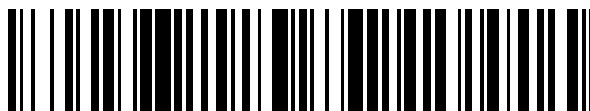


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 479 393**

51 Int. Cl.:

C07D 473/18 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2008** **E 08850132 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014** **EP 2207779**

54 Título: **Método de síntesis de oligómeros de morfolino**

30 Prioridad:

15.11.2007 US 988200 P
15.11.2007 US 988192 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.07.2014

73 Titular/es:

SAREPTA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
3450 Monte Villa Parkway, Suite 101
Bothell, Washington 98021, US

72 Inventor/es:

FOX, CHRISTINA MARY JOSEPHINE;
REEVES, MATTHEW DALE;
WELLER, DWIGHT D. y
LI, YONGFU

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 479 393 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de síntesis de oligómeros de morfolino

Campo de la invención

La invención se refiere a métodos para sintetizar oligómeros de morfolino con fosforodiamidato ligado por acoplamiento de monómeros de subunidades de morfolino, y en particular, a la mejora de los procedimientos para la desprotección del nitrógeno del anillo morfolino protegido en cada etapa de acoplamiento, y a la utilización de subunidades de guanina morfolino (MoG) con protección tanto en los grupos N2 como en los O6/N1 de la base guanina. Los oligómeros de morfolino sintetizados que utilizan estas modificaciones se obtienen con mayor pureza y rendimiento en comparación con los sintetizados utilizando subunidades de guanina monoprotegidas y/o procedimientos de desprotección de nitrógeno del anillo convencionales.

Referencias

Albert, A., *Physical Methods in Heterocyclic Chemistry*, Vol. I, A. R. Katritzky, Ed., Academic Press, págs. 44 (1963).

Fisher, A., Galloway, W.J., and Vaughan, J., *J. Chem. Soc.* 3591 (1964).

Garrison, A.W. and Boozer, C.E., *J. Am. Chem. Soc.* 90(13):3486-3494 (1968).

Gough *et al.* (1979) *Nucleic Acids Research* 7:1955-1964.

Hata *et al.* (1983) *Tetrahedron Lett.* 24:2775-2778. Jones *et al.* (1982A) *Tetrahedron Lett.* 23:2253-2256.

Jones *et al.* (1982B) *Tetrahedron Lett.* 23:2257-2260.

Mitsunobu, O. (1981) *Synthesis* 1: 1-28.

Ravikumar, V. *et al.*, patente de EE.UU. nº 5.510.476.

Reese *et al.* (1981) *Tetrahedron Lett.* 22:4755-4758.

Reese *et al.* (1984) *J. Chem. Soc.*, Perkin Trans. I 1263-1270.

Rogne, O., *J. Chem. Soc.* 727 (1970).

Summerton, J.E. y Weller, D.D. (1993) patente de EE.UU. nº 5.185.444.

Summerton, J.E. y Weller, D.D., *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 7(3):187-195 (1997).

Antecedentes

Los oligómeros de morfolino con fosforodiamidato ligado, u OMP, son análogos de ácidos nucleicos que se unen fuertemente y la secuencia específicamente al ARN complementario y que son útiles en la modulación de la síntesis de proteínas y por lo tanto de la expresión génica. Estos oligómeros se componen de restos de reconocimiento de emparejamiento de bases (bases heterocíclicas) con el apoyo de un sistema troncal de morfolino. Las subunidades de morfolino para su utilización en la síntesis de dichos oligómeros se pueden preparar fácilmente a partir de los ribonucleósidos correspondientes, que están fácilmente disponibles y de precursores económicos (véase p. ej., Summerton y Weller, 1993, 1997).

Durante dicha síntesis, como en la síntesis convencional de oligonucleótidos, los grupos funcionales en las bases heterocíclicas suelen estar enmascarados para evitar la interferencia en las transformaciones sintéticas. Por ejemplo, la activación del monómero N-morfolino tritilado (1a-f; Figura 1) conlleva la reacción del 5'-hidroxilo con un fosforamido diclorurato adecuado para formar la subunidad activada 2a-f. A gran escala (reactor de 50-100 galones), la subunidad activada en bruto generalmente se contamina con un alto nivel de subproductos. Después de la purificación cromatográfica, la subunidad activada se aísla con un rendimiento de aproximadamente 50% para A, C, 1, T, U y sus formas protegidas, pero sólo con un rendimiento de aproximadamente 5% para la subunidad G activada individualmente protegida, lo que se cree que es debido a la presencia del oxígeno O6 sin protección.

La subunidad guanina con O6 sin protección también da lugar a reacciones secundarias en la etapa de oligómero. Por ejemplo, el oxígeno O6 puede reaccionar con la subunidad activada durante las etapas de acoplamiento, para formar especies O6 fosforiladas o derivados, y durante la escisión final de grupos protectores de la base con amoníaco, el amoníaco puede reaccionar en C6 para desplazar estas especies, dando un derivado de diaminopurina. Dichas impurezas son difíciles de eliminar por cromatografía, y originan una gran pérdida de rendimiento.

Se han propuesto varios esquemas de protección en la técnica para reducir las reacciones secundarias de las posiciones de guanina con O6 sin protección en la síntesis convencional de oligonucleótidos (véase, por ejemplo

Gough *et al.* 1979; Reese *et al.* 1981, 1984; Jones *et al.* 1982A, 1982B). Sin embargo, estos protocolos no tuvieron éxito en gran medida cuando se aplican a la síntesis de OMP. Por consiguiente, se buscan métodos mejorados para aumentar el rendimiento y la pureza en la síntesis de OMP, en particular en la utilización de subunidades de morfolino G.

- 5 El nitrógeno del morfolino de una subunidad de morfolino también está protegido antes de su uso, normalmente con una especie de tritilo o tritilo sustituido. Durante la síntesis de oligómeros, este grupo debe ser eliminado durante cada ciclo para permitir la incorporación de la siguiente subunidad. Si no se retira completamente el grupo protector conduce a secuencias de eliminación de N-1 que contaminan el producto oligomérico deseado.

- 10 Los grupos tritilo se eliminan convencionalmente con ácido, y los reactivos de desprotección utilizados para la síntesis de OMP han sido tradicionalmente los ácidos carboxílicos (Summerton *et al.* 1993, 1997). Sin embargo, los grupos de fosfordiamidato también son sensibles a ácidos, y los ácidos carboxílicos útiles para destritolación también pueden promover la hidrólisis de enlaces fosfordiamidato a especies de amidato, como se muestra en la Fig. 1, con la posibilidad de degradación más extensa del eje central. Por ejemplo, el ácido cianoacético en acetonitrilo al 20%/DCM es un reactivo de desprotección efectiva, pero se constata que causa hidrólisis sustancial (5-10%) de enlaces fosfordiamidato en el producto OMP.

Los ácidos carboxílicos también deben ser eliminados completamente de la resina soporte de la síntesis antes de la reacción de acoplamiento; de otro modo, se forman subproductos que consisten en oligómeros truncados que contienen una especie 3'-acilada.

- 20 El documento US nº 5.185.444 (A) describe una composición polimérica que comprende: estructuras de subunidades de morfolino unidas por enlaces quirales, sin carga, de uno a tres átomos de longitud. Estos enlaces quirales se unen al nitrógeno del morfolino de una subunidad al carbono 5' exocíclico de una subunidad adyacente. Cada subunidad contiene un resto de emparejamiento de bases purínicas o pirimidínicas eficaz para unir por enlace de hidrógeno a una base específica o a un par de bases en un polinucleótido objetivo.

- 25 El documento US 2007/135333 (A1) se refiere a un conjugado complementario antibacteriano y a un método de utilización del mismo para el tratamiento de una infección bacteriana en un mamífero anfitrión. El conjugado comprende un oligonucleótido complementario sustancialmente sin carga conjugado a una concentración un péptido portador que aumenta significativamente la actividad bacteriana del oligonucleótido. El oligonucleótido complementario contiene 10 a 20 bases nucleotídicas y tiene una secuencia objetivo de ácido nucleico complementaria con una secuencia objetivo que contiene dentro de diez bases, en dirección aguas abajo, del codón de partida de la traducción de un ARNm bacteriano que codifica una proteína bacteriana esencial para la multiplicación bacteriana, donde el compuesto se une a un ARNm diana con una Tm entre 50° a 60°C. El péptido portador es un péptido rico en arginina que contiene entre 6 y 12 aminoácidos.

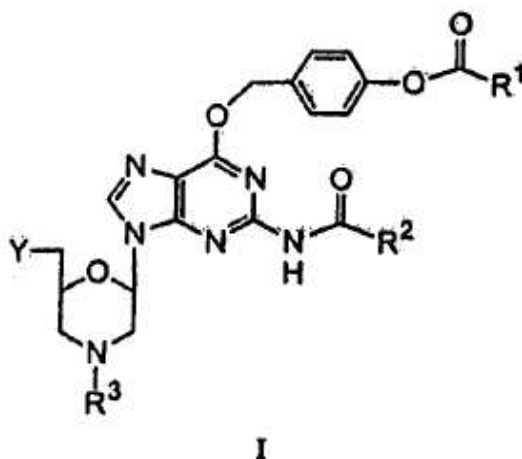
- 30 El documento WO 2008/008113 (A1) describe un método para aumentar la actividad antibacteriana de un oligonucleótido complementario compuesto de subunidades de morfolino unidas por enlaces entre las subunidades que contienen fósforo. El método comprende uno o ambos de los siguientes: conjugar un portador rico en arginina con el extremo 3' o 5' del oligonucleótido y modificar el oligonucleótido para que contenga 20% a 50% de enlaces entre las subunidades que están positivamente cargadas a pH fisiológico.

- 40 El documento WO 2008/036127 (A2) describe oligómeros de morfolino que contienen enlaces entre las subunidades tanto sin carga como catiónicos. Los oligómeros son análogos de oligonucleótidos que contienen secuencias predeterminadas de restos para emparejamiento de bases. La presencia de los enlaces catiónicos entre las subunidades en los oligómeros, normalmente a un nivel de aproximadamente 10 a 50% de la totalidad de los enlaces, se señala que proporciona aumento de la actividad complementaria con relación a los oligómeros sin carga correspondientes. El documento WO 2008/036127 describe además dichos oligómeros conjugados con restos de transportadores de péptidos, donde los transportadores están compuestos preferiblemente de subunidades de arginina, o de dímeros de arginina, alternando con subunidades de aminoácidos neutros.

Por las razones anteriores, es necesario mejorar los reactivos para la desprotección del nitrógeno del morfolino en la síntesis de OMP.

Compendio

En un aspecto, la invención proporciona un compuesto de morfolino que comprende la estructura I:



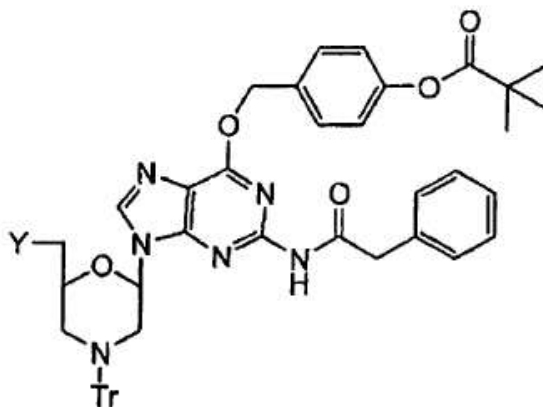
en donde

R¹ se selecciona del grupo que consiste en alquilo inferior, di(alquilo inferior)amino; y fenilo;

R² se selecciona del grupo que consiste en alquilo inferior, arilmetilo monocíclico, y (ariloxi)metilo monocíclico;

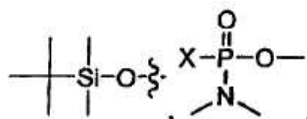
5 R³ se selecciona del grupo que consiste en triarilmetilo e hidrógeno; e

Y se selecciona del grupo que consiste en un grupo hidroxilo o amino protegido o sin proteger; un grupo clorofosforamidato; y un enlace de fosfordiamidato al nitrógeno del anillo de otro compuesto de morfolino un enlace de fosforamidato al nitrógeno del anillo de morfolino de una subunidad de morfolino en un oligómero de morfolino o en un soporte sólido. La expresión alquilo inferior define un radical alquilo de uno a seis átomos de carbono. El compuesto no tiene la estructura siguiente:



En esta estructura:

Y es -OH,



15 donde X es Cl, el nitrógeno del anillo de otro compuesto de morfolino, el nitrógeno del anillo de morfolino de una subunidad de morfolino en un oligómero de morfolino o un soporte sólido. En la estructura anterior Tr es tritilo.

En formas de realización seleccionadas, Y se selecciona del grupo que consiste en un grupo hidroxilo protegido o no protegido y un grupo clorofosforamidato, p. ej., un grupo clorofosforamidato de la forma-OP(=O)-N(CH₃)₂Cl. Cuando Y es un grupo hidroxilo protegido, es preferiblemente un grupo hidroxilo protegido con trialkilsililo.

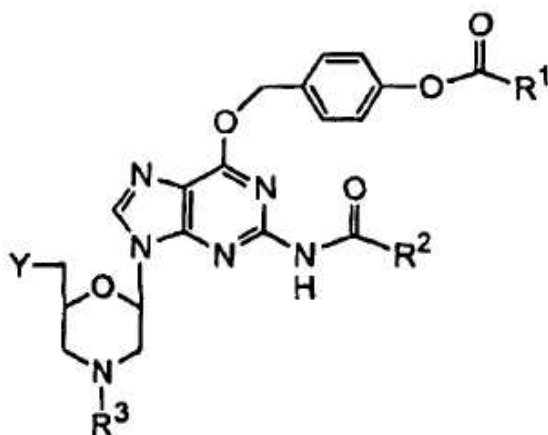
20 El grupo R³ se selecciona preferiblemente de tritil(trifenilmetilo), 4-metoxitritilo, 4-metiltritilo, 4,4'-dimetiltritilo, y 4,4',4''-trimetiltritilo. El grupo R¹ es preferiblemente alquilo inferior, especialmente alquilo C₁-C₄, y más particularmente

-C(CH₃)₃ (terc-butilo). El grupo R² se selecciona preferiblemente de bencilo y -CH(CH₃)₂ (isopropilo).

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método mejorado de sintetizar un oligómero de morfolino, comprendiendo el método:

- 5 (a) hacer reaccionar una subunidad de morfolino sobre soporte en fase sólida, que tiene un nitrógeno del anillo desprotegido, con un primer monómero de la subunidad de morfolino protegida, que tiene un nitrógeno del anillo protegido con triarilmetilo y un grupo fosforamidato activado en un carbono 5' exocíclico, formando de este modo un enlace fosfordiamidato entre el carbono 5' exocíclico y el nitrógeno del anillo desprotegido;
- (b) desproteger el nitrógeno del anillo protegido, para formar un nitrógeno del anillo sin protección;
- 10 (c) opcionalmente hacer reaccionar el producto de la etapa (b) con otro monómero de la subunidad de morfolino que comprende: un nitrógeno del anillo de morfolino protegido con triarilmetilo y un grupo de fosforamidato activado en un carbono 5' exocíclico del otro monómero de la subunidad de morfolino y el nitrógeno del anillo de morfolino desprotegido del producto de la etapa (b); y
- (d) opcionalmente repetir las etapas (b) y (c) una o más veces.

- 15 En este método al menos uno del primer monómero de la subunidad de morfolino, el otro monómero de la subunidad de morfolino o el monómero de la subunidad de morfolino sobre soporte en fase sólida es un compuesto de morfolino guanina con doble protección que tiene la estructura 1:



En esta estructura R¹ se selecciona del grupo que consiste en alquilo inferior, di(alquilo inferior)amino, y fenilo;

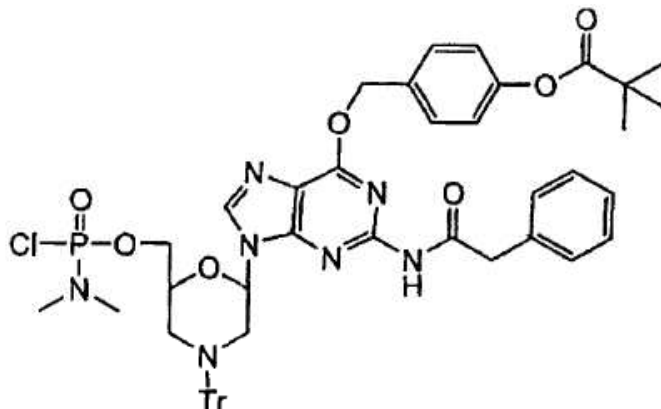
R² se selecciona del grupo que consiste en alquilo inferior, arilmetilo monocíclico, y (ariloxi)metilo monocíclico;

- 20 R³ se selecciona del grupo que consiste en triarilmetilo e hidrógeno; e

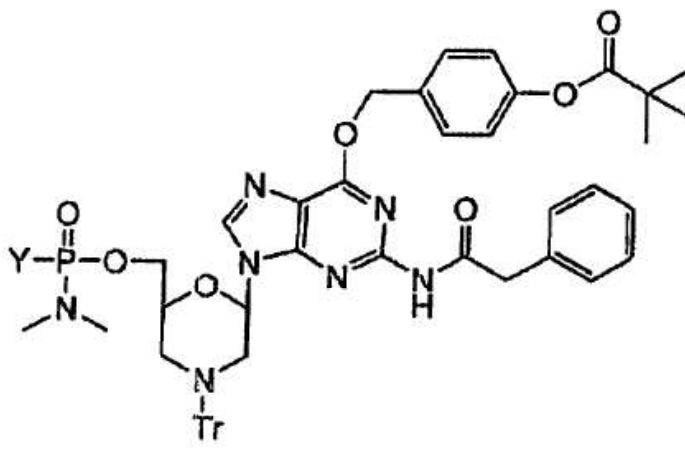
Y es un grupo clorofosforamidato o un soporte sólido.

