

**PROCESOS PARA PREPARAR OLIGÓMEROS DE MORFOLINO
FOSFORODIAMIDATO**

SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de
la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Serie
No. 62/508,256, presentada el 18 de mayo de 2017; Solicitud de
Patente Provisional de los Estados Unidos Serie No. 62/341,049,
presentada el 24 de mayo de 24, 2016, Solicitud de Patente
10 Provisional de los Estados Unidos Serie No. 62/340,953,
presentada el 24 de mayo de 2016, Solicitud de Patente
Provisional de los Estados Unidos Serie No. 62/357,134,
presentada el 30 de junio de 2016 y Solicitud de Patente
Provisional de los Estados Unidos Serie No. 62/357,153,
15 presentada el 30 de junio de 2016. Los contenidos completos de
las solicitudes de patente provisionales referenciadas
anteriormente se incorporan en la presente como referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 La tecnología antisentido proporciona un medio para
modular la expresión de uno o más productos génicos específicos,
incluyendo productos de empalme alternativos y es únicamente
útil en un número de aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico
y de investigación. El principio detrás de la tecnología
25 antisentido es que un compuesto antisentido, por ejemplo, un

oligonucleótido, el cual se hibrida a un ácido nucleico objetivo, modula las actividades de expresión génica tal como transcripción, empalme o traducción a través de cualquiera de un número de mecanismos antisentido. La especificidad de
5 secuencia de los compuestos antisentido los hace atractivos como herramientas para la validación objetivo y funcionalización génica, así como terapéuticos para modular selectivamente la expresión de genes implicados en la enfermedad.

10 La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es causada por un defecto en la expresión de la proteína distrofina. El gen que codifica la proteína contiene 79 exones extendidos sobre más de 2 millones de nucleótidos de ADN. Cualquier mutación exónica que cambia el marco de lectura del exón, o
15 introduce un codón de detención, o se caracteriza por la remoción de un exón o exones completos fuera de marco, o duplicaciones de uno o más exones, tiene el potencial de interrumpir la producción de distrofina funcional, resultando en DMD.

20 Los recientes ensayos clínicos que analizan la seguridad y eficacia de oligonucleótidos de modulación de empalme (SSO) para el tratamiento de DMD se basan en la tecnología de SSO para inducir el empalme alternativo de pre-mARN por bloqueo estérico del espliceosoma (Cirak *et al.*, 2011;
25 Goemans *et al.*, 2011; Kinali *et al.*, 2009; van Deutekom *et al.*,

2007). Sin embargo, a pesar de estos éxitos, las opciones farmacológicas disponibles para el tratamiento de DMD son limitadas.

5 Casimersen es un oligómero de morfolino fosforodiamidato (PMO) diseñado para saltar el exón 45 del gen de distrofina humana en pacientes con DMD que son susceptibles al salto de exón 45 para restaurar el marco de lectura y producir una forma funcional más corta de la proteína distrofina.

10 Aunque se ha realizado un progreso significativo en el campo de la tecnología antisentido, permanece una necesidad en la técnica de métodos para preparar oligómeros de morfolino fosforodiamidato con rendimiento antisentido o antígeno mejorado.

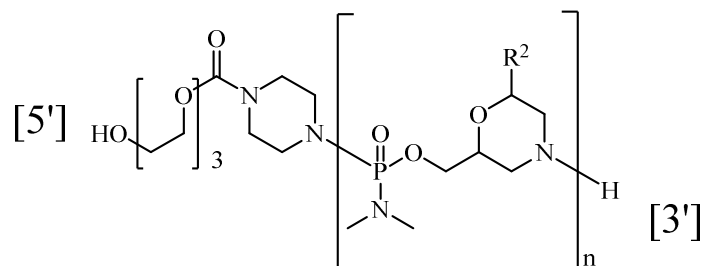
15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente se proporcionan procesos para preparar oligómeros de morfolino fosforodiamidato (PMO). Los procesos sintéticos descritos en la presente permiten una síntesis de
20 PMO aumentada mientras se mantiene el rendimiento y pureza general de un PMO sintetizado.

