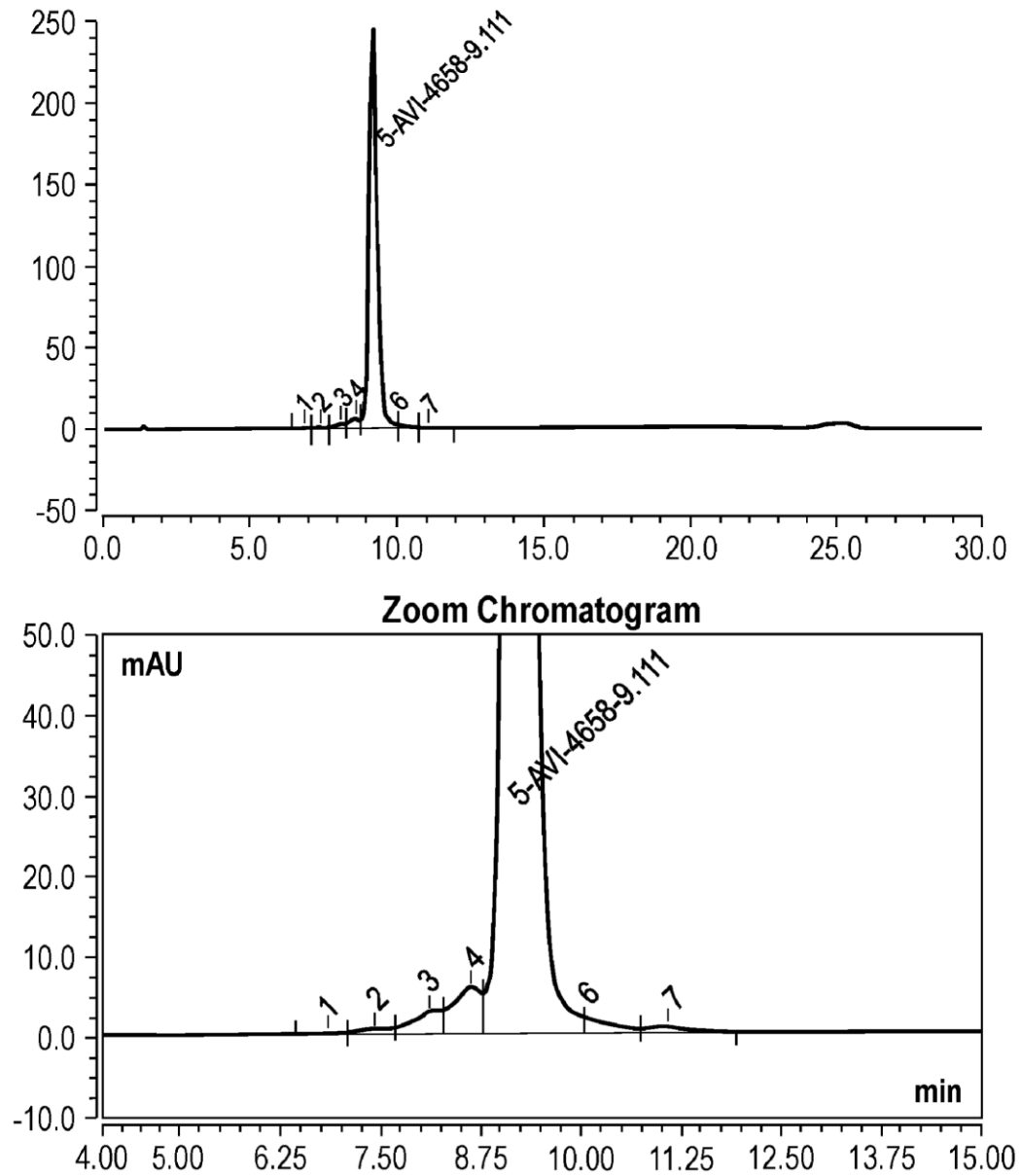
R^2 este selectat, independent la fiecare apariție, din grupul constând din:



Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
1	PC	11	PA	21	DPG
2	T	12	PA	22	PC
3	PC	13	DPG	23	PA

Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²	Poziția nr. 5' la 3'	R ²
4	PC	14	DPG	24	T
5	PA	15	PA	25	T
6	PA	16	PA	26	T
7	PC	17	DPG	27	PC
8	PA	18	PA	28	T
9	T	19	T	29	PA
10	PC	20	DPG	30	DPG

**Fig. 1**

**Fig. 2**

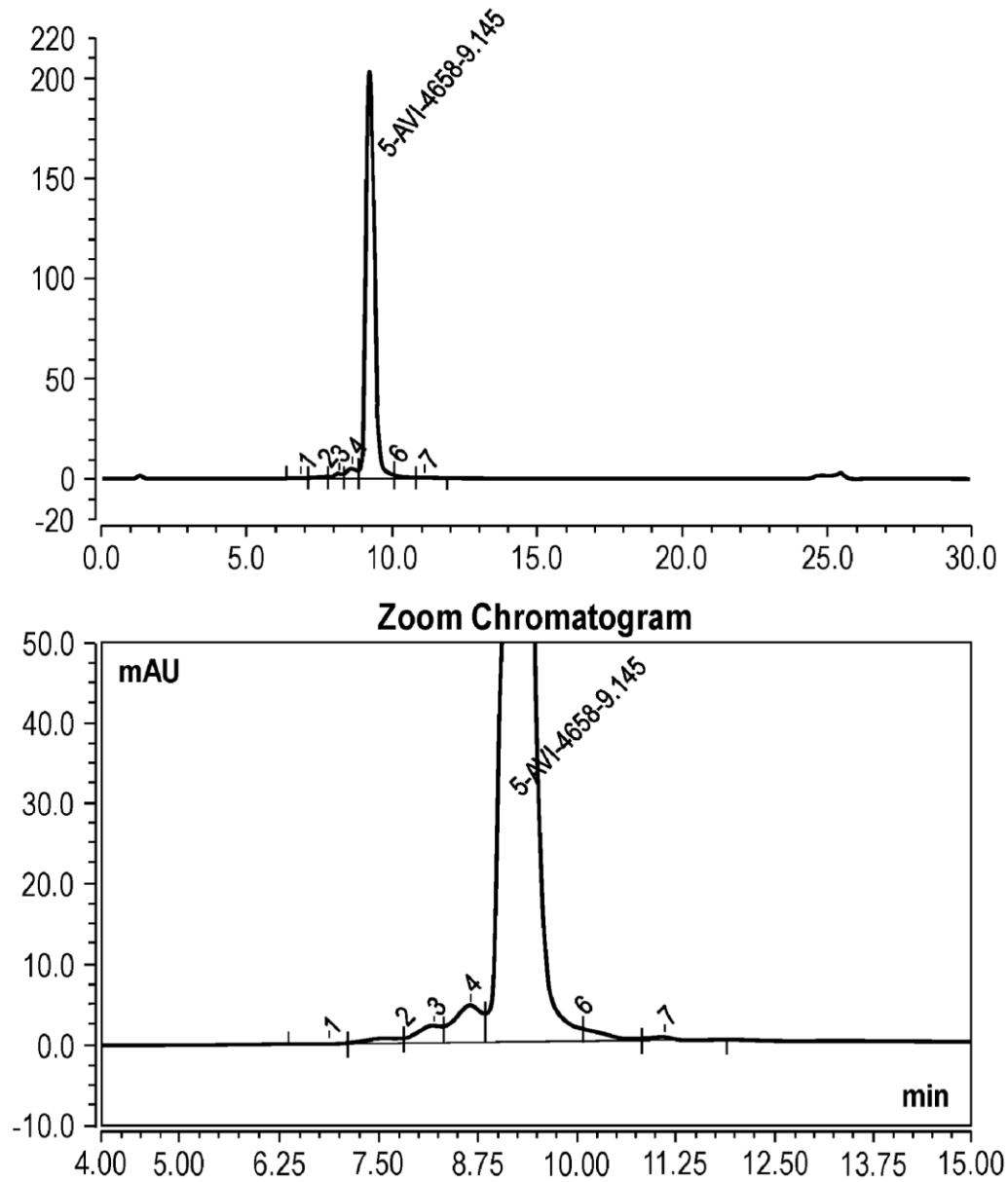


Fig. 3