A este respecto la expresión alquilo inferior define un radical alquilo de uno a seis átomos de carbono.

El compuesto guanina morfolino con doble protección no tiene la estructura siguiente:



o:



en donde Y es un soporte sólido y Tr es tritilo.

5 Las formas de realización seleccionadas de las variables representadas en la estructura anterior incluyen las descritas anteriormente.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método mejorado para sintetizar un oligómero de morfolino, que comprende:

10 (a) hacer reaccionar una subunidad de morfolino sobre soporte en fase sólida, que tiene un nitrógeno del anillo sin protección, con un monómero de la subunidad de morfolino protegida con bases, que tiene un nitrógeno del anillo protegido con triarilmetilo y un grupo fosoramidato activado en un carbono 5' exocíclico, formando de este modo un enlace fosfordiamidato entre el carbono 5' exocíclico y el nitrógeno del anillo sin protección;

(b) desproteger el nitrógeno del anillo protegido, para formar un nitrógeno del anillo sin protección; y

(c) repetir las etapas (a) y (b) una o más veces con otros monómeros de subunidades de morfolino protegida con bases;

15 en donde dicha desprotección comprende exponer el nitrógeno del anillo protegido con triarilmetilo a una solución de reactivo que comprende una sal de amina heterocíclica en un disolvente que contiene trifluoroetanol, siendo la sal una sal de una amina heterocíclica, que tiene un pKa comprendido en el intervalo de 1-4 en su forma protonada, con un ácido seleccionado de un ácido sulfónico, ácido trifluoroacético y ácido clorhídrico.

20 La amina heterocíclica se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en: piridina, tiazol, piridazina, pirazol, triazol sustituidos con un grupo de extracción de electrones y derivados sustituidos de estos del grupo sustituido de extracción de electrones. Dichos grupos receptores de electrones (GRE) incluyen halógeno, ciano, aldehído, ceto, carboxiéster y carboxamida.

25 Preferiblemente, la amina heterocíclica es un grupo piridina sustituido de extracción de electrones, tal como una piridina sustituido con cloro o ciano. La sal de amina es preferiblemente una sal de un ácido sulfónico, tal como un alquilsulfonato, (fluoroalquil)sulfonato, p-toluensulfonato o un trifluoroacetato. En realizaciones seleccionadas, la sal se selecciona de metansulfonato de 3-cloropiridinio (MCP) y trifluoroacetato de 4-cianopiridinio (CYTFA).

El disolvente que contiene TFE comprende preferiblemente diclorometano y trifluoroetanol en una proporción en volumen comprendida en el intervalo de aproximadamente 90:10 a 25:75, y más preferiblemente en una proporción en volumen de aproximadamente 80:20 de DCM:TFE.

30 El grupo protector triarilmetilo se selecciona del grupo que consiste en tritilo (trifenilmetilo), 4-metoxitritilo, 4-metiltritilo, 4,4'-dimetiltritilo y 4,4',4''-trimetiltritilo.

Las modificaciones y mejoras descritas en la presente memoria pueden combinarse, de tal manera que las etapas (a) - (c) anteriores se llevan a cabo en donde:

35 (i) al menos uno de los monómeros de subunidad morfolino protegido con bases es un compuesto de guanina morfolino con doble protección que tiene la estructura I según se expuso anteriormente; y

(ii) desproteger el nitrógeno del anillo protegido comprende exponer el nitrógeno del anillo protegido con triarilmetilo a una solución de reactivo que comprende una sal de amina heterocíclica en un disolvente que contiene

trifluoroetanol, siendo la sal una sal de una amina heterocíclica, que tiene un pKa comprendido en el intervalo de 1-4 en su forma protonada, con un ácido seleccionado de entre un ácido sulfónico, ácido trifluoroacético y ácido clorhídrico.

5 Generalmente, la síntesis comprende además la escisión del oligómero de morfolino de la fase sólida y la desprotección de las bases, según procedimientos normalizados.

Estos y otros objetos y características de la invención se harán más completamente evidentes cuando se lee la siguiente descripción detallada de la invención junto con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra la formación de una subunidad de morfolino activado.

10 La figura 2 ilustra una ruta de la formación de un derivado de la subunidad de morfolino G con doble protección (GDP) en donde la posición de N2 está fenilacetilada y la posición de O6 está protegida con el grupo 4-nitrofenetilo (NFE).

15 La figura 3 ilustra una ruta alternativa para la formación de un derivado de la subunidad de morfolino G con doble protección (GDP) en donde la posición de N2 está fenilacetilada y la posición de O6 está protegida con el grupo 4-nitrofenetilo (NFE).

La figura 4 ilustra la formación de un derivado de GDP en donde la posición de N2 está fenilacetilada y la posición de O6 está protegida, ya sea con el grupo fenilsulfonietilo (FSE) o metilsulfonietilo (MSE).

La figura 5 ilustra la formación de un derivado de GDP en donde la posición de N2 está fenilacetilada y la posición de O6 está protegida con el grupo trimetilsilietilo (TMSE).

20 La figura 6 ilustra la formación de un derivado de GDP en donde la posición de N2 está fenilacetilada y la posición de O6 está protegida con una serie de derivados de arilo.

La figura 7 ilustra la formación de un derivado de GDP en donde la posición de N2 está fenilacetilada y la posición de O6 está protegida con una serie de derivados de carbamoilo.

25 La figura 8 ilustra la formación del derivado de GDP en donde la posición de N2 está fenilacetilada y la posición de O6 está protegida con el grupo 4-(pivaloiloxi)benciloxi (POB).

La figura 9 muestra la conversión del enlace fosforodiamidato (PDA) en los enlaces fosforamidato (amidato), en una reacción secundaria que puede ocurrir tras el tratamiento de oligómeros de morfolino ligados a fosforodiamidato (OMP) con ácidos carboxílicos.

30 La figura 10 ilustra la preparación de un anclaje de disulfuro, para su utilización en la modificación de una resina de síntesis utilizado para la preparación paso a paso de un oligómero de morfolino, permitiendo la liberación fácil del oligómero por tratamiento con un tiol.

La figura 11 ilustra la preparación de un trietilenglicol que contiene un resto ("cola"), que aumenta la solubilidad acuosa de oligómeros complementarios sintéticos.

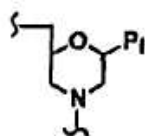
La figura 12 ilustra la preparación de resinas útiles para la síntesis en fase sólida de oligómeros de morfolino.

35 Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

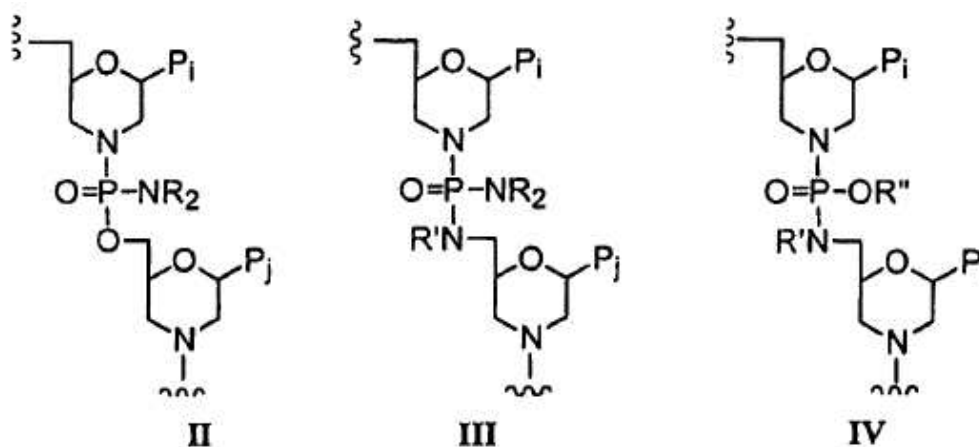
La terminología siguiente, tal como se emplea en la presente memoria, tiene los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario:

40 Un "oligómero de morfolino" se refiere a una molécula polimérica que tiene una cadena principal que soporta bases capaces de unirse por enlaces de hidrógeno a polinucleótidos típicos, en donde el polímero carece de un resto de cadena principal del azúcar pentosa, y más concretamente una cadena principal de ribosa unida por enlaces fosfodiéster que es típica de nucleótidos y nucleósidos, pero en su lugar contiene un átomo de nitrógeno en el anillo con acoplamiento por el nitrógeno del anillo. Un oligómero de morfolino preferido está compuesto de estructuras de la "subunidad de morfolino", como se muestra a continuación, que en el oligómero están preferiblemente unidas entre sí por enlaces (tio)fosforodiamidato, que unen el nitrógeno de morfolino de una subunidad al carbono 5' exocíclico de una subunidad adyacente. Cada subunidad comprende un resto Pi de apareamiento de bases purínicas o pirimidínicas que es eficaz para unirse, por enlace de hidrógeno específico de las bases, a una base en un polinucleótido.



Oligómeros de morfolino se detallan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. e titularidad compartida nº 5.698.685, nº 5.217.866, nº 5.142.047, nº 5.034.506, nº 5.166.315, nº 5.185.444, nº 5.521.063 y nº 5.506.337.

- 5 Un grupo "fosforodiamidato" comprende fósforo que tiene dos átomos de oxígeno unidos y dos átomos de nitrógeno unidos, y en la presente memoria también pueden referirse al fósforo que tienen un átomo de oxígeno unido y tres átomos de nitrógeno unidos. En los enlaces entre subunidades de los oligómeros descritos en la presente memoria, un átomo de nitrógeno suele colgar de la cadena principal, y el segundo nitrógeno es el nitrógeno del anillo en una estructura de anillo de morfolino, como se muestra en la fórmula II a continuación. Alternativamente o además, un nitrógeno puede estar presente en el carbono 5' exocíclico, como se muestra en las fórmulas III y IV a continuación.



- 10 En un enlace tiofosforodiamidato, un átomo de oxígeno, normalmente un oxígeno que cuelga de la cadena principal en los oligómeros descritos en la presente memoria, se sustituye por azufre.

- 15 Una "subunidad de morfolino sobre soporte en fase sólida" puede ser la primera o cualquier monómero de la subunidad morfolino posterior incorporado en un oligómero de morfolino por síntesis por etapas en fase sólida como se describe en el presente documento. La subunidad está unida al soporte sólido, o a una cadena creciente de oligómero sobre el soporte sólido, por su carbono 5' exocíclico. "protegido con bases" se refiere a la protección de los grupos de emparejamiento de bases, p. ej., bases purínicas o pirimidínicas, en las subunidades de morfolino con grupos protectores adecuados para evitar la reacción o la interferencia de los grupos de apareamiento de bases durante la síntesis de oligómeros paso a paso.

- 20 Un "grupo fosforamidato activado" suele ser un grupo clorofosforamidato, con sustitución en el átomo de nitrógeno que se desea en el enlace fosforamidato eventual en el oligómero. Un ejemplo es (dimetilamino)clorofosforamidato, es decir, $-OP(=O)(NMe_2)Cl$.

- 25 Los términos "cargado", "sin carga", "catiónico" y "aniónico" como se emplean en la presente memoria se refieren al estado predominante de un resto químico a pH casi neutro, p. ej. aproximadamente 6 a 8. Preferiblemente, el término se refiere al estado predominante del resto químico a pH fisiológico, es decir, aproximadamente 7,4.

- 30 "Alquilo inferior" se refiere a un radical alquilo de uno a seis átomos de carbono, como por ejemplo metilo, etilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo, isoamilo, n-pentilo e isopentilo. En formas de realización seleccionadas, un grupo "alquilo inferior" tiene de uno a cuatro átomos de carbono, o 1 a 2 átomos de carbono; es decir, metilo o etilo. Análogamente, "alquenilo inferior" se refiere a un radical alquenilo de dos a seis, preferiblemente tres o cuatro, átomos de carbono, como por ejemplo alilo y butenilo.

II. Protección de bases en la síntesis de OMP

- 35 Debido a los desafíos específicos de la química del morfolino, un grupo protector de bases debe cumplir varios requisitos. El grupo protector debe ser introducido fácilmente en el resto heterocíclico y, posteriormente, ser estable a la activación de la subunidad y las condiciones de purificación, y la síntesis en fase sólida. El grupo protector no debe ser reactivo con el resto de amina morfolino de la cadena en crecimiento, y debe permitir que la subunidad de morfolino activado se acople limpiamente con la cadena de oligómero en crecimiento. El grupo protector debe escindirse, preferiblemente con amoníaco, sin introducir nuevas impurezas. Por último, debe dar lugar a derivados

de subunidades cristalinas, con el fin de evitar la necesidad de la purificación cromatográfica antes de la activación.

Como se describe a continuación y en los ejemplos comparativos, los grupos protectores descritos en la bibliografía para guaninas con doble protección, tal como se utiliza para la síntesis de ácidos nucleicos, no cumplen adecuadamente estos criterios. Por lo tanto, se requiere una nueva estrategia de protección para las subunidades de morfolino G. Como se describe a continuación, se constató que la utilización del grupo 4-(pivaloiloxi)benciloxi en 06 cumple a) de los criterios anteriores.

A. Grupos Protectores 06: Datos comparativos

A1. Éter 4-nitrofenético (NFE)

Este derivado se preparó como se muestra en la figura 2 (Mitsunobu 1981) o en la figura 3 (Jones *et al.* 1982B). Aunque la subunidad 06 protegida en bruto podría prepararse con rendimiento razonable, el compuesto no era fácilmente cristalino y pudo purificarse adecuadamente sólo por cromatografía en gel de sílice, lo que es indeseable para la producción a gran escala. Después de probar una amplia gama de condiciones de resuspensión y/o recristalización, se constató que las combinaciones de disolventes que contienen butoxietanol podrían, con cierta dificultad, cristalizar el material. Sin embargo, el exceso de butoxietanol no pudo eliminarse del producto final, ya que el compuesto cristalizó probablemente como solvato. La presencia de disolvente alcohólico en exceso no sería aceptable en la reacción de activación.

El grupo NFE se escinde con una base fuerte mediante un mecanismo de β -eliminación. Estas condiciones tienden a generar el reactivo subproducto 4-nitrostireno, que puede reaccionar a continuación con zonas reactivas en el oligómero. Aunque se introdujeron varios agentes antioxidantes (p. ej., tioles y 1,3-dicarbonilo) en la mezcla de desprotección en un intento de evitar la captura del subproducto por el oligómero, ninguno logró un éxito completo en la eliminación de este problema de retorno interno. Incluso después de la purificación, los oligómeros preparados con esta subunidad tenían un tinte amarillo.

A2. Fenilsulfoniletilo (FSE) y metilsulfoniletilo (MSE)

Estos grupos se introdujeron mediante los correspondientes derivados de 2-tioetanol (Jones *et al.* 1982A, 1982B), como se muestra en la figura 4. Sin embargo, no pudo encontrarse ningún procedimiento de cristalización con éxito para las subunidades resultantes.

Al igual que el grupo de NFE, anteriormente, estos grupos se escinden por un mecanismo de β -eliminación. Después de la incorporación a un oligómero, estos derivados dieron los mismos problemas observados con el grupo NFE; es decir, retorno interno del subproducto alqueno reactivo formado durante la desprotección.

A3. Éter trimetilsililetilico

Según señaló Jones (Jones *et al.* 1982B), se preparó una subunidad de morfolino guanina modificada por 06-TMSE como se muestra en la figura 5, pero no era estable durante la síntesis de oligómeros. Los oligómeros preparados con esta subunidad mostraron una gama de subproductos secundarios similares a los preparados a partir de subunidades G no protegidas con 06.

A4. Éter fenílico

Se prepararon subunidades de morfolino guanina con la sustitución de 06-fenilo (Figura 6) según el procedimiento de Reese *et al.* (1981, 1984). Los derivados incluían fenilo no sustituido, 2,5-diclorofenilo, pentafluorofenilo y 3-fluorofenilo. Dichas subunidades podrían incorporarse en OMP, pero la desprotección con los reactivos habituales, tales como oxima de 2-nitrobenzaldehído y base fuerte, no pudo llevarse a cabo hasta la terminación sin degradación del oligómero.

A5. Carbamato

Se sintetizaron varios derivados de 06-carbamato, según el procedimiento de Hata *et al.* 1983 (Figura 7). El empleo de estos derivados en la síntesis de oligómeros dio resultados variables en función del derivado usado. Para las especies más lábiles, tales como el análogo de difenilcarbamoilo, la transferencia del grupo protector al nitrógeno en 3' de la cadena en crecimiento se observó durante la etapa de acoplamiento de la síntesis en fase sólida, dando lugar a oligómeros truncados que contenían un resto de 3'-difenilcarbamoilo. Además, los 06-carbamatos tienen dos posibles zonas de reacción con amoníaco. Mientras que los restos más reactivos, tales como el grupo difenilcarbamoilo dieron ataques relativamente selectivos en el carbonilo, los carbamatos de dimetilo y pirrolidinilo más estables mostraron reacción significativa de competencia de amoníaco en la posición C6, con la conversión a diaminopurina.

B. Grupo protector 4-(pivaloiloxi)benciloxi

Se introdujo alcohol de 4-(pivaloiloxi)benciloxi (4a, Figura 8) en la subunidad guanina morfolino mediante una síntesis eficiente, de alto rendimiento. La subunidad antes de la activación (compuesto **1f** en las figuras 1 y 8) puede

sin sintetizarse y aislarse de forma reproducible a gran escala sin purificación cromatográfica, y puede cristalizarse en una variedad de disolventes (p. ej., THF/agua, THF/heptano, acetonitrilo, diversas mezclas de éster/hidrocarburo). Diez lotes de esta subunidad preparados a escala 50-200 galones (tamaño del lote: 8 a 27 kg de compuesto 1c) dieron un rendimiento promedio de 65% de producto, con una pureza (por HPLC) de 97,6% a 99,2%.