Por consiguiente, en un aspecto, en la presente se proporciona un proceso para preparar un compuesto oligomérico de Fórmula (A):

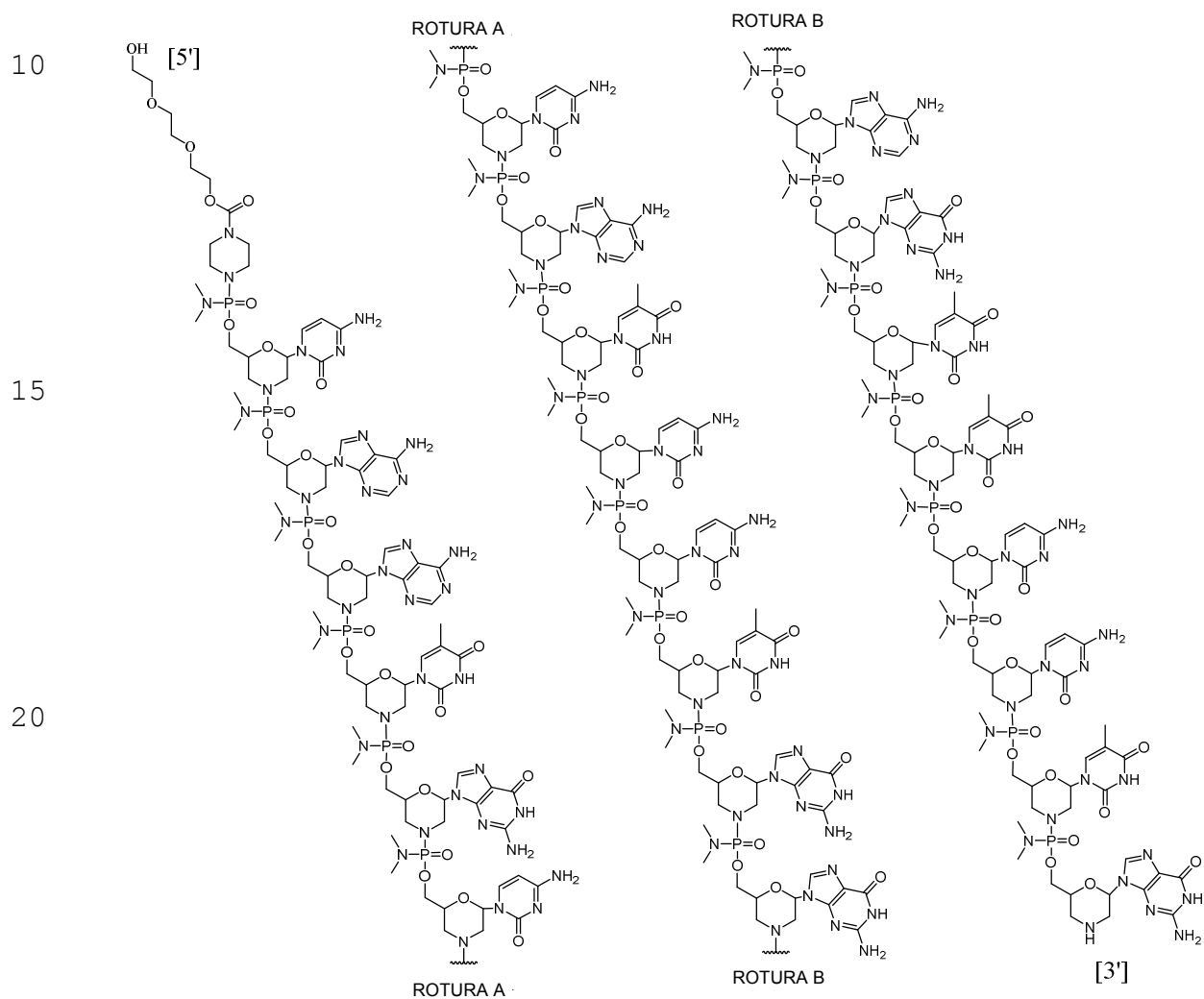
25



5

(A) .