- 5 La subunidad se convierte en subunidad activada (es decir, conversión en el compuesto 5'-clorofosforamido) mucho más limpiamente que la G monoprottegida, y puede purificarse más fácilmente por cromatografía en gel de sílice. A escala, rendimiento global desde el compuesto **1f** al compuesto **2f** (Fig. 1) es de aproximadamente 50%.

- 10 El grupo protector POB puede emplearse con otras combinaciones de grupos protectores para el N2 y nitrógenos del anillo de morfolino. Los grupos protectores de N2 adecuados comprenden fenilacetilo (como se ilustra en la Fig. 8), así como acetilo, propionilo, isobutirilo y fenoxiacetilo. La especie tritilo adecuada para la protección del nitrógeno del anillo de morfolino entre las etapas de acoplamiento comprenden tritilo no sustituido, 4-metil-, 4,4'-dimetil-, y 4,4',4"-trimetiltritilo y 4-metoxitritilo.

Otros grupos protectores acilo pueden también utilizarse en lugar de pivaloilo para el resto fenol del grupo POB. Alternativas adecuadas comprenden N, N-dimetilcarbamoilo y benzoilo.

- 15 Durante la síntesis de OMP, no se ven productos en donde el grupo pivaloilo ha llegado a estar unido al terminal 3' de fragmentos más pequeños del OMP completo, una reacción secundaria común a los 06-carbamatos se expuso anteriormente. El único producto secundario notable detectado fue un OMP que contiene un resto fenólico, resultante de la reacción con subproducto de desprotección quinona metida. Sin embargo, este subproducto podría reducirse a niveles de vestigios por dilución suficiente de la solución amoniacal de desprotección. Además, se elimina fácilmente en virtud del enlace fuerte del resto fenólico a las resinas poliméricas utilizadas para la cromatografía de intercambio aniónico fuerte. En general, el rendimiento global de OMP purificada se incrementa en gran medida, como se ve en la Tabla 1.

- 25 La mejora en la producción OMP fomentado por el grupo guanina protegido con POB es más evidente en la purificación después síntesis de OMP en fase sólida, donde la dificultad en la eliminación de diaminopurina y subproductos relacionados puede conducir a la pérdida severa durante la cromatografía de intercambio aniónico fuerte (SAX). Por ejemplo, las purezas en bruto para AVI-4126 preparado con la RPC y MPG (subunidad guanina monoprottegida, 2c) están comprendidas en el intervalo de 68-73%, que calcula a aproximadamente 58% de rendimiento bruto del OMP. Durante las purificaciones tritil-on y tritil-off, se pierde material significativo para obtener el producto puro, y la recuperación total en la cromatografía es del 52%. Para el AVI-4126 realizado utilizando CYTFA y GDP (subunidad de guanina diprottegida), las purezas en bruto son 70-75%, con niveles NI comparables por espectrometría de masas (lo que indica que las eficiencias de destritolación de CYTFA y los reactivos de MCP son aproximadamente equivalentes) y los rendimientos en bruto de aproximadamente 61%. Sin embargo, la aplicación de los métodos habituales recupera el 80% del OMP de la mezcla en bruto.

Tabla 1.

PMO AVI-	SEC. ID. n°:	Secuencia	Reactivo de destritolación ¹	Monómero de guanina	Escala ²	Rendimiento
4126	1	ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	CAA	2c	54 g ³	18%
4557	2	CTGGGATGAGAGCCATCACT	CAA	2c	24 g ⁴	18%
"	"	"	CAA	2c	48 g ⁵	15%
4126	1	ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	MCP	2c	25 g	25%
"	"	"	MCP	2c	25 g	27%
"	"	"	MCP	2c	25 g	30%
4020	3	CTTAGTCATCGAGATCTTCGTG	MCP	2c	30 g	32%
4126	1	ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	CYTFA	2f	25 g	49%

PMO AVI-	SEC. ID. n°:	Secuencia	Reactivo de destritilación ¹	Monómero de guanina	Escala ²	Rendimiento
4065	4	GTGCTCATGGTGCACGGTC ⁶	CYTFA	2f	120 g	46%
"	"	"	CYTFA	2f	120 g	49%
"	"	"	CYTFA	2f	120 g	50%

Se realizaron síntesis según los métodos descritos en la solicitud US 2009/0088562 A1 de EE.UU. en cotitularidad utilizando las modificaciones indicadas en la tabla; véanse los ejemplos 3-6 a continuación. Todos OMP tiene una "cola" en 5' y no están sustituidos en el extremo 3'.

¹ACA = Ácido cianoacético al 11% (p/p) en una mezcla de acetonitrilo al 20%/DCM (v/v); MCP = metansulfonato de 3-cloropiridinio al 2% (p/v) y etanol al 0,9% (v/v) en trifluoroetanol al 20%/DCM (v/v); CYTFA = 2% trifluoroacetato de 3-cianopiridinio (p/v) y "etanol al 0,9% (v/v) en trifluoroetanol al 20%/DCM (v/v).

²Escama es el peso de resina de partida en gramos. La carga de resina es 480 a 520 micromoles/g

³Producción combinada de series de 4x12 g y 1x8 g.

⁴Producción combinada de series de 2x12 g.

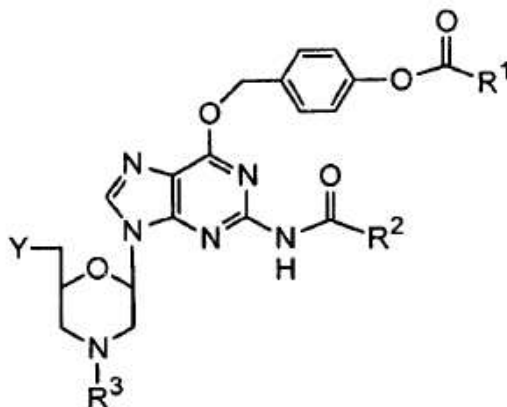
⁵Producción combinada de series de 4x12 g.

⁶La adición de la subunidad C final se realizó con una subunidad de morfolino C activada con protección de 4-metoxitritilo en el nitrógeno de morfolino.

Por lo tanto, la utilización del monómero MoG con doble protección de la invención proporciona un método para sintetizar un oligómero de morfolino en un mayor rendimiento purificado en relación con los métodos de la técnica anterior, y en particular en comparación con los rendimientos purificados observados cuando se emplea un monómero MoG monoprotegido, u otro monómero de MoG protegido no de la invención. En particular, el método genera preferiblemente un nivel reducido de la especie diaminopurina que la que se obtuvo usando un monómero MoG no de la invención.

III. Subunidades de guanina morfolino con doble protección

Las subunidades de guanina morfolino con doble protección (GDP) de la invención tienen la estructura



donde

R¹ se selecciona del grupo que consiste en alquilo inferior, di(alquilo inferior)amino y fenilo;

R² se selecciona del grupo que consiste en alquilo inferior, arilmetilo monocíclico y (ariloxi) metilo monocíclico;

R³ se selecciona del grupo que consiste en triarilmetilo e hidrógeno; e

Y se selecciona del grupo que consiste en: un grupo hidroxilo o amino protegido o no protegido; un grupo clorofosforamidato; y un enlace de fosforodiamidato al nitrógeno del anillo de un compuesto morfolino más o un oligómero de morfolino.

En formas de realización seleccionadas, Y es un grupo hidroxilo protegido o no protegido (como en el monómero preactivado) o un grupo clorofosforamidato (como en el monómero activado). Los grupos protectores preferidos para el grupo hidroxilo incluyen grupos trialkilsililo, tales como terc-butildimetilsililo (TBDMS).

Las formas de realización en las que Y es un enlace fosfordiamidato con el nitrógeno del anillo de otro compuesto de morfolino, o un enlace fosfordiamidato con un oligómero de morfolino, se refieren a las especies formadas durante la síntesis de un oligómero de morfolino, antes de la desprotección de la base.

5 Como se expone a continuación, los sustituyentes en el grupo clorofosforamidato (en el monómero activado) pueden variar dependiendo del enlace fosfordiamidato específico deseado.

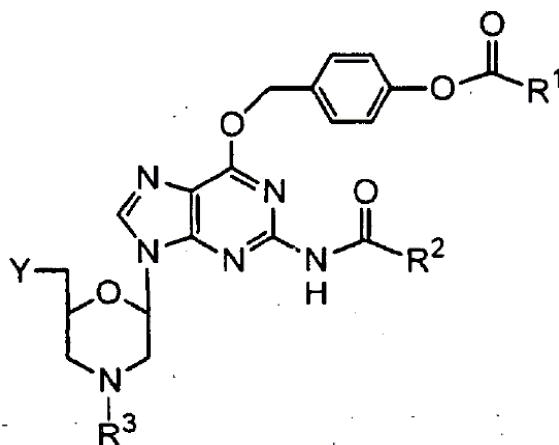
La invención también proporciona, respectivamente, un método de síntesis de un oligómero de morfolino, método que comprende:

10 (a) hacer reaccionar una subunidad de morfolino sobre soporte en fase sólida, que tiene un nitrógeno del anillo sin protección, con un monómero de la subunidad de morfolino protegida por una base, que tiene un nitrógeno del anillo protegido con triarilmetilo y un grupo fosforamidato activado en un carbono 5' exocíclico, formando de este modo un enlace fosfordiamidato entre dicho carbono 5' exocíclico y dicho nitrógeno del anillo sin protección;

(b) desproteger dicho anillo con nitrógeno protegido, para formar un anillo con nitrógeno sin protección; y

(c) repetir las etapas (a) y (b) una o más veces con otros monómeros de subunidades de morfolino protegidos con bases;

15 en donde al menos uno de dichos monómeros de subunidades de morfolino protegidos con bases es un compuesto de morfolino guanina con doble protección que tiene la estructura:



en donde

R¹ se selecciona del grupo que consiste en alquilo inferior, di(alquilo inferior)amino y fenilo;

20 R² se selecciona del grupo que consiste en alquilo inferior, arilmetilo monocíclico y (arilo)metilo monocíclico;

R³ se selecciona del grupo que consiste en triarilmetilo e hidrógeno; e

Y es un grupo clorofosforamidato.

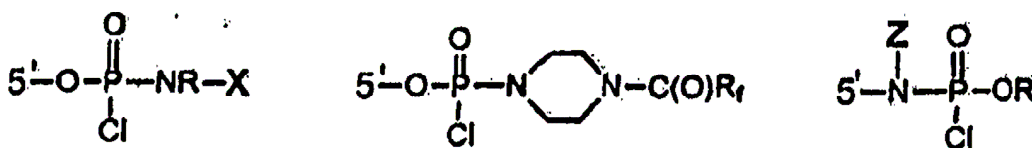
Los grupos protectores triarilmetilo preferidos para el nitrógeno del anillo morfolino (R³) comprenden tritil(trifenilmetilo), 4-metoxitritilo, 4-metiltritilo, 4,4'-dimetiltritilo y 4,4',4''-trimetiltritilo.

25 El sustituyente R¹ en el grupo protector 06 es preferiblemente alquilo C₁ a C₄, especialmente -C(CH₃)₃ (terc-butilo), como en el grupo 4-(pivaloilo)benzilo (POB). Sin embargo, R¹ puede ser también de di(alquilo inferior)amino, tal como dimetilamino o fenilo.

30 Como se señaló anteriormente, la sustitución del grupo Y clorofosforamidato en monómeros "activados" varía en función de la estructura del enlace fosfordiamidato deseada. Para la preparación del enlace OMP "estándar" sin carga 5'-OP(=O)(-N(CH₃)₂)-3' (como se muestra en la Fórmula II anterior en donde R es metilo), el grupo Y clorofosforamidato es 5'-OP(=O)Cl-NR₂ (véase, p. ej. el compuesto 2f, Figura 8).

35 Como se describe en la solicitud en cotitularidad presentada el 10 de mayo de 2007, se pueden obtener propiedades ventajosas al preparar los OAP con enlaces catiónicos así como neutros entre las subunidades. En dichos oligómeros, al menos un enlace entre las subunidades entre dos estructuras con anillo morfolino consecutivas contiene un grupo catiónico colgante. El grupo colgante lleva un átomo de nitrógeno distal que puede llevar una carga positiva a pH neutro o casi neutro (por ejemplo fisiológico).

Para la preparación de dichos enlaces, el grupo Y clorofosforamidato en los monómeros de subunidades de la invención puede tener una de las siguientes estructuras:



donde R es alquilo inferior, tal como metilo o etilo;

- 5 X = -R⁴-NHC(=O)R_f, donde R⁴ es alquilo bivalente u oligo PEG y R_f es metilo etilo, o isopropilo total o parcialmente fluorado; y

Z = X como se ha definido anteriormente o alquilo inferior. Obsérvese que el grupo que contiene Z da como resultado un enlace que contiene 5'-amina.

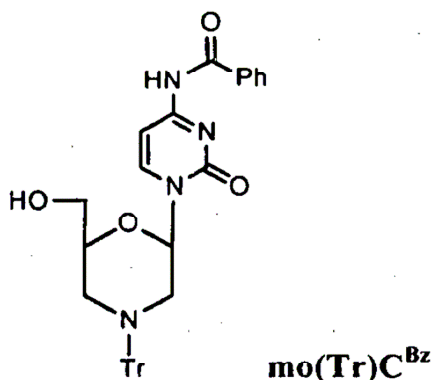
- 10 La expresión "oligo PEG" se refiere a un grupo tal como -(CH₂-CH₂-O)_n-CH₂-CH₂-, donde n es normalmente de 1 a 3, y "alquilo bivalente" es normalmente alquilo C₂ a C₈.

Después de la preparación de oligómeros utilizando monómeros que tienen dichos grupos clorofosforamidato activados, los grupos protectores C(=O)R_f se desprenden de los átomos de nitrógeno terminales, que pueden modificarse más, p. ej., para formar grupos guanidinio terminales, como se describe en la solicitud con cotitularidad documento US 2009/0088562 A1.

- 15 IV. Mejores condiciones para la desprotección del anillo con nitrógeno morfolino en la síntesis de OMP

Como se indicó anteriormente, la desprotección del nitrógeno del anillo de morfolino, que suele estar protegido con un grupo triarilmetilo tal como tritilo, en la síntesis de OMP, debe ser lo suficientemente completa en cada etapa para reducir al mínimo las especies de eliminación de N-1. Sin embargo, los estudios en apoyo de la invención demostraron que los reactivos utilizados en la técnica anterior para este propósito produjeron una cantidad indeseable de hidrólisis y degradación de la cadena principal (véase la Fig. 1). Por lo tanto, se buscaron reactivos de desprotección eficientes que al mismo tiempo minimizaron dicha hidrólisis.

Se utilizó un ensayo sencillo para probar la eficacia de diversos reactivos en la desprotección (por lo general destritilación) de subunidades de morfolino protegidas con N. Un compuesto modelo, la subunidad moC^{Bz} tritilada (es decir citosina morfolino protegido con benzoilo) mostrada a continuación, se disuelve en la solución de destritilación que va a investigarse. En varios momentos (p. ej., 1, 2, 4 min), una parte alícuota se inactivó y se analizó por TLC o HPLC para completar la desprotección del nitrógeno del morfolino. Generalmente, para la predicción de la destritilación eficaz durante la síntesis de OMP en fase sólida, esta reacción modelo debe completarse en aproximadamente 2 minutos a temperatura ambiente.



- 30 Utilizando este ensayo y la experimentación posterior, se determinó que varias sales de piridinio de ácidos fuertes en mezclas de trifluoroetanol (TFE) y diclorometano (DCM) son excelentes catalizadores para eliminar el grupo protector triarilmetilo, p. ej. un grupo tritilo, desde el nitrógeno de morfolino durante la síntesis de OMP en fase sólida.

- 35 Se prefiere una cantidad mínima de TFE (~ 10% v/v o mayor) para velocidades de reacción razonables y la disolución de las sales de piridinio. Debido a que TFE solo no hincha el poliestireno puro, se prefieren mezclas con DCM (diclorometano), especialmente en los primeros ciclos de la síntesis de OMP. Las composiciones de disolventes preferidas comprenden 10 a 75% de TFE.

- Se cree que la utilización del disolvente TFE mejora la selectividad de la reacción de destritilación sobre la formación de amidato (hidrólisis) y la escisión de fosforodiamidato (PDA), descritas anteriormente, al abordar los diferentes mecanismos de escisión y destritilación de PDA. TFE es un potente disolvente de enlace de hidrógeno y disminuye la reactividad de los nucleófilos en solución; por lo tanto, se cree que retarda el ataque en el fósforo necesario para la escisión del enlace P-N. TFE también favorece reacciones de solvólisis de tipo SN1. El carácter solvolítico de las reacciones de destritilación de aminas con TFE se evidencia por el color amarillo de las mezclas de la reacción de destritilación y el color anaranjado de las mezclas de la reacción desmetoxitritilación. Por lo tanto, se cree que el aumento de la concentración de TFE en ambas suprime el ataque nucleófilo en el enlace PDA y favorece la destritilación.
- Las sales de piridinio no sustituidas no son suficientemente ácidas para la desprotección óptima, pero la utilización de la especie piridinio que contiene grupos receptores de electrones (GRE) (por ejemplo, halógeno, carbonilo, ciano) permite la rápida escisión del grupo protector. Generalmente, al menos 2% (p/v) de dicha sal en el disolvente TFE:DCM es suficiente para una rápida destritilación. Las concentraciones preferidas de las sales de piridinio son de 2 a 10% (p/v).
- Los ácidos útiles en la formación de las sales de piridinio incluyen ácidos sulfónicos, tales como el ácido metansulfónico, trifluorometansulfónico y p-toluensulfónico, ácido trifluoroacético y ácido clorhídrico. Aunque es un ácido carboxílico, el ácido trifluoroacético no limita el crecimiento de la cadena de OMP si está presente durante la reacción de acoplamiento, y su carboxilato no es suficientemente nucleófilo para favorecer la formación de amidato. Son particularmente preferidos el ácido trifluoroacético y especialmente el metansulfónico.
- Las piridinas útiles en la formación de las sales de piridinio incluyen piridinas sustituidas con halógeno, especialmente las cloropiridinas menos costosas, de las que se prefiere la 3-cloropiridina y cianopiridinas, para las que se prefiere la 4-cianopiridina. Las 3- y 4-cianopiridinas son productos químicos masivos de bajo costo, fácilmente disponibles. En general, la eficacia de las sales se correlaciona inversamente con el pKa de las especies piridinio. Las piridinas con grupos aceptores de electrones varían en el pKa de aproximadamente 1 a 4 (Fisher *et al.* 1964, Rogne 1970).
- También son útiles los derivados del ácido nicotínico (es decir, ésteres, tales como nicotinato de etilo, y nicotinamida), así como sus congéneres de cetona y aldehído. Generalmente, sin embargo, estos son reactivos menos potentes que las sales de cianopiridinio.
- Se apreciará que las sales de heterociclos distintas de piridinas pueden funcionar como reactivos destritilación selectivos en las condiciones descritas, siempre que el pKa de la forma protonada sea similar al de las piridinas sustituidas de la invención. Se pueden encontrar ejemplos en muchas tablas de pKa para heterociclos que se encuentran en la bibliografía (p. ej., Albert 1963). Los ejemplos incluyen tiazol (pKa 2,53), piridazina (pKa 2,33), pirazol (pKa 2,47), triazol (pKa 2,30), y derivados sustituidos de los mismos, especialmente los derivados sustituidos con GRE como se describió anteriormente.
- Dos sales particularmente preferidas son metansulfonato de 3-cloropiridinio (MCP) y trifluoroacetato de 4-cianopiridinio (CYTFA), y realizaciones particularmente preferidas de reactivos destritilación comprenden soluciones de 2% (p/v) de MCP o CYTFA en 20% de trifluoroetanol/DCM (v/v) que contiene etanol al 0,9% (v/v). Como se muestra en la Tabla 1 anterior, la utilización de estos reactivos dio como resultado un aumento significativo del rendimiento sobre los reactivos convencionales de ácido cianoacético.
- El CYTFA más ácido se encuentra que es ligeramente más eficiente que MCP. Sin embargo, gran parte del aumento en el rendimiento entre el MCP y los reactivos CYTFA en la tabla se puede atribuir al uso de un monómero guanina con doble protección (GDP) en donde la posición 06 está protegido con un grupo 4-(pivaloiloxi)benciloxi, descrito en la solicitud provisional de cotitularidad y presentada simultáneamente titulada "Improved Synthesis of Morpholino Oligomers using Doubly Protected Guanine Morpholino Subunits". En general, la utilización del monómero GDP reduce la cantidad de productos secundarios que contienen diaminopurina, mientras que los reactivos mejorados de destritilación reducen la cantidad de cadena principal hidrolizada o de productos secundarios truncados.
- Por lo tanto, esta modificación proporciona un método para sintetizar un oligómero de morfolino con hidrólisis reducida de enlaces fosforodiamidato en la cadena principal, y preferiblemente un nivel reducido o equivalente de especies de eliminación de N-1, en relación con los métodos de la técnica anterior. En otro aspecto, la invención proporciona un método de desprotección de un nitrógeno del anillo morfolino protegido con triarilmetilo durante la síntesis de un oligómero de morfolino, con hidrólisis reducida de enlaces fosforodiamidato en la cadena principal del oligómero de morfolino con respecto a la observada cuando se utiliza ácido cianoacético como reactivo de desprotección. Preferiblemente, el método también proporciona un nivel reducido o equivalente de especies de eliminación de N-1 que se observarían cuando se utiliza ácido cianoacético como reactivo de desprotección.
- Una modificación adicional útil es la utilización de un agente de captura de tritilo, tal como un tiol, para desplazar el equilibrio de la reacción hacia los productos. La utilización de agentes de captura de tiol se ha empleado para la síntesis de ácidos nucleicos (Ravikumar *et al.*, patente de EE.UU. n° 5.510.476). Mercaptoetanol es un agente de bajo coste, fácilmente disponible útil para este propósito. La presencia del grupo hidroxilo no es crítica para la

captura, porque tioles simples tales como bencilmercaptano funcionan igualmente bien. Alcoholes, tales como etanol y butanol, e incluso el agua sirven también como agentes de captura del catión tritilo.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de N2-PhAc, Subunidad de morfolino G con doble protección (GDP) 06-POB (véase la Fig. 8)

- 5 *Preparación de 3* (A partir de 35 kg de **1c**): Un reactor 100 G se carga de **1c** (35 kg, 1,0 eq), imidazol (5,0 kg; 1,3 eq) y diclorometano (279 kg). El lote se enfría a 3°C. Un reactor 50 G se enfría a 3°C y se carga con t-butilclorodimetilsilano (10,1 kg; 1,2 eq) y diclorometano (93 kg). La solución en el reactor 50 G se transfiere al reactor 100 G, y el lote se ajusta a 20°C. Una vez completada la reacción (1-3 horas), se carga metanol (1,8 kg; 1,0 eq) al reactor 100 G. Después de 30 minutos, la solución en el reactor 100 G se carga a un reactor 200 G que contiene
- 10 tampón de citrato pH 3 (376 kg de ácido cítrico 1 M ajustado a pH 3 con NaOH sólido). El lote se agita durante 30 minutos, y se separan las capas. La capa orgánica inferior se lava una vez más con tampón de citrato de pH 3, y una vez con solución de salmuera (287 kg de NaCl al 2,5%/agua (p:p)). La solución orgánica resultante se destila a <35°C hasta que el análisis de Karl Fischer del lote presenta <0,05% de agua. Esta solución se enfría a 3°C en el reactor 100 G y se utiliza directamente en la preparación del compuesto **4**.
- 15 *Preparación de 4*: El reactor 100 G, que contiene la solución de compuesto **3** se carga con trietilamina (6,8 kg; 1,2 eq), 4-dimetilaminopiridina (0,68 kg; 0,1 eq) y cloruro de triisopropilbencenosulfonilo (18,6 kg; 1,1 eq). El lote se calentó a 20°C. Una vez completada la reacción (3-9 horas), la solución se carga a un reactor 200 G que contiene tampón de fosfato de pH 4,5 (228 kg de KH₂PO₄ 1 M). Se agita el lote durante 30 minutos y se separan las capas. La capa orgánica inferior se lava con salmuera (212 kg de 2,5% de NaCl/agua (p:p)). La solución orgánica resultante se
- 20 destila a <35°C hasta que el análisis de Karl Fischer del lote muestra <0,01% de agua. Esta solución se enfría a 3°C en el reactor 100 G y se utiliza directamente en la preparación del compuesto **5**.

- Preparación de 4a* (A partir de 60 kg de 4-hidroxibenzaldehído): Un reactor 750 G se carga con 4-hidroxibenzaldehído (60 kg; 1,0 eq), tolueno (260 kg), y 1-metilimidazol (8,1 kg; 0,2 eq). A esta solución se carga una solución de bicarbonato de potasio (100 kg; 2,0 eq) en agua (400 kg), seguido de cloruro de trimetilacetilo (83 kg; 1,4 eq). Esta mezcla de dos fases se agita a 20°C. Una vez completada la reacción (1-5 horas), se se carga al lote metanol (15,7 kg; 1,0 eq). El lote se agita a 20°C durante 1 hora. Se separan las capas. A la capa orgánica superior se carga agua (200 kg). El lote se agita durante 30 minutos y se separan las capas. A la capa orgánica superior se carga tampón de fosfato de pH 4,5 (16,5 kg KH₂PO₄ en 242 kg de agua). Se agita el lote durante 30 minutos, y se separan las capas. A la capa orgánica superior se carga agua (200 kg). Se agita el lote durante 30 minutos y se separan las capas. La capa orgánica superior se destila al vacío a <30°C para conseguir un volumen del lote de 200 l. Se carga en el lote THF (70 kg), y el lote se transfiere a un reactor G 500 que contiene Pd/C (9,6 kg; 0,004 eq; 5% de Pd/C, Johnson Matthey al 50% húmedo tipo A405028-5 o A570129-5). El reactor se presuriza inicialmente a 34,5 kPa (5 psi) con H₂ con la agitación ajustada a 50 rpm. Tanto la presión como la velocidad de agitación se aumentó lentamente a medida que avanza la reacción, hasta un máximo de 172,4 kPa (25 psi) con H₂ y 90 rpm. Una vez terminada la reacción (8-48 horas), se filtra el lote a través de una almohadilla de Celite seguido por un filtro en línea de 0,1 micras. El Celite se enjuaga con tolueno (20 kg). Al lote carga solución tampón fosfato de pH 6,5 (2,7 kg KH₂PO₄ y 2,3 kg de fosfato de potasio dibásico, trihidratado en 200 kg de agua). el lote se agita durante 30 minutos, y se separan las capas. La capa orgánica superior se destila a vacío a <30°C para conseguir un volumen de lote de 140 l. Se carga tolueno (126 kg) en el lote, y el lote se destila al vacío a <30°C para conseguir un volumen de lote de 140 l. El lote se ajusta a 20°C y se transfiere a un reactor 500 G que contiene n-heptano (821 kg) y cristales de siembra del compuesto **4a** (100 gramos) mantenidos a 0°C. El lote se mantiene a 0°C durante 1-2 horas. Se añade una segunda porción de cristales de siembra (100 gramos), y el lote se mantiene a 0°C durante 1-2 horas. Se aísla el compuesto **4a** por filtración. Rendimiento = 70 - 80% en 4-hidroxibenzaldehído.
- 25
- 30
- 35
- 40

- El derivado en el que está protegido el resto fenol en forma de su N,N-dimetilcarbamato en lugar del éster pivalato se prepara en condiciones similares a **4a**. Para ayudar a terminar la reacción entre 4-hidroxibenzaldehído y cloruro de dimetilcarbamoilo, la reacción se lleva a cabo en diclorometano a reflujo en presencia de N-metilimidazol como base y 0,2 eq de DMAP como catalizador.
- 45

- Preparación de 5*: Un reactor 100 G que contiene la solución del compuesto **4** se carga con N-metilpirrolidina (9,5 kg; 2,0 eq disueltos en 23 kg de diclorometano). Después de 10 minutos, se añade el compuesto **4a** (14,0 kg; 1,2 eq), seguido de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (10,2 kg; 1,2 eq en 23 kg de diclorometano). El lote se calentó a 20°C. Una vez completada la reacción (1-9 horas), la solución se diluye con 327 kg de diclorometano y se carga en un reactor 200 G que contiene tampón de fosfato de pH 4,5 (334 kg de KH₂PO₄ 1 M). Se agita el lote durante 30 minutos, y se separan las capas. La capa orgánica inferior se lava una vez más con tampón de fosfato de pH 4,5 (111 kg de KH₂PO₄ 1 M), después una vez con salmuera (212 kg de 2,5% de NaCl/agua (p:p)). La solución orgánica resultante se destila a <35°C que hasta el análisis de Karl Fischer del lote muestra <0,05% de agua. Esta solución se utiliza directamente en la preparación de compuesto de **1f**.
- 50
- 55

Preparación de 1f: Un reactor 100 G que contiene la solución del compuesto **5** se carga con trihidrofluoruro de trietilamina (18,0 kg; 2,0 eq). El lote se agita a 20°C. Una vez completada la reacción (4-20 horas), el lote se carga a un reactor 200 G. El reactor 200 G se carga con solución de NaHCO₃ (230 kg de una solución al 5% (p:p)). Se agita

el lote durante 30 minutos y se separan las capas. La capa orgánica inferior se lava una vez más con solución de NaHCO_3 (230 kg de una solución al 5% (p:p)), después una vez con tampón de fosfato de pH 6,5 (9,3 kg de KH_2PO_4 y 14,0 kg de K_2HPO_4 en 215 kg de agua). La solución orgánica resultante se somete a intercambio de disolvente a THF (para lograr <1% de DCM en peso en el lote). La solución se diluye con THF (124 kg) y se calienta a 60°C. Se carga lentamente agua (8 kg por kg de compuesto **1f** en solución basada en el análisis LOE; precalentada a 60°C) a la solución de THF. La solución se enfría lentamente a 3°C y se mantiene durante > 4 horas. El compuesto **1f** en bruto se aísla por filtración. El material en bruto se vuelve a disolver en THF (342 kg) y se calienta a 60°C. Se carga lentamente agua (315 kg; precalentada a 60°C) a la solución de THF. La solución se enfría a 3°C y se mantiene durante > 4 horas. El compuesto **1f** se aísla por filtración. Una segunda recristalización se puede realizar para purificar más el compuesto **1f**, si se desea. Rendimiento = 53-73% de **1c**.

Preparación de 2f (A partir de 12 kg de **1f**): Un reactor 50 G se carga con el compuesto **1f** (12 kg; 1,0 eq), diclorometano (159 kg), 2,6-lutidina (2,5 kg; 1,6 eq) y 1-metilimidazol (0,36 kg; 0,3 eq). Esta solución se destila para conseguir un volumen de lote de 69 l, y se enfría a 5°C. Se carga al lote N,N-dimetilfosforamidododicloridato (3,8 kg; 1,6 eq). El lote se ajusta a 20°C. Una vez completada la reacción (6-16 horas), se carga tolueno (78 kg) al lote. La mezcla resultante se destila a 25°C para conseguir un volumen de lote de 126 l (el análisis de GC del lote debe presentar 30-45% de DCM en peso), y se transfiere a un reactor 100 G, que contiene tampón de citrato a pH 3 (15,4 kg de ácido cítrico monohidratado, 1,4 kg de NaOH, 80 kg de agua). El lote se agita durante 10 minutos, y se separan las capas. La capa acuosa inferior se envía a los residuos. La capa orgánica superior se transfiere al reactor 50 G que contiene sulfato de sodio (8,0 kg). Se agita el lote durante 30 minutos, y la torta de residuos de sulfato de sodio se separa por filtración. La torta de sulfato de sodio se enjuaga con diclorometano (16 kg). La solución del producto resultante se destila en el reactor 50 G para conseguir un volumen de lote de 53 l (el análisis por GC del lote debe mostrar 11 a 15% de DCM en peso). El reactor 100 G se carga con heptano (238 kg). El lote en el G del reactor 50 se transfiere al reactor 100 G durante 2 horas. Al final de la transferencia, el lote se mantiene a 20°C durante 4-16 horas. El compuesto **6** en bruto se recoge por filtración. El material en bruto se carga al reactor 100 G. A los sólidos brutos se añade una solución de tolueno (16 kg) y heptano (50 kg). Esta mezcla se agita durante 3 horas y se filtra. La resuspensión se repite una o más veces. Rendimiento de **2f** en bruto = 80% de **1f**.

Purificación del compuesto **2f** por cromatografía en gel de sílice (Partiendo de ~ 6,5 kg de compuesto **2f** en bruto): La "concentración" de compuesto **2f** en bruto se calcula corrigiendo el peso de material en bruto por la pureza y los volátiles por HPLC. Para esta etapa de purificación, se utilizan 5,75 kg de material (corregidos por la concentración) por inyección en una columna de cromatografía de 50 cm. La columna de cromatografía de 50 cm está rellena con una suspensión de gel de heptano/sílice (51,8 kg de gel de sílice). El material en bruto se carga en la columna en forma de una solución en diclorometano/2,6-lutidina (15 kg diclorometano, 0,16 kg de 2,6-lutidina). El producto se eluye con un gradiente de dos etapas de 4-metil-2-pentanona (MIBK)/heptano/2,6-lutidina (la primera etapa es de 827 l de MIBK:heptano 39:61 (p:p) con 0,06% de 2,6-lutidina (p:p); la segunda etapa es 1.343 l de MIBK:heptano 73:27 (p:p) con 0,06% de 2,6-lutidina (p:p).) El grupo de la fracción aprobada se concentra por evaporación en película delgada hasta una concentración de 150 g/l. Este grupo concentrado se precipita en 6 volúmenes de heptano. El **2f** purificado se aísla por filtración. El rendimiento de **2f** purificado= 50% de **1f**; 65% de **2f** en bruto.

Ejemplo 2. Preparación de la solución de destrilación de la sal de piridinio CYTFA

A una solución de 4-cianopiridina (10,1 g; 1,055 eq) en diclorometano (790 ml) se añadió ácido trifluoroacético (10,5 g; 1,0 eq) seguido de 2,2,2-trifluoroetanol (198 ml) y etanol (10 ml) y la solución se agitó durante 10-30 min.

Ejemplo 3: Preparación de anclaje de disulfuro (véase la Fig. 10)

Preparación de la sal succinato de N-tritil-piperazina (NTP): A una solución enfriada de piperazina (10 eq) en tolueno/metanol (tolueno/metanol 5:1 (v:v); 5 ml/g de piperazina) se añadió lentamente una solución de cloruro de trifenilmetilo (tritilo) (1,0 eq) en tolueno (5 ml/g de cloruro de tritilo). Una vez completada la reacción (1 - 2 h), esta solución se lavó cuatro veces con agua. A la solución orgánica resultante se le añadió una solución acuosa de ácido succínico (1,1 eq; 13 ml de agua/g de ácido succínico). Esta mezcla se agitó durante 90 min, y el producto sólido se recogió por filtración. La NTP en bruto se purificó mediante dos resuspensiones en acetona. Rendimiento = 70%.