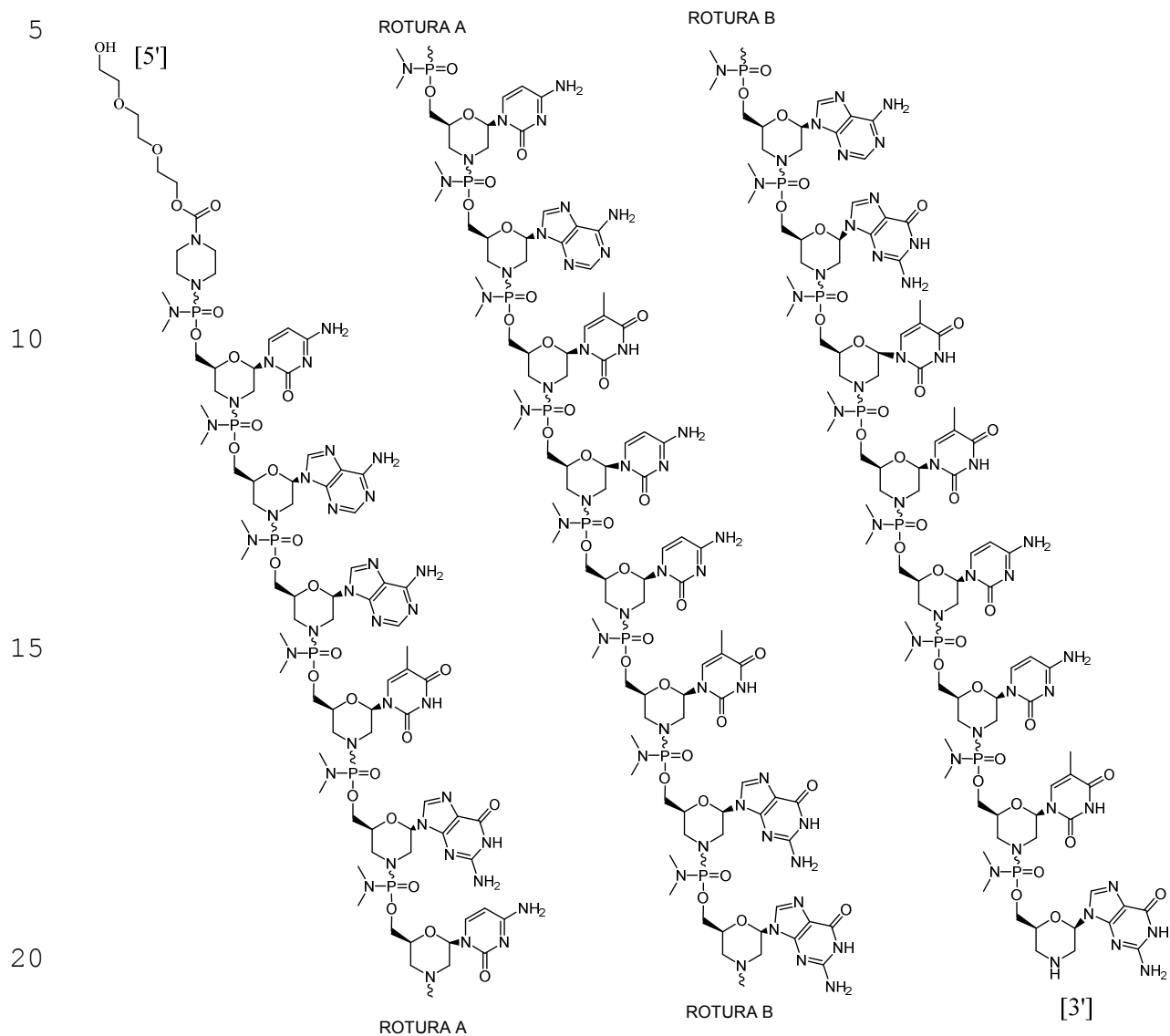
En ciertas modalidades, en la presente se proporciona un proceso para preparar un compuesto oligomérico de Fórmula (C) :



25

(C) .