Preparación de disulfuro 7 simétrico: Se puso en suspensión 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) (12,402 g; 2,2 eq.) en diclorometano (5,25 ml/g) y se enfrió en un baño de hielo. Se disolvió disulfuro de hidroxietilo **6** (5,36 g; 1 eq.) en diclorometano (10 ml/g) y tetrahidrofurano (1 ml/g). La solución de diol se añadió al CDI lentamente de tal manera que la temperatura de la mezcla se mantuvo por debajo de 4°C durante la reacción. Una vez completada la reacción (una vez completada la adición), se añadió agua desionizada (93,8 µl, 0,15 eq.) para enfriar la reacción. Independientemente, la sal succinato de N-tritil-piperazina (NTP) (32,59 g; 2,1 eq) se disolvió en tolueno (8 ml/g NTP), diclorometano (2 ml/g de NTP) y metanol (2 ml/g NTP). Se disolvió K_2CO_3 (22,09 g; 4,6 eq) en agua desionizada (10 ml/g). La solución de K_2CO_3 se añadió a la solución de NTP; la mezcla se agitó y después se separó en dos capas. Se destiló la capa orgánica turbia para eliminar 90 gramos; se separaron las gotitas de agua resultantes y se añadió acetona (8 ml/g NTP) a la capa orgánica. La solución de disulfuro diol activada por CDI se añadió a la solución de la base libre y se concentró hasta 225 ml. Se añadió acetona (10 ml/g NTP) y la mezcla se concentró hasta 225 ml. La mezcla se calentó a reflujo y sólido comenzó a cristalizar fuera de la solución. Al terminar, la mezcla de reacción se enfrió y el sólido (**7**) se aisló por filtración. Rendimiento: 27,92 g; 93,1% (referido

al ensayo en peso).

Preparación de alcohol disulfuro 8: Se puso en suspensión **7** (36,00 g; 32,1 mmoles; 1 eq.) en acetona (2,8 ml/g de **7**). Se añadió disulfuro de hidroxietilo (78,51 ml; 20 eq.) seguido de acetona (1,7 ml/g de **7**). Se añadió, NaOH al 5%/metanol (2,85 ml; 0,1 eq.); el pH de la mezcla era 10 en papel de pH. Se añadió trifenilfosfina (8,42 g; 1 eq.) seguido de acetona (1,1 ml/g de **7**). Todos los sólidos se disolvieron y a continuación el producto comenzó a cristalizar. Después de dieciséis horas, la mezcla de reacción se neutralizó con ácido acético (2,4 g; 0,2 eq.). El producto en bruto se aisló por filtración. El sólido en bruto **8** se sometió a dos resuspensiones en acetona a reflujo (5 ml/g de **7**).

Después de la filtración, el producto bruto se puso en suspensión en diclorometano (7,25 ml/g de **7**). La mezcla se calentó hasta que formó una solución transparente (35°C). La solución se extrajo cinco veces con un volumen igual de agua desionizada y la capa orgánica final se concentró hasta 155 ml. Se añadió diclorometano (4,3 ml/g de **7**), y la solución se concentró de nuevo hasta 155 ml. Se añadió CDI (9,17 g; 1,1 eq.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (~ 20 min) la mezcla de reacción se lavó dos veces con un volumen igual de agua desionizada, a continuación se añadió etilbenceno (2,1 ml/g de **7**). La solución se concentró hasta 65,2 g, reduciendo el diclorometano en la solución a 0,17%, y se agitó en un baño de hielo para cristalizar el producto. El producto **9** se aisló por filtración. Rendimiento: 44%.

Ejemplo 4: Cola de trietilenglicol (véase la Fig. 11)

Preparación de tritilo piperazina fenil carbamato 10: A una suspensión enfriada de NTP en diclorometano (6 ml/g NTP) se añadió una solución de carbonato de potasio (3,2 eq) en agua (4 ml/g de carbonato de potasio). A esta mezcla de dos fases se añadió lentamente una solución de clorofornio de fenilo (1,03 eq.) en diclorometano (2 g/g de clorofornio de fenilo). La mezcla de reacción se calentó a 20°C. Una vez completada la reacción (1-2 horas), se separaron las capas. La capa orgánica se lavó con agua, y se secó sobre carbonato de potasio anhidro. El producto **10** se aisló por cristalización en acetónitrilo. Rendimiento = 80%

Preparación de alcohol carbamato 11: Se puso en suspensión hidruro de sodio (1,2 eq) en 1-metil-2-pirrolidinona (32 ml/g de hidruro de sodio). A esta suspensión se añadieron trietilenglicol (10,0 eq.) y el compuesto **10** (1,0 eq.). La suspensión resultante se calentó a 95°C. Una vez completada la reacción (1-2 horas), la mezcla se enfrió a 20°C. A esta mezcla se añadió diclorometano al 30%/éter metil terc-butílico (v:v) y agua. La capa orgánica que contenía el producto se lavó sucesivamente con solución acuosa de NaOH, ácido succínico acuosa y solución acuosa saturada de cloruro de sodio. El producto **11** se aisló por cristalización en diclorometano/éter metil terc-butílico/heptano. Rendimiento = 90%.

Preparación de ácido de cola 12: A una solución del compuesto **11** en tetrahidrofurano (7 ml/g de **11**) se añadió anhídrido succínico (2,0 eq.) y DMAP (0,5 eq). La mezcla se calentó a 50°C. Una vez completada la reacción (5 h), la mezcla se enfrió a 20°C y se ajustó a pH 8,5 con solución acuosa de NaHCO₃. Se añadió éter metil terc-butílico, y el producto se extrajo en la capa acuosa. Se añadió diclorometano, y la mezcla se ajustó a pH 3 con ácido cítrico acuoso. La capa orgánica que contenía el producto se lavó con una mezcla de tampón de citrato de pH = 3 y solución acuosa saturada de cloruro sódico. Esta solución en DCM de **12** se utilizó sin aislamiento en la preparación del compuesto **13**.

Preparación de 13: A la solución del compuesto **12** se añadió imida del ácido N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxílico (HONB) (1,02 eq), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,34 eq.), y a continuación hidrocloreto de L-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (1,1 eq.). La mezcla se calentó a 55°C. Una vez completada la reacción (4-5 h), la mezcla se enfrió a 20°C y se lavó sucesivamente con ácido cítrico 0,2 M/salmuera 1:1 y salmuera. La solución de diclorometano se sometió a intercambio de disolvente a acetona y a continuación a N,N-dimetilformamida, y se aisló el producto por precipitación en acetona/N,N-dimetilformamida en solución acuosa saturada de cloruro de sodio. El producto en bruto se volvió a poner en suspensión de nuevo varias veces en agua para eliminar el N,N-dimetilformamida residual y sales. Rendimiento = 70% de **13** a partir del compuesto **11**. La introducción de la "cola" activada en la resina del anclaje de disulfuro se realizó en NMP por el procedimiento utilizado para la incorporación de las subunidades durante la síntesis en fase sólida.

Ejemplo 5: Preparación del soporte sólido para la síntesis de oligómeros de morfolino

Ejemplo 5a: Preparación de resina de disulfuro de aminometilpoliestireno

Este procedimiento se llevó a cabo en un recipiente con péptido, con camisa silanizada (hecho a medida por ChemGlass, N.J., EE.UU.) con una frita de vidrio de porosidad a groso modo (40-60 µm), agitador en cabeza y llave de paso de teflón de 3 vías para permitir burbujear N₂ a través de la frita o una extracción de vacío. El control de temperatura se consiguió en el recipiente de reacción por un baño de agua circulante.

Las etapas de tratamiento/lavado de resinas en el siguiente procedimiento consisten en dos operaciones básicas: fluidización de las resinas y extracción con disolvente/solución. Para la fluidización de resinas, la llave de paso se coloca para permitir la circulación de N₂ a través de la frita y el tratamiento/lavado de resinas especificado se añadió al reactor y permitió penetrar y mojar completamente la resina. A continuación se inició la mezcla y la suspensión de

resina se mezcló durante el tiempo especificado. Para la extracción con disolvente/solución, el mezclado y la circulación de N₂ se interrumpieron y se arrancó la bomba de vacío y a continuación la llave de paso se colocó para permitir la evacuación del tratamiento/lavado de resinas a deshechos. Todos los volúmenes de tratamiento de resina/lavado eran 15 ml/g de resina a menos que se indique lo contrario.

- 5 A resina de aminometilpoliestireno (malla 100-200; ~ 1,0 mmol/g N₂ de sustitución; 75 g, 1 eq., Polymer Labs, Reino Unido, parte nº 1464-X799) en un recipiente con péptidos silanizado, con camisa se añadió 1-metil-2-pirrolidinona (NMP; 20 ml/g de resina) y la resina se dejaron hinchar con mezclado durante 1-2 h. Después de la evacuación del disolvente hinchado, la resina se lavó con diclorometano (2 x 1-2 min.), diisopropiletilamina al 5% en isopropanol al 25%/diclorometano (2 x 3-4 min) y diclorometano (2 x 1-2 min). Después de la evacuación del lavado final, la resina
- 10 se fluidizó con una solución de disulfuro de anclaje 9 en 1-metil-2-pirrolidinona (0,17 M; 15 ml/g de resina, ~2,5 eq.) y la mezcla de resina/reactivo se calentó a 45°C durante 60 horas. Una vez completada la reacción, se interrumpió el calentamiento, se evacuó la solución de anclaje y se lavó la resina con 1-metil-2-pirrolidinona (4 x 3-4 min) y diclorometano (6 x 1-2 min). La resina se trató con una solución de 10% (v/v) de dicarbonato de dietilo en diclorometano (16 ml/g; 2 x 5-6 min.) y después se lavó con diclorometano (6 x 1-2 min). La resina **14** se secó bajo
- 15 una corriente de N₂ durante 1 -3 horas y a continuación al vacío hasta peso constante ($\pm$ 2%). Rendimiento: 110-150% del peso original de resina.

Ejemplo 5b: Determinación de la carga de resina de disulfuro de aminometilpoliestireno

La carga de la resina (número de zonas reactivas disponibles en potencia) se determina por un ensayo espectrométrico para el número de grupos trifenilmetilo (trítalo) por gramo de resina.

- 20 Un peso conocido de resina seca (25 $\pm$ 3 mg) se transfiere a un matraz aforado de 25 ml silanizado y se añade ~ 5 ml de ácido trifluoroacético al 2% (v/v) en diclorometano. Los contenidos se mezclan por agitación suave y después se dejan en reposo durante 30 min. El volumen se llevó a 25 ml con 2% (v/v) más de ácido trifluoroacético en diclorometano y el contenido se mezcla a fondo. Utilizando una pipeta de desplazamiento positivo, una parte alícuota de la solución que contiene trítalo- (500 μ l) se transfiere a un matraz aforado de 10 ml y el volumen se lleva hasta 10
- 25 ml con ácido metansulfónico.

El contenido de catión trítalo en la solución final se mide por absorbancia UV a 431,7 nm y la carga de resina calculada en grupos trítalo por gramo de resina (mmol/g) utilizando los volúmenes diluciones, coeficiente de extinción (ϵ : 41 μ mol⁻¹cm⁻¹) apropiados, y el peso de la resina. El ensayo se realiza por triplicado y se calcula una carga media.

- 30 El procedimiento de carga de resina en este ejemplo proporcionará resina con una carga de aproximadamente 500 mmol/g. Se obtuvo una carga de 300-400 en μ mol/g si se lleva a cabo la etapa de incorporación de anclaje disulfuro durante 24 horas a temperatura ambiente.

Ejemplo 5c: Carga de cola (véase la Fig. 12)

- 35 Usando la misma disposición y los volúmenes que para la preparación de resina de disulfuro de aminometilpoliestireno, puede introducirse la cola en la molécula. Para la etapa de acoplamiento, se utilizó una solución de **13** (0,2 M) en NMP que contiene 4-etilmorfolina (NEM, 0,4 M) en lugar de la solución de anclaje de disulfuro. Después de 2 horas a 45°C, la resina **15** se lavó dos veces con diisopropiletilamina al 5% en isopropanol al 25%/diclorometano y una vez con DCM. A la resina se añadió una solución de anhídrido benzoico (0,4 M) y NEM (0,4 M). Después de 25 min., la camisa del reactor se enfrió a temperatura ambiente, y la resina se lavó dos veces
- 40 con diisopropiletilamina al 5% en isopropanol al 25%/diclorometano y ocho veces con DCM. La resina **15** se filtró y se secó a alto vacío. La carga de resina **15** se define como la carga de la resina de disulfuro de aminometilpoliestireno original **14** utilizada en la carga de cola.

Ejemplo 6: Síntesis de oligómeros de morfolino

Ejemplo 6a: Síntesis en fase sólida

- 45 Se prepararon manualmente oligómeros protegidos por síntesis de oligómeros en fase sólida en resina de disulfuro de aminometilpoliestireno (~ 500 μ mol/g de carga) a escala de 10 g (a partir del peso de resina). Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

Soluciones de destrítalo: CAA = ácido cianoacético al 11% (p/p) en una mezcla de acetonitrilo al 20%/DCM (v/v);

MCP = Metansulfonato de 3-cloropiridinio al 2% (p/v) y etanol al 0,9% (v/v) en trifluoroetanol al 20%/DCM (v/v);

- 50 CYTFA = Trifluoroacetato de 3-cianopiridinio al 2% (p/v) y etanol al 0,9% (v/v) en trifluoroetanol al 20%/DCM (v/v).

Solución de neutralización: Diisopropiletilamina al 5% en isopropanol al 25%/diclorometano;

Soluciones de acoplamiento: 0,165 M (para **2f** (GDP), **2c**, y **2d** u otras subunidades T) o 0,18 M (para **2a** y **2b** u otras subunidades A/C) Subunidad activada de morfolino y n-etilmorfolina al 0,4 M en 1,3-dimetilimidazolidinona (DMI).

Se preparó MPG activado (**2c**) como en Summerton *et al.* (1993).

- 5 Después de la transferencia de la resina al reactor de síntesis y antes de iniciar los ciclos de síntesis, se añadió 1-metil-2-pirrolidinona (NMP, 20 ml/g de resina) y se dejó reposar durante 1-2 horas. Después de lavar 2 veces con diclorometano (10 ml/g de resina), se utilizó el siguiente ciclo de síntesis con adición de la solución de acoplamiento apropiada de la Subunidad activada de morfolino de la base deseada y del tipo de enlace deseado en cada ciclo para dar la secuencia apropiada.

Etapa	Volumen (ml/g de resina de partida)*	Tiempo (min.)
DCM	10-30	1-2
DCM	10-30	1-2
Destritilación A	10-30	2-3
Destritilación A	10-30	2-3
Destritilación A	10-30	2-3
Destritilación A	10-30	2-3
Destritilación A	10-30	2-3
Neutralización A	10-30	3-4
Neutralización A	10-30	3-4
Neutralización A	10-30	3-4
Neutralización A	10-30	3-4
DCM	10-30	1-2
DCM	10-30	1-2
Acoplamiento	7-12	90
Neutralización A	10-30	1-2
Neutralización A	10-30	1-2
Neutralización A	10-30	1-2
Neutralización A	10-30	1-2
DCM	10-30	1-2
* Los volúmenes de lavado se aumentan para tener en cuenta el hinchamiento de la resina; el volumen es 10 ml/g del volumen de resina real en cada ciclo		
** Los volúmenes de acoplamiento son suficientes para mantener buen mezclado y se aumentan para tener en cuenta el hinchamiento de la resina		

- 10 Después de la incorporación de la subunidad final, se llevó a cabo un ciclo final (metoxitritilación) con cloruro de 4-metoxitritifenilmetilo 0,32 M y n-etilmorfolina 0,4 M en DMI. Después de la metoxitritilación, la resina se lavó 8 veces con NMP y a continuación se trató con solución de escisión que consiste en 1,4-ditiotreitol 0,1 M (DTT) y trietilamina 0,73 M en NMP (27 ml/g de resina de partida) durante 30 min. Después de la recogida de la solución de oligómero protegido, la resina (significativamente reducida en volumen) se lavó con dos porciones más de solución de escisión (13 ml/g de resina de partida durante 15 min cada una) y los lavados se combinaron con la solución a granel. A la solución de oligómero protegido en una botella de presión de tamaño apropiado con tapón de teflón (Ace Glass, N.J., EE.UU.) se añadió solución acuosa concentrada de amoníaco (106 ml/g de resina de partida, previamente enfriada a
- 15 -20°C), la botella se cerró y el contenido se mezcló por agitación. La botella se colocó en una estufa a 45°C durante 16-20 h para eliminar la base y grupos protectores de la cadena principal.

Después de la amonólisis, la solución de oligómero en bruto se enfrió a temperatura ambiente y a continuación se diafiltró frente a solución acuosa de amoníaco al 0,28% usando una membrana de celulosa regenerada PLBC 3kd (Millipore) para eliminar los disolventes y pequeñas moléculas antes de la cromatografía de intercambio iónico.

Ejemplo 6b: Purificación de oligómeros de morfolino por cromatografía de intercambio de aniones

- 5 La solución de oligómero en bruto obtenida a partir de diafiltración se ajusta a pH 11-11,5 y se carga en una columna de resina de intercambio aniónico ToyoPearl Super-Q 650S (Tosoh Bioscience). El oligómero metoxitritilado se eluye con un gradiente de B al 5-35% con 17 volúmenes de columna (tampón A: hidróxido sódico 10 mM; Tampón B: cloruro sódico 1 M en hidróxido de sodio 10 mM) y se agruparon las fracciones de pureza aceptable (HPLC de intercambio aniónico y espectrometría de masas).

10 *Ejemplo 6c: Desmetoxitritilación de oligómeros de morfolino*

- 15 A las fracciones reunidas de la cromatografía de intercambio de aniones se añade acetonitrilo (10% en volumen) seguido de H₃PO₄ 2 M para ajustar el pH a 3. La solución se mezcla durante 45 min y a continuación se neutraliza con amoníaco acuoso concentrado a pH 7. La solución de oligómero se diafiltró frente a acetato de sodio 20 mM utilizando una membrana de celulosa regenerada PLBC 3kd (Millipore) para tampones de intercambio antes de la cromatografía de intercambio catiónico.

Ejemplo 6d: Purificación de oligómeros de morfolino por cromatografía de intercambio catiónico

- 20 La solución de oligómero se ajusta a pH 4,5 con ácido acético y se carga en una columna de resina de intercambio catiónico Source 30S (GE Healthcare). El oligómero se eluye con un gradiente de 0-35% de B con 17 volúmenes de columna (tampón A: acetato de sodio 20 mM, acetonitrilo al 25%, pH 4,5; Tampón B: cloruro de sodio 0,5 M, acetato de sodio 20 mM, acetonitrilo al 25%, pH 4,5) y se agruparon fracciones de pureza aceptable (HPLC de intercambio catiónico y espectrometría de masas).

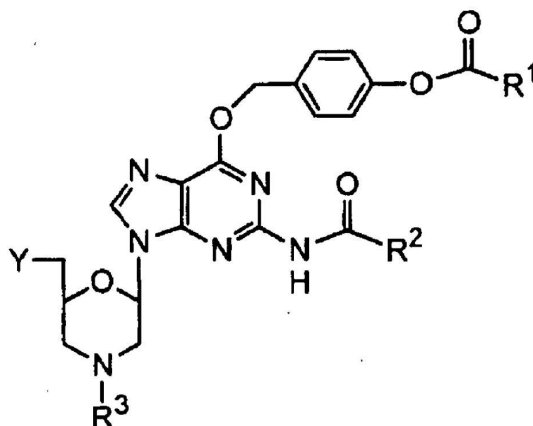
Listado de secuencias

- <110> AVI BIOPHARMA, INC.
- <120> Método de síntesis de oligómeros de morfolino
- 25 <130> P43921
- <140> EP 08850132.5
- <141> 14-11-2008
- <150> US 60/988,192
- <151> 15-11-2007
- 30 <150> US 60/988,200
- <151> 15-11-2007
- <160> 4
- <170> PatentIn versión 3.5
- 35 <210> 1
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Oligómero sintético
- 40 <400> 1
- acgttgagg gcatcgctgc 20
- <210> 2
- <211> 20
- <212> ADN
- 45 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> oligómero sintético
- <400> 2
- ctgggatgag agccatcact 20

	<210> 3	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
	<400> 3	
	cttagtcatc gagatcttcg tg	22
10	<210> 4	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
15	<400> 4	
	gtgctcatgg tgcacggtc	19

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de morfolino que tiene la estructura siguiente



en donde:

5 R¹ se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo inferior, di(alquil inferior)amino y fenilo;

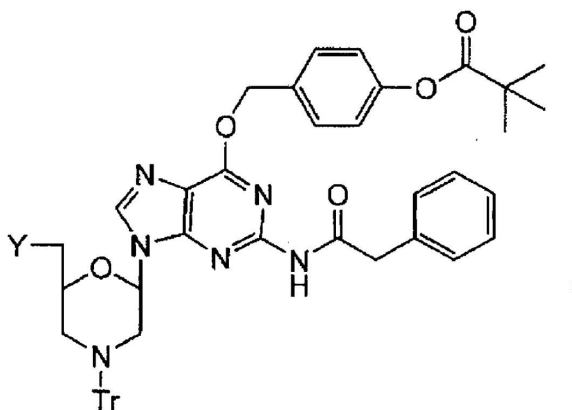
R² se selecciona del grupo que consiste en alquilo inferior, arilmetilo monocíclico y (ariloxi)metil monocíclico;

R³ se selecciona del grupo que consiste en triarilmetilo e hidrógeno; e

10 Y se selecciona del grupo que consiste en: un grupo hidroxilo o amino protegido o no protegido; un grupo clorofosforamidato; y un enlace fosfordiamidato al nitrógeno del anillo de morfolino de otro compuesto de morfolino, un enlace fosfordiamidato al nitrógeno del anillo de morfolino de una subunidad de morfolino en un oligómero de morfolino o un soporte sólido;

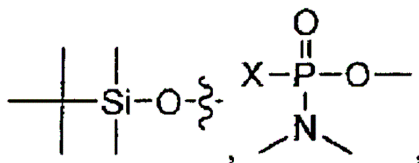
en donde la expresión alquilo inferior define un radical alquilo de uno a seis átomos de carbono;

con tal que el compuesto no tenga la siguiente estructura:



15 en donde:

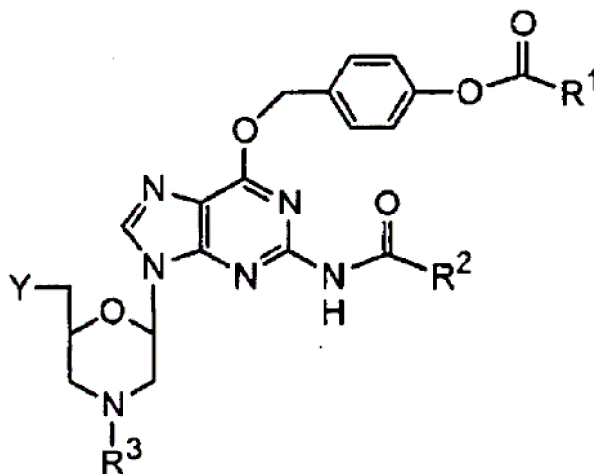
Y es -OH,



en donde X es Cl, el nitrógeno del anillo de otro compuesto de morfolino, el nitrógeno del anillo de morfolino de una subunidad de morfolino en un oligómero de morfolino o un soporte sólido; y

Tr es tritilo.

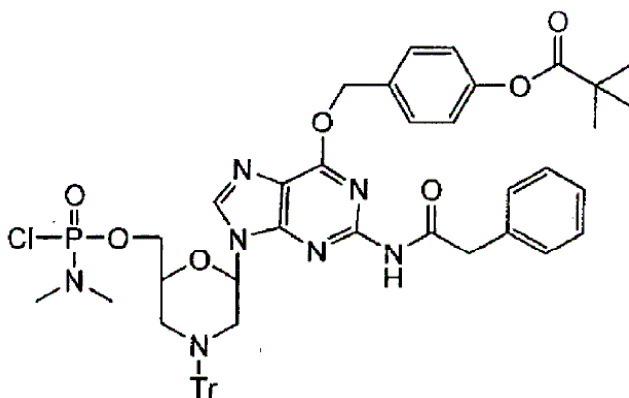
2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Y se selecciona entre el grupo que consiste en un grupo hidroxilo protegido o no protegido y un grupo clorofosforamidato.
3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Y es un grupo hidroxilo protegido con trialquilsililo.
- 5 4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Y es un grupo clorofosforamidato de la forma $-OP(=O)-N(CH_3)_2Cl$.
5. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R^3 se selecciona de tritilo, 4-metoxitritilo, 4-metiltritilo, 4,4'-dimetiltritilo y 4,4',4''-trimetiltritilo.
6. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R^1 es un alquilo inferior, en donde la expresión alquilo inferior define un radical alquilo de uno a seis átomos de carbono.
- 10 7. El compuesto de la reivindicación 6, en donde R^1 es $-C(CH_3)_3$.
8. El compuesto de la reivindicación 1, en la que R^2 es bencilo o $-CH(CH_3)_2$.
9. Un método de síntesis de un oligómero de morfolino, que comprende:
 - (a) hacer reaccionar una subunidad de morfolino sobre soporte en fase sólida, que tiene un nitrógeno del anillo sin protección, con un primer monómero de la subunidad de morfolino que tiene un nitrógeno del anillo protegido con triarilmetilo y un grupo fosforamidato activado en un carbono 5' exocíclico, formando de este modo un enlace fosfordiamidato entre dicho carbono 5' exocíclico y dicho nitrógeno del anillo sin protección;
 - (b) desproteger dicho nitrógeno del anillo protegido, para formar un producto que comprende nitrógeno del anillo sin protección;
 - (c) opcionalmente hacer reaccionar el producto de la etapa (b) con otro monómero de la subunidad de morfolino que comprende un nitrógeno del anillo de morfolino protegido con triarilmetilo y un grupo de fosforamidato activado en un carbono 5' exocíclico, formando de este modo un enlace fosfordiamidato entre el carbono 5' exocíclico del otro monómero de la subunidad de morfolino y el nitrógeno del anillo de morfolino desprotegido del producto de la etapa (b); y
 - (d) opcionalmente repetir las etapas (b) y (c) una o más veces;
- 25 en donde al menos uno de dicho monómero de la subunidad de morfolino, el otro monómero de la subunidad de morfolino o el monómero de la subunidad de morfolino sobre soporte en fase sólida es un compuesto morfolino guanina con doble protección que tiene la estructura:



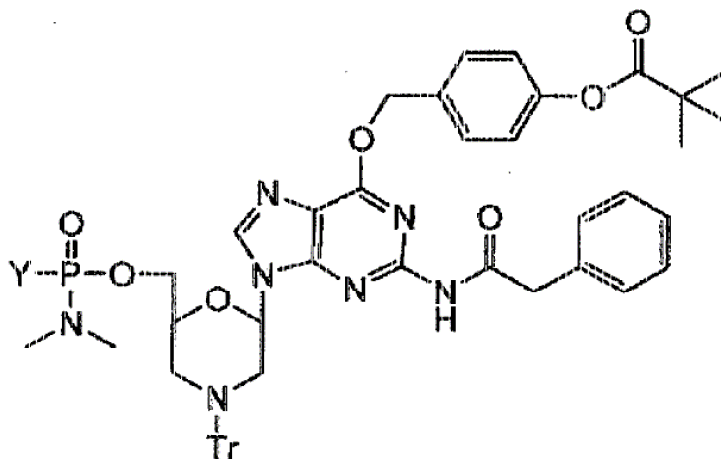
en donde

- 30 R^1 se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo inferior, di(alquilo inferior)amino y fenilo;
- R^2 se selecciona del grupo que consiste en alquilo inferior, arilmetilo monocíclico y (ariloxi)metilo monocíclico;
- R^3 se selecciona del grupo que consiste en triarilmetilo y de hidrógeno; e
- Y es un grupo clorofosforamidato o un soporte sólido;

en donde la expresión alquilo inferior define un radical alquilo de uno a seis átomos de carbono,
con tal que el compuesto guanina morfolino con doble protección no tenga la estructura siguiente:



o



5

en donde Y es un soporte sólido y Tr es tritilo.

10. El método de la reivindicación 9, en donde Y es un grupo clorofosforamidato de fórmula $-OP(=O)-N(CH_3)_2Cl$, o en donde R^3 se selecciona de tritilo (trifenilmetilo), 4-metoxitritilo, 4-metiltritilo, 4,4'-dimetiltritilo y 4,4',4''-trimetiltritilo, o en donde R^1 es alquilo inferior o en donde R^2 es bencilo o $-CH(CH_3)_2$, en donde la expresión alquilo inferior define un radical alquilo de uno a seis átomos de carbono.

10

11. El método de la reivindicación 9, en donde R^1 es $-C(CH_3)_3$.

12. El método de la reivindicación 10 u 11, en donde dicha desprotección de la etapa (b) comprende exponer dicho nitrógeno del anillo protegido con triarilmetilo a una solución de reactivo que comprende una sal de amina heterocíclica en un disolvente que contiene trifluoroetanol, siendo dicha sal una sal de una amina heterocíclica, que tiene un pKa comprendido en el intervalo de 1-4 en su forma protonada, con un ácido seleccionado de entre un ácido sulfónico, ácido trifluoroacético y ácido clorhídrico.

15

13. Un método de síntesis de un oligómero de morfolino, que comprende:

(a) hacer reaccionar una subunidad de morfolino sobre soporte en fase sólida, que tiene un nitrógeno del anillo sin protección, con un primer monómero de la subunidad de morfolino, que tiene un nitrógeno del anillo protegido con triarilmetilo y un grupo fosforamidato activado en un carbono 5' exocíclico, formando de este modo un enlace fosfordiamidato entre dicho carbono 5' exocíclico y dicho nitrógeno del anillo sin protección;

20

(b) desproteger dicho nitrógeno del anillo protegido, para formar un producto que comprende nitrógeno del anillo sin protección;

(c) opcionalmente hacer reaccionar el producto de la etapa (b) con otro monómero de la subunidad de morfolino que comprende un nitrógeno del anillo de morfolino protegido con triarilmetilo y un grupo fosforamidato activado en un carbono 5' exocíclico, formando de este modo un enlace fosfordiamidato entre el carbono 5' exocíclico del otro

25

monómero de la subunidad de morfolino y el nitrógeno del anillo de morfolino desprotegido del producto de la etapa (b);

(d) repetir las etapas (b) y (c) una o más veces con otros monómeros de subunidades de morfolino protegidas con bases;

- 5 en donde dicha desprotección comprende exponer dicho nitrógeno del anillo protegido con triarilmetilo a una solución de reactivo que comprende una sal de amina heterocíclica en un disolvente que contiene trifluoroetanol, siendo la sal una sal de una amina heterocíclica, que tiene un pKa comprendido en el intervalo de 1-4 en su forma protonada, con un ácido seleccionado de un ácido sulfónico, ácido trifluoroacético y ácido clorhídrico, y
en donde la sal de amina heterocíclica no es trifluoroacetato de 4-cianopiridinio (CYFTA).
- 10 14. El método de la reivindicación 13, en donde dicha amina heterocíclica se selecciona entre el grupo consistente en piridina, tiazol, piridazina, pirazol, triazol sustituidos en el grupo de extracción de electrones.
15. El método de la reivindicación 14, en donde dicha amina heterocíclica es una piridina sustituida en el grupo de extracción de electrones, en donde dicho grupo de extracción de electrones se selecciona entre el grupo consistente en halógeno, ciano, aldehído, ceto, carboxiéster y carboxamida.
- 15 16. El método de la reivindicación 13, en donde dicha sal es una sal de ácido sulfónico, seleccionada de entre un alquilsulfonato, (fluoroalquil)sulfonato, p-toluensulfonato o un trifluoroacetato.
17. El método de la reivindicación 12 o 15, en donde dicha sal es metansulfonato de 3-cloropiridinio (MCP).
18. El método de la reivindicación 12 o 15, en donde dicho disolvente comprende diclorometano y trifluoroetanol en una proporción en volumen comprendida en el intervalo de aproximadamente 90:10 a 25:75.
- 20 19. El método de la reivindicación 18, en donde dicha proporción en volumen es aproximadamente 80:20.
20. El método de la reivindicación 13, en donde dicho triarilmetilo se selecciona del grupo que consiste en tritilo, 4-metoxitritilo, 4-metiltritilo, 4,4'-dimetiltritilo y 4,4',4''-trimetiltritilo.

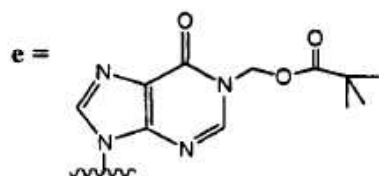
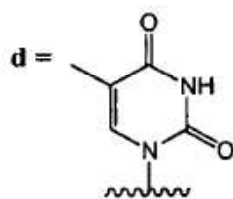
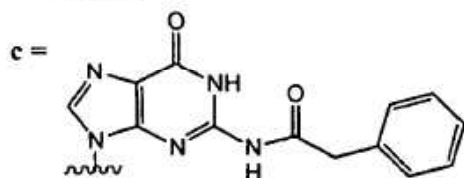
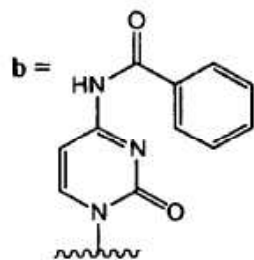
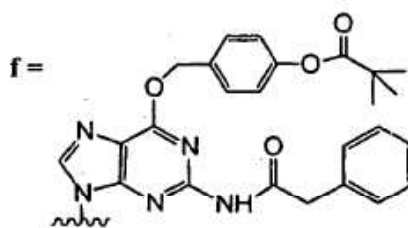
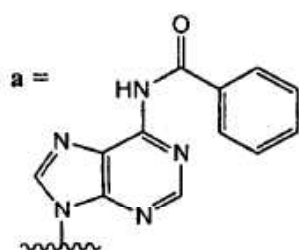
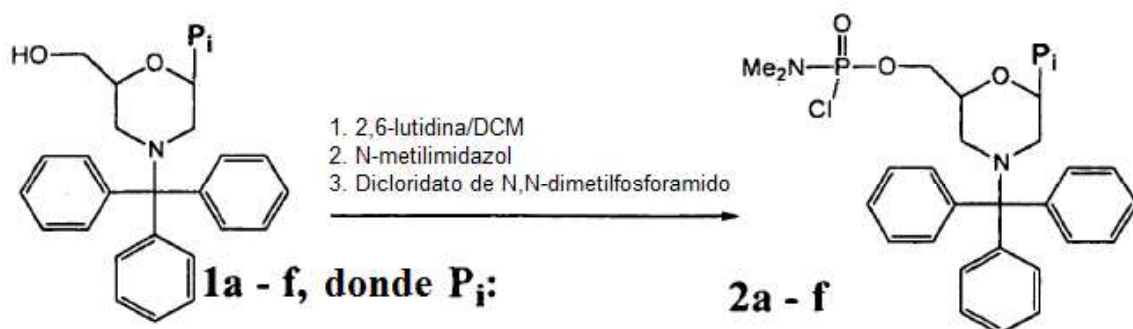