En todavía otra modalidad, el compuesto oligomérico de la descripción incluyendo, por ejemplo, algunas modalidades de un compuesto oligomérico de Fórmula (C), es un compuesto oligomérico de Fórmula (XII):



(XII).

Por claridad, las fórmulas estructurales incluyendo, por ejemplo, el compuesto oligomérico de Fórmula (C) y Casimersen representado por la Fórmula (XII), son una fórmula

25

estructural continua desde 5' a 3', y, por conveniencia de la representación de la fórmula completa en una forma compacta en las fórmulas estructurales anteriores, los Solicitantes han incluido varias roturas de ilustración marcadas "ROTURA A" y "ROTURA B". Como se entendería por el experto, por ejemplo, cada indicación de "ROTURA A" muestra una continuación de la ilustración de la fórmula estructural en esos puntos. El experto entiende que lo mismo es cierto para cada caso de "ROTURA B", "ROTURA C", y "ROTURA D" en las fórmulas estructurales anteriores incluyendo Casimersen. Sin embargo, ninguna de las roturas de la ilustración está destinada a indicar, ni el experto entendería que significa, una interrupción real de las fórmulas estructurales anteriores incluyendo Casimersen.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Fig. 1** y **Fig. 2** muestran un cromatograma de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) analítica representativa de una sustancia farmacológica cruda Casimersen sintetizada y desprotegida (SRP-4045) (ver Ejemplo 4).

La **Fig. 3** y **Fig. 4** muestran un cromatograma de HPLC analítica representativa de una solución de sustancia farmacológica Casimersen purificada (ver Ejemplo 5).

La **Fig. 5** y **Fig. 6** muestran un cromatograma de HPLC analítica representativa de una sustancia farmacológica Casimersen desalada y liofilizada (ver Ejemplo 5).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente se proporcionan procesos para preparar un oligómero de morfolino. El oligómero de morfolino descrito en la presente exhibe una afinidad más fuerte para ADN y ARN sin comprometer la selectividad de secuencia, con respecto a los oligonucleótidos nativos o no modificados. En algunas modalidades, el oligómero de morfolino de la descripción minimiza o previene la escisión por RNasa H. En algunas modalidades, el oligómero de morfolino de la descripción no activa RNasa H.

Los procesos descritos en la presente son ventajosos en un proceso de escala industrial y se pueden aplicar para preparar cantidades de un oligómero de morfolino a alta escala y rendimiento (por ejemplo, aproximadamente 1 kg, aproximadamente 1-10 kg, aproximadamente 2-10 kg, aproximadamente 5-20 kg, aproximadamente 10-20 kg, o aproximadamente 10-50 kg).

Definiciones

A continuación se listan las definiciones de varios términos usados para describir esta descripción. Estas definiciones se aplican a los términos como se usan en toda esta especificación y reivindicaciones, a menos que se limite de otro modo en los casos específicos, ya sea individualmente o como parte de un grupo más grande.

"Protegido con base" o "protección de base" se refiere a la protección de los grupos de apareamiento de bases, por ejemplo bases de purina o pirimidina, en las subunidades de morfolino con grupos protectores adecuados para prevenir la
5 reacción o interferencia de los grupos de apareamiento de bases durante la síntesis de oligómero por etapas. (Un ejemplo de una subunidad de morfolino protegida con base es el Compuesto (C) de subunidad C activada que tiene un grupo protector CBZ en el grupo amino de citosina representado a continuación).