Figura 1

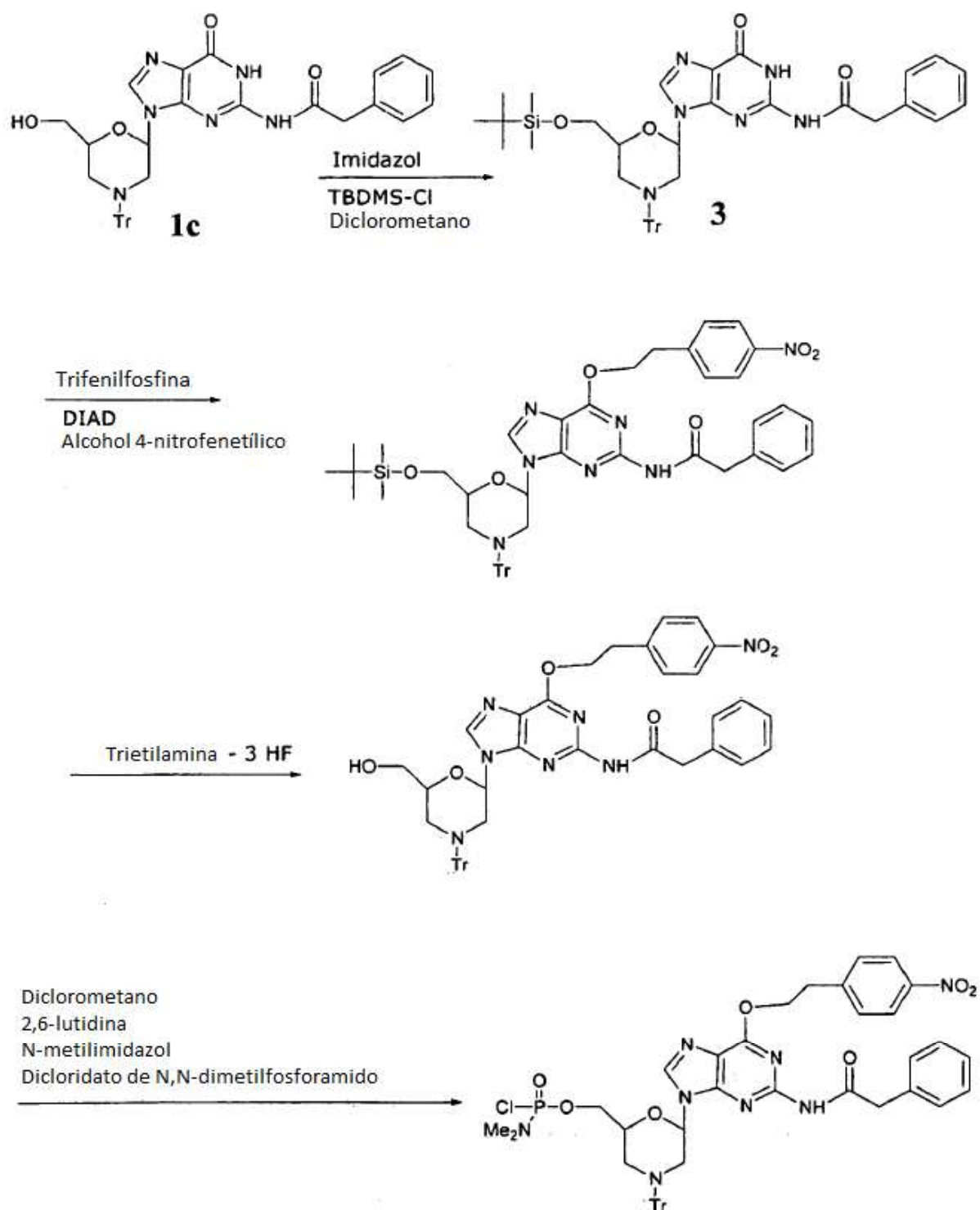


Figura 2

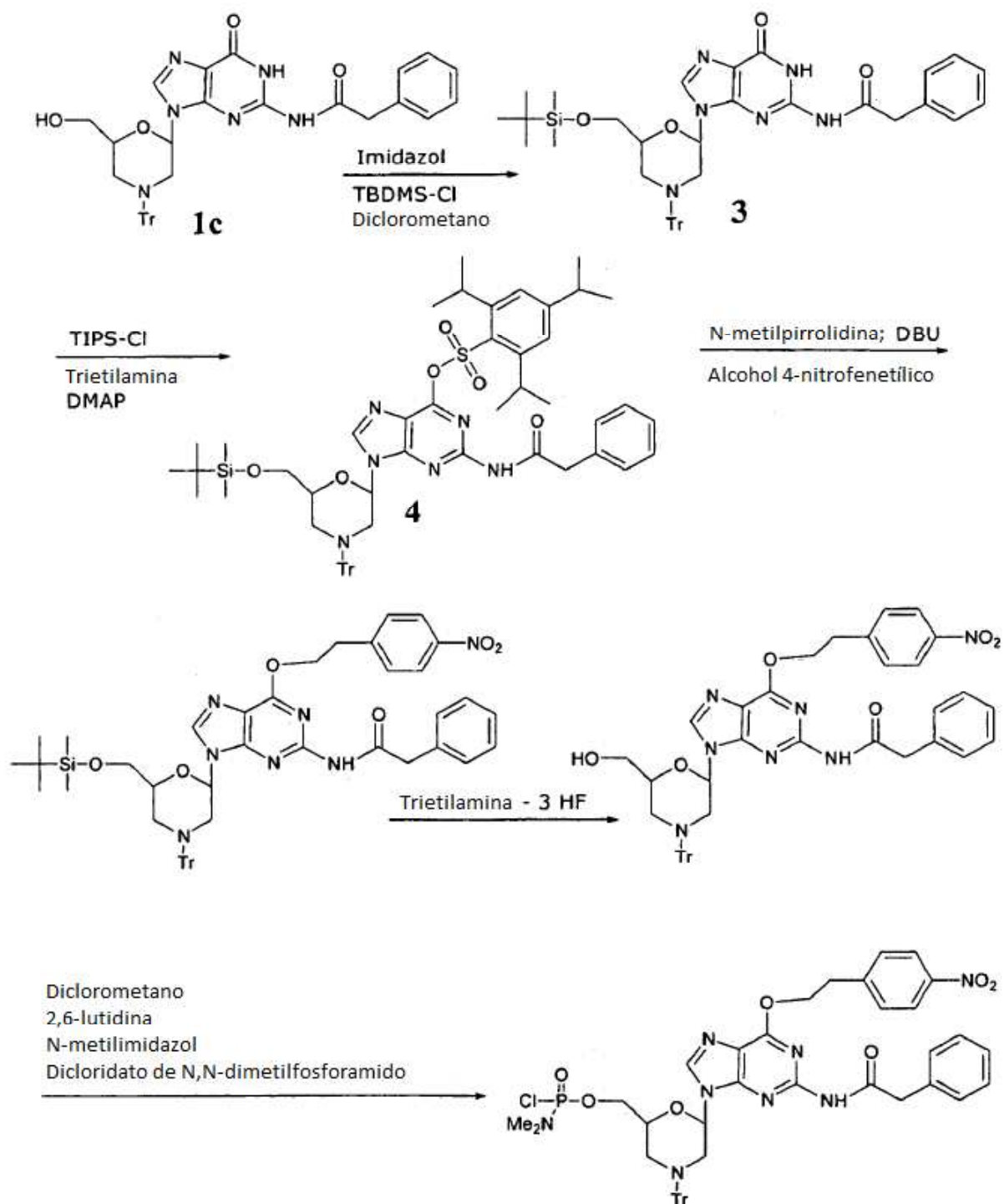


Figura 3

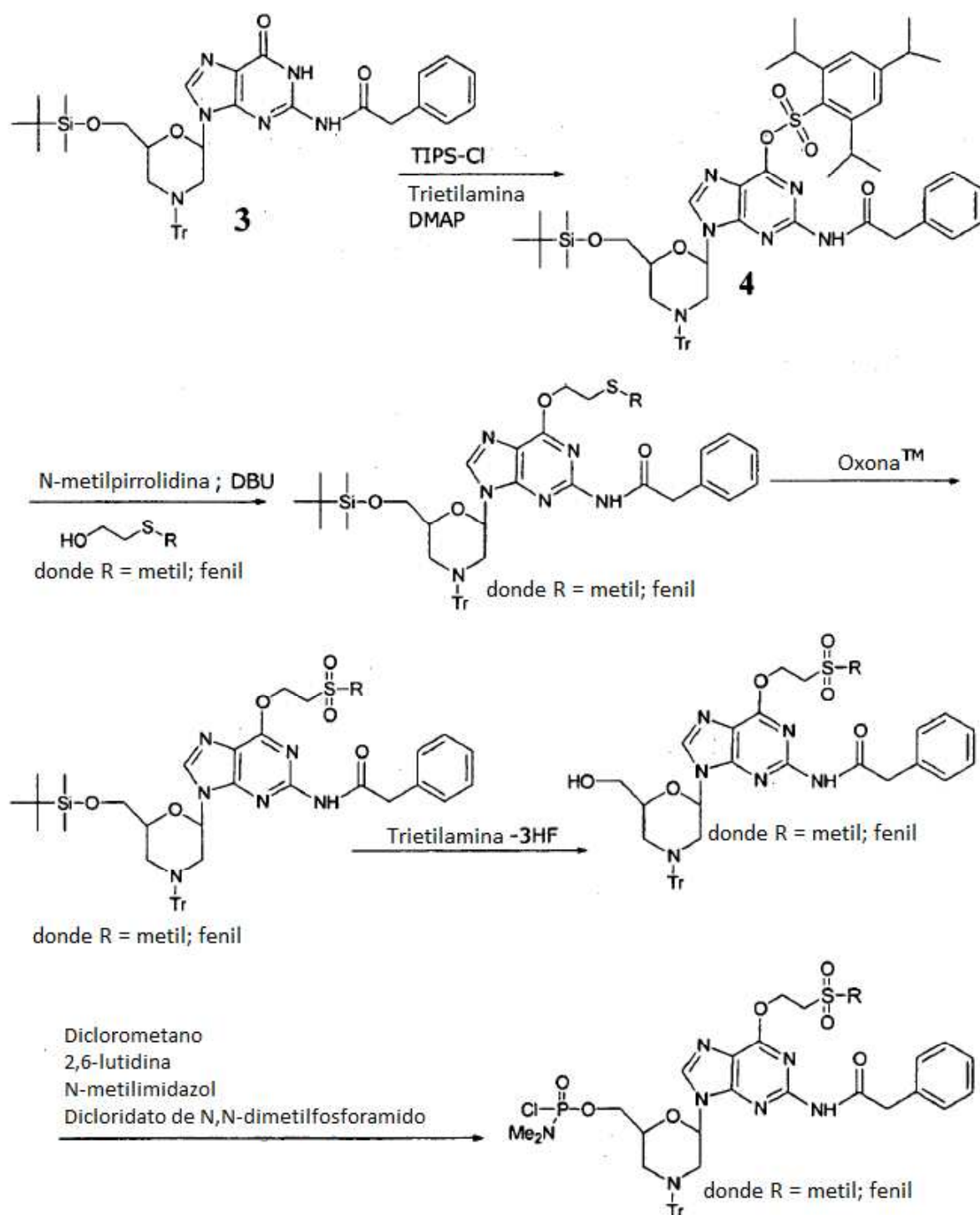


Figura 4

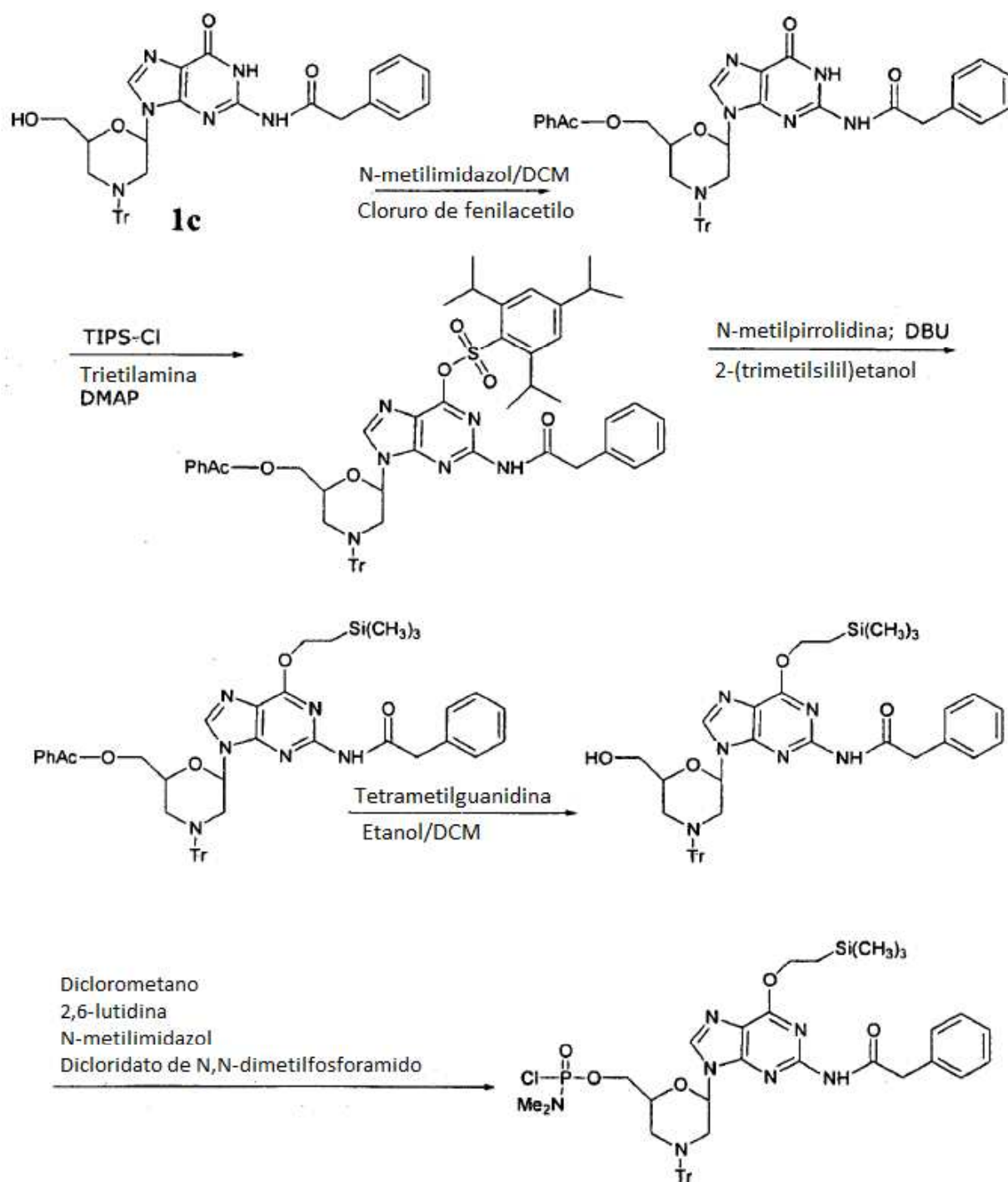


Figura 5

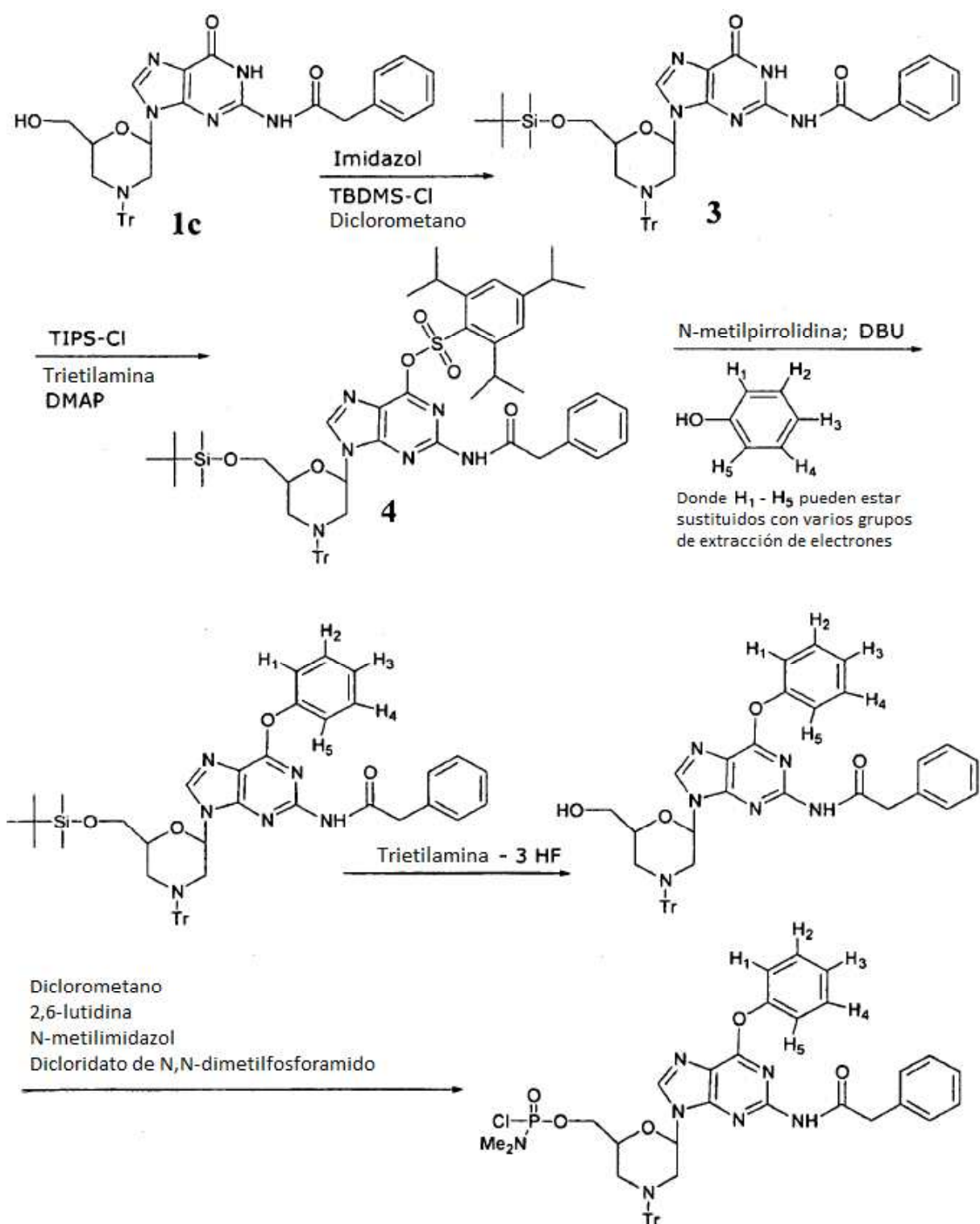


Figura 6