10 Un "grupo fosforamidato activado" típicamente es un grupo clorofosforamidato, que tiene sustitución en el nitrógeno el cual se desea en el enlace de fosforodiamidato eventual en el oligómero. Un ejemplo es (dimetilamino)clorofosforamidato, es decir $-O-P(=O)(NMe_2)Cl$.

15 El término "unido al soporte" se refiere a una entidad química que se enlaza covalentemente a un medio de soporte.

El término "medio de soporte" se refiere a cualquier material incluyendo, por ejemplo, cualquier partícula, perla o superficie, en el cual un oligómero se puede unir o sintetizar,
20 o se puede modificar para la unión o síntesis de un oligómero. Los sustratos representativos incluyen, pero no se limitan a, soportes inorgánicos y soportes orgánicos tales como vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluyendo acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros
25 materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno,

poliuretanos, TEFLÓN, etc.), polisacáridos, nilón o nitrocelulosa, cerámica, resinas, sílice o materiales a base de sílice incluyendo silicio y silicio modificado, carbón, metales, vidrios inorgánicos, plásticos, haces de fibras
5 ópticas y una variedad de otros polímeros. El medio de soporte particularmente útil y superficies sólidas para algunas modalidades se ubican dentro de un aparato de celda de flujo. En algunas modalidades de los procesos descritos en la presente, el medio de soporte comprende poliestireno con 1% de
10 divinilbenceno reticulado.

En algunas modalidades, el medio de soporte representativo comprende al menos un sitio reactivo para la unión o síntesis de un oligómero. Por ejemplo, en algunas modalidades, un medio de soporte de la descripción comprende
15 uno o más grupos amino o hidroxilo capaces de formar un enlace químico con una subunidad entrante u otro grupo activado para la unión o síntesis de un oligómero.

Algunos medios de soporte representativos que son susceptibles a los procesos descritos en la presente incluyen,
20 pero no se limitan a, los siguientes: vidrio de poro controlado (CPG); vidrio de poro controlado con oxalilo (ver, por ejemplo, Alul, et al., Nucleic Acids Research 1991, 19, 1527); partículas que contienen sílice, tales como perlas de vidrio poroso y gel de sílice tal como aquel formado por la reacción
25 de tricloro-[3-(4-clorometil)fenil]propilsilani y perlas de

vidrio poroso (ver Parr and Grohmann, *Angew. Chem. Internatl. Ed.* 1972, 11, 314, vendido bajo la marca comercial "PORASIL E" por aguas Associates, Framingham, Mass., EUA); a mono éster de 1,4-dihidroximetilbenceno y sílice (ver Bayer and Jung, *Tetrahedron Lett.*, 1970, 4503, vendido bajo la marca comercial "BIOPAK" por aguas Associates); TENTAGEL (ver, por ejemplo, Wright, et al., *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 3373); matriz en perla de copolímero de estireno/divinilbenceno reticulado, o POROS, un copolímero de poliestireno/divinilbenceno (disponible de Perseptive Biosystems); medio de soporte soluble tal como polietilenglicol PEG (ver Bonora et al., *Organic Process Research & Development*, 2000, 4, 225-231); soporte de PEPS, el cual es una película de polietileno (PE) con injertos de poliestireno (PS) de cadena larga colgante (ver Berg, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 8024 y Solicitud de Patente Internacional WO 1990/02749); copolímeros de dimetilacrilamida reticulada con N,N'-bisacriloloiletilendiamina, incluyendo una cantidad conocida de N-tercbutoxicarbonil-beta-alanil-N'-acrilolihexametilendiamina (ver Atherton, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, 97, 6584, *Bioorg. Chem.* 1979, 8, 351, y J. C. S. Perkin I 538 (1981)); partículas de vidrio revestidas con un polímero de estireno reticulado hidrofóbico (ver Scott, et al., *J. Chrom. Sci.*, 1971, 9, 577); polímero de etileno fluorado sobre el cual se ha injertado poliestireno (ver Kent

and Merrifield, *Israel J. Chem.* 1978, 17, 243 y van
Rietschoten en *Peptides* 1974, Y. Wolman, Ed., Wiley and Sons,
New York, 1975, pp. 113-116); membranas de polipropileno
revestidas con hidroxipropilacrilato (Daniels, et
5 al., *Tetrahedron Lett.* 1989, 4345); barras de polietileno
injertado con ácido acrílico (Geysen, et al., *Proc. Natl.*
Acad. Sci. USA, 1984, 81, 3998); una "bolsa de té" que contiene
perlas de polímero tradicionalmente usadas (Houghten, *Proc.*
Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 5131); y combinaciones de los
10 mismos.