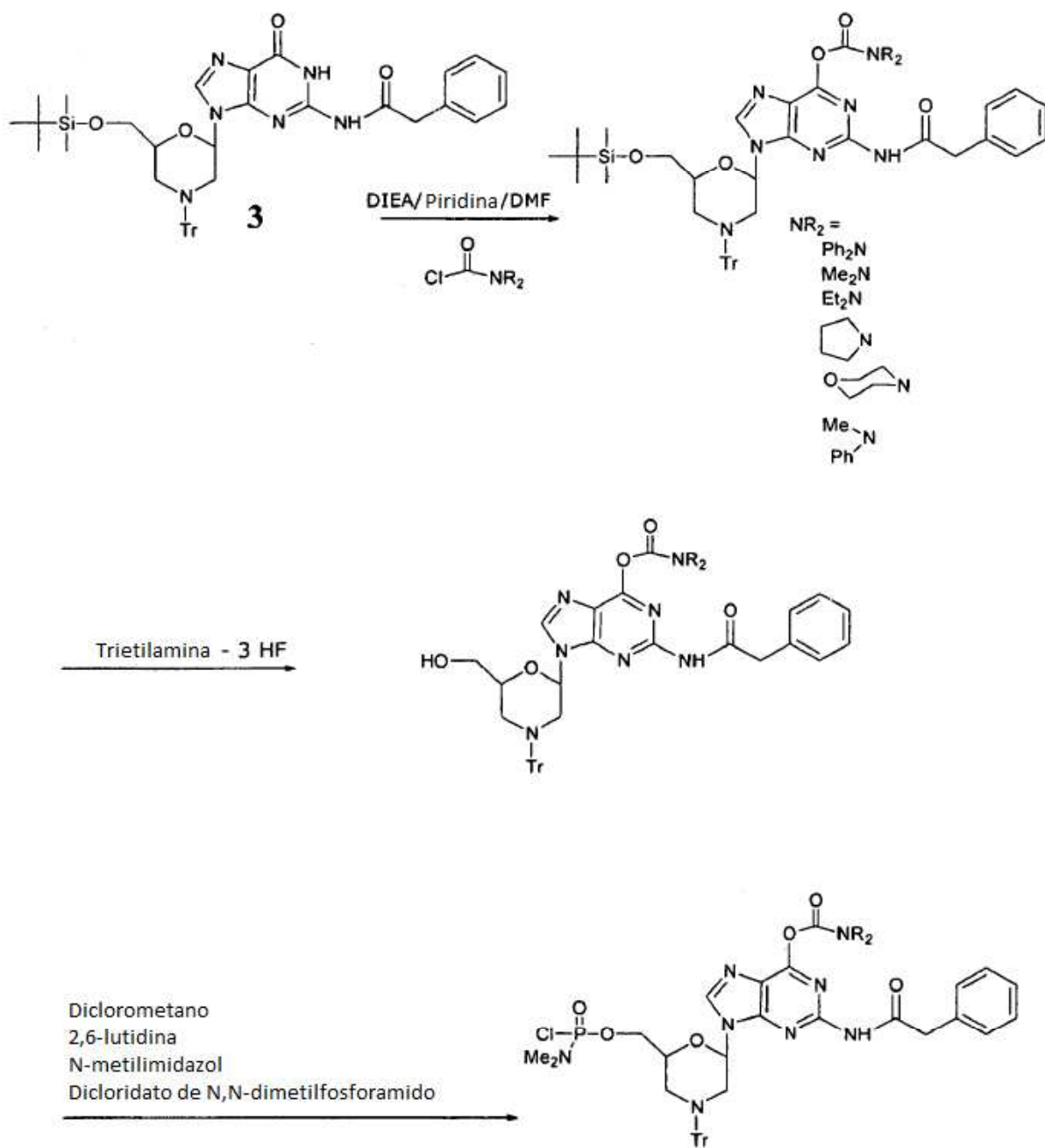


Figura 7

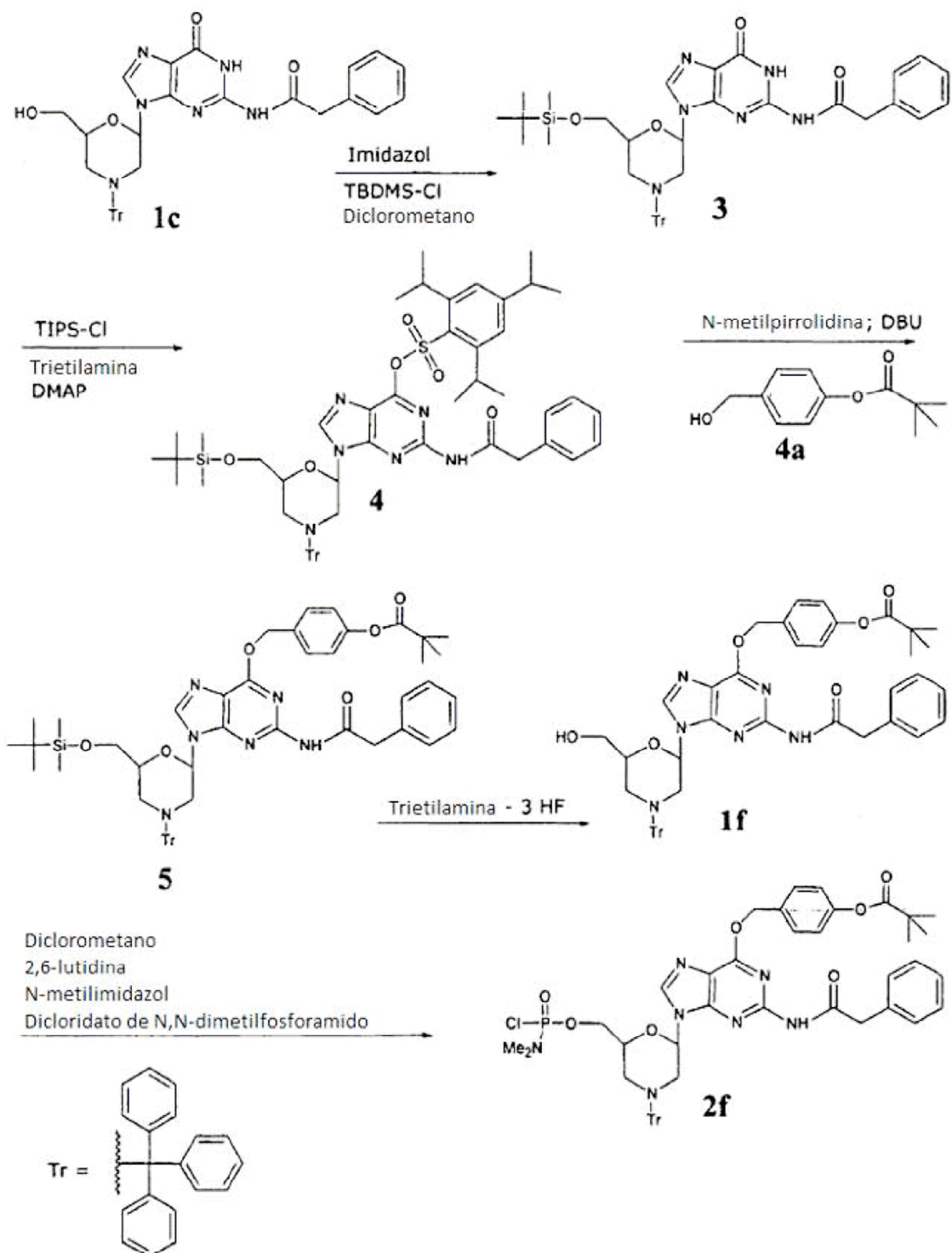


Figura 8

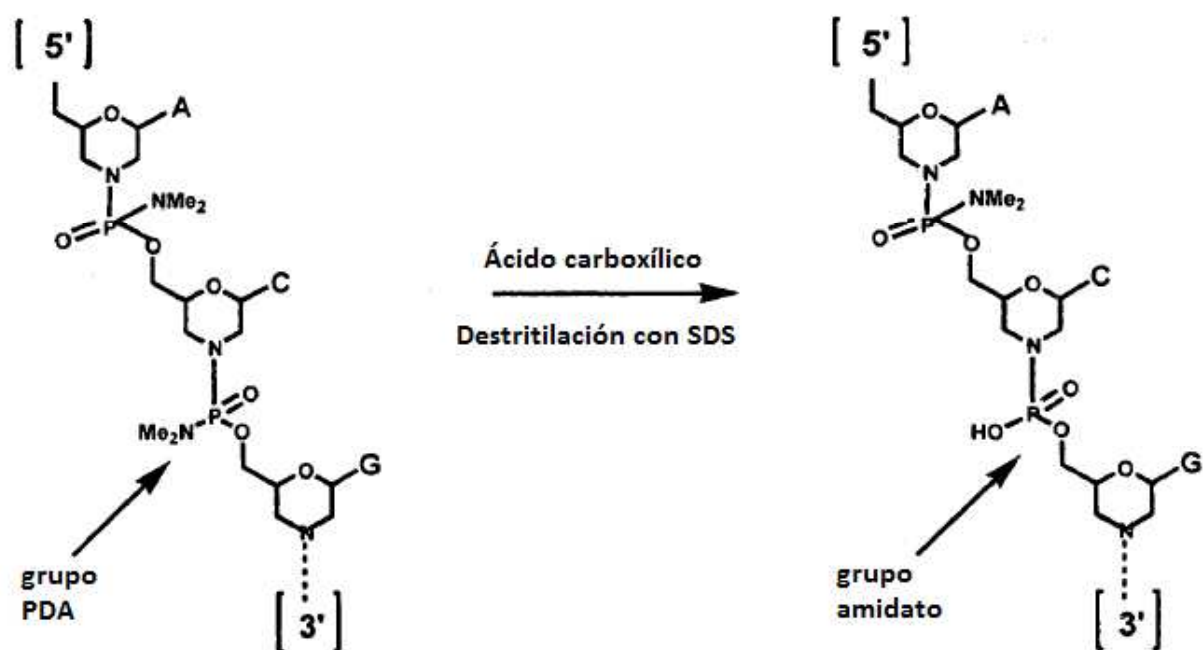


Figura 9

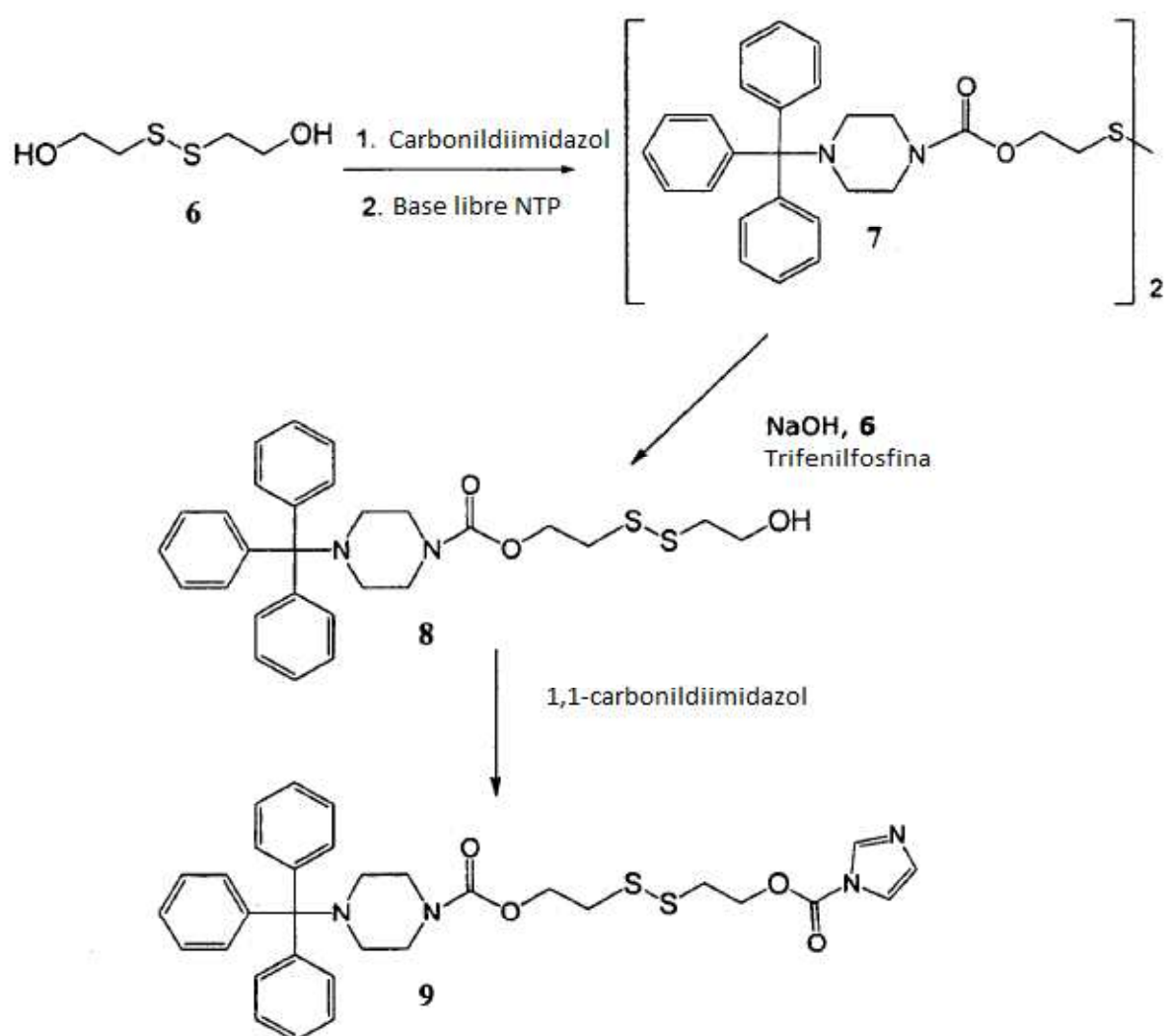
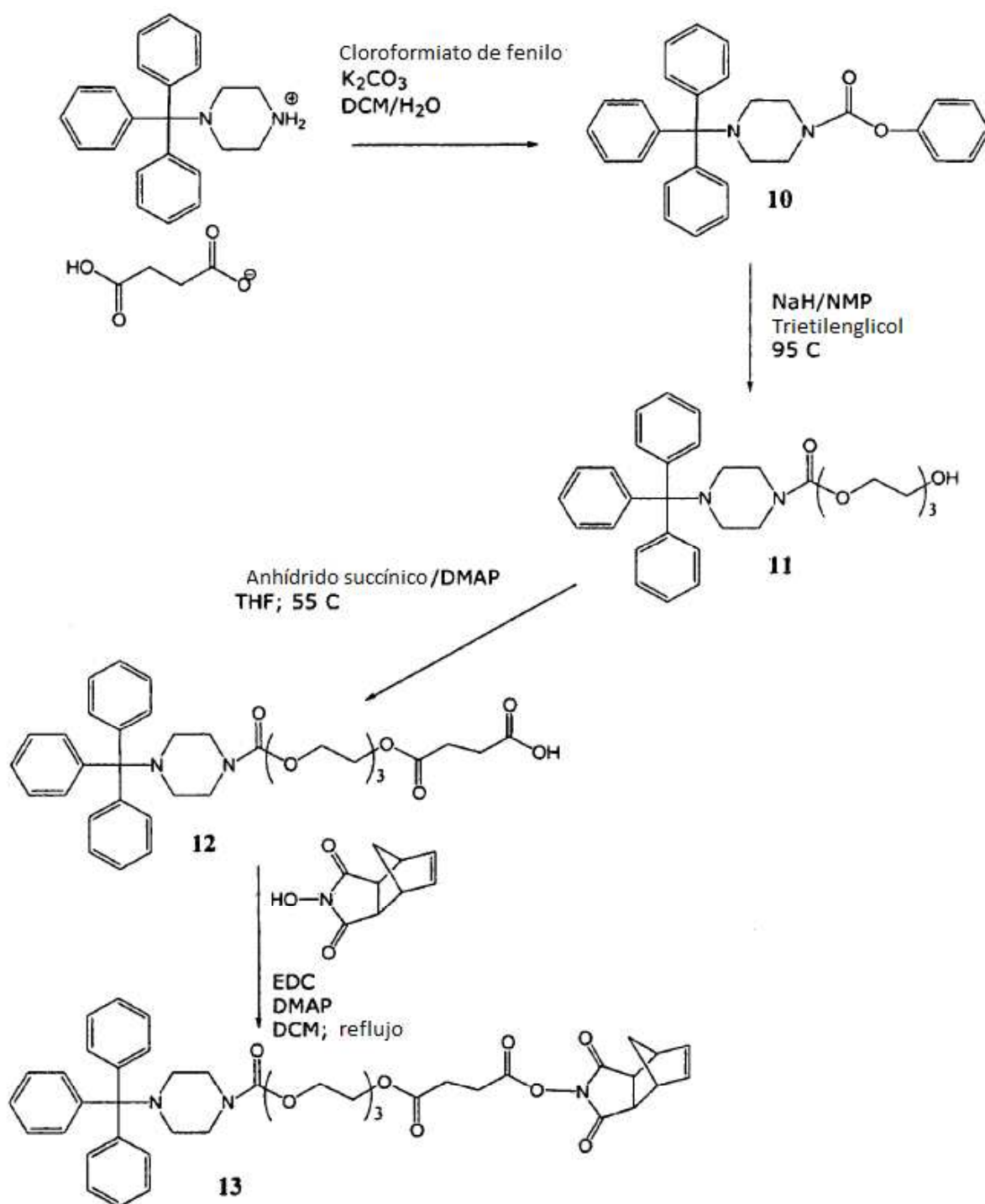


Figura 10

**Figura 11**