El término "aparato de celda de flujo" se refiere a
una cámara que comprende una superficie (por ejemplo,
superficie sólida) a través de la cual se pueden hacer fluir
uno o más reactivos fluidos (por ejemplo, líquido o gas).

15 El término "agente de desbloqueo" se refiere a una
composición (por ejemplo, una solución) que comprende un ácido
químico o combinación de ácidos químicos para remover grupos
protectores. Los ácidos químicos ejemplares usados en agentes
de desbloqueo incluyen ácidos halogenados, por ejemplo, ácido
20 cloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético,
ácido fluoroacético, ácido difluoroacético y ácido
trifluoroacético. En algunas modalidades, un agente de
desbloqueo remueve uno o más grupos tritilo de, por ejemplo,
un oligómero, un oligómero unido al soporte, una subunidad
25 unida al soporte, u otra porción de nitrógeno u oxígeno

protegido.

Los términos "halógeno" y "halo" se refieren a un átomo seleccionado del grupo que consiste de fluoro, cloro, bromo y yodo.

5 El término "agente de terminación de cadena" se refiere a una composición (por ejemplo, una solución) que comprende un anhídrido ácido (por ejemplo, anhídrido benzoico, anhídrido acético, anhídrido fenoxiacético y similares) útil para bloquear un sitio reactivo de, por ejemplo, un medio de
10 soporte que forma un enlace químico con una subunidad entrante u otro grupo activado.

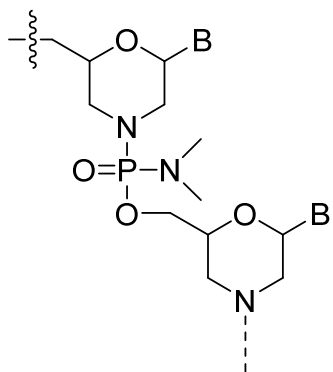
El término "agente de escisión" se refiere a una composición (por ejemplo, una solución líquida o mezcla gaseosa) que comprende una base química (por ejemplo, amoníaco
15 o 1,8-diazabicycloundec-7-eno) o una combinación de bases químicas útiles para la escisión, por ejemplo, un oligómero unido al soporte de un medio de soporte.

El término "agente de desprotección" se refiere a una composición (por ejemplo, una solución líquida o mezcla
20 gaseosa) que comprende una base química (por ejemplo, amoníaco, 1,8-diazabicycloundec-7-eno o carbonato de potasio) o una combinación de bases químicas útiles para remover grupos protectores. Por ejemplo, un agente de desprotección, en algunas modalidades, puede remover la protección de base de,
25 por ejemplo, una subunidad de morfolino, subunidades de

morfolino de un oligómero de morfolino, o versiones unidas al soporte de los mismos.

El término "solvente" se refiere a un componente de una solución o mezcla en la cual se disuelve un soluto. Los
 5 solventes pueden ser inorgánicos u orgánicos (por ejemplo, ácido acético, acetona, acetonitrilo, acetil acetona, 2-aminoetanol, anilina, anisol, benceno, benzonitrilo, alcohol bencílico, 1-butanol, 2-butanol, i-butanol, 2-butanone, alcohol t-butílico, disulfuro de carbono, tetracloruro de
 10 carbono, clorobenceno, cloroformo, ciclohexano, ciclohexanol, ciclohexanona, di-n-butilftalato, 1,1-dicloroetano, 1,2-dicloroetano, dietilamina, dietilenglicol, diglima, dimetoxietano (glima), N,N-dimetilanilina, dimetilformamida, dimetilftalato, dimetilsulfóxido, dioxano, etanol, éter,
 15 acetato de etilo, acetoacetato de etilo, benzoato de etilo, etilenglicol, glicerina, heptano, 1-heptanol, hexano, 1-hexanol, metanol, acetato de metilo, metil t-butil éter, cloruro de metileno, 1-octanol, pentano, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-pentanona, 3-pentanona, 1-propanol, 2-
 20 propanol, piridina, tetrahidrofurano, tolueno, agua, p-xileno).

Los términos "morfolino", "oligómero de morfolino" o "PMO" (oligómero de morfolino fosforamidato o fosforodiamidato) se refieren a un oligómero de morfolino
 25 fosforodiamidato de la siguiente estructura general:

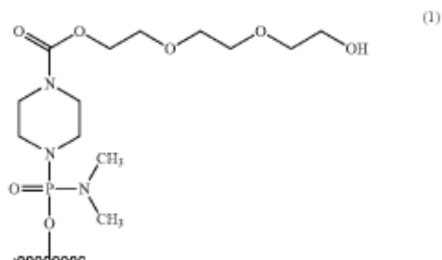


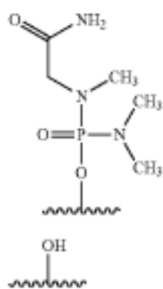
B = nucleobase

y como se describe en la Figura 2 de Summerton, J., et al.,
Antisense & Nucleic Acid Drug Development, 7: 187-195 (1997).

Los morfolinos como se describe en la presente están destinados
 a cubrir todos los estereoisómeros y configuraciones de la
 estructura general anterior. Las síntesis, estructuras y
 características de unión de los oligómeros de morfolino se
 destallan en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,698,685,
 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,521,063,
 5,506,337, 8,076,476, y 8,299,206, cuyas totalidades se
 incorporan en la presente como referencia.

En ciertas modalidades, un morfolino se conjuga en el
 extremo 5' o 3' del oligómero con una porción de "cola" para
 aumentar su estabilidad y/o solubilidad. Las colas ejemplares
 incluyen:





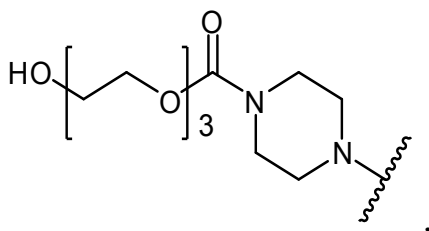
(2)

(3)

5

El término "cola de EG3" se refiere a porciones de trietilenglicol conjugadas al oligómero, por ejemplo, en su extremo 3' o 5'. Por ejemplo, en algunas modalidades, la "cola de EG3" conjugada al extremo 3' de un oligómero puede ser de la estructura:

10



15

Los términos "alrededor de" o "aproximadamente" generalmente se entienden por las personas reconocibles en el área objeto relevante, pero en ciertas circunstancias pueden significar dentro de $\pm 10\%$, o dentro de $\pm 5\%$, de un valor o rango dado.

20

Procesos para Preparar Oligómeros de Morfolino

La síntesis generalmente se realiza, como se describe en la presente, en un medio de soporte. En general, un primer sintón (por ejemplo un monómero, tal como una subunidad de morfolino) primero se une a un medio de soporte y el oligómero

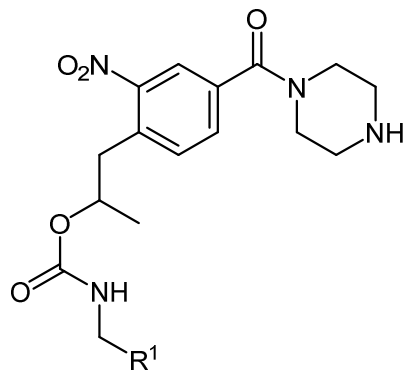
25

luego se sintetiza acoplando secuencialmente subunidades al
sintón unido al soporte. Este alargamiento iterativo finalmente
resulta en un compuesto oligomérico final. Los medios de soporte
adecuados pueden ser solubles o insolubles o pueden poseer
5 solubilidad variable en diferentes solventes para permitir el
crecimiento de polímero unido al soporte ya sea dentro o fuera
de solución como se desee.

Los medios de soporte tradicionales son en su mayoría
insolubles y rutinariamente se colocan en recipientes de
10 reacción mientras los reactivos y solventes reaccionan y/o
lavan la cadena de crecimiento hasta que el oligómero ha
alcanzado la longitud de objetivo, después de lo cual se escinde
del soporte y, si es necesario, se elabora adicionalmente para
producir el compuesto polimérico final. Los procedimientos más
15 recientes han introducido soportes solubles que incluyen
soportes de polímero solubles para permitir la precipitación y
disolución del producto iterativamente sintetizado en puntos
deseados en el síntesis (Gravert et al., Chem. Rev., 1997,
97,489-510).

20 En la presente se proporcionan procesos para preparar
oligómeros de morfolino.

Por lo tanto, en un aspecto, en la presente se
proporciona a proceso para preparar un compuesto de Fórmula
(II):

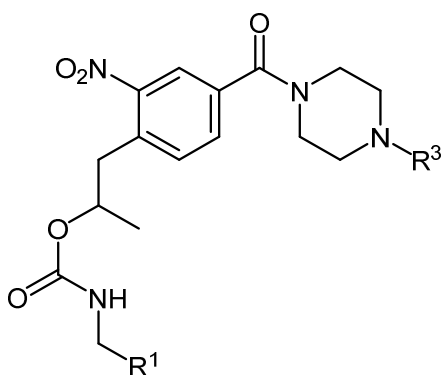


(II);

en donde R^1 es un medio de soporte;

en donde el proceso comprende poner en contacto un

10 compuesto de Fórmula (A1):

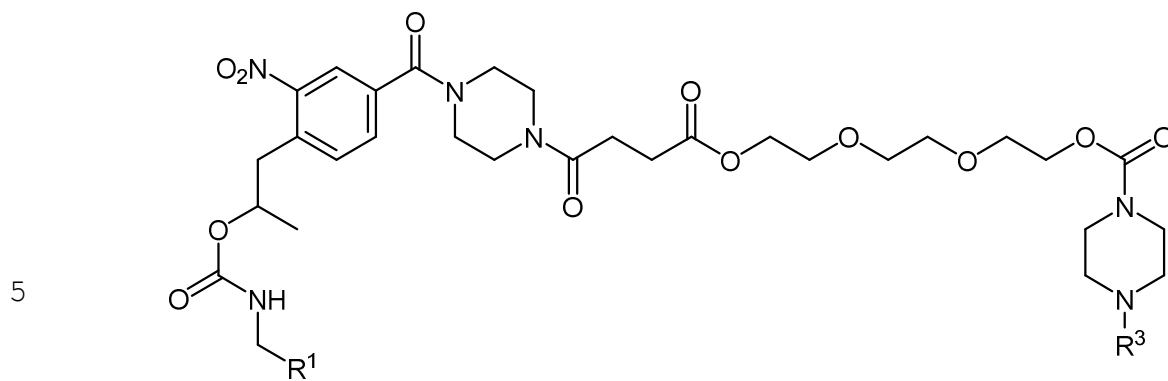


(A1);

en donde R^1 es un medio de soporte y R^3 se selecciona del grupo que consiste de tritilo, monometoxitritilo, 20 dimetoxitritilo y trimetoxitritilo;

con un agente de desbloqueo para formar el compuesto de Fórmula (II).

En otro aspecto, en la presente se proporciona un proceso para preparar un compuesto de Fórmula (A3):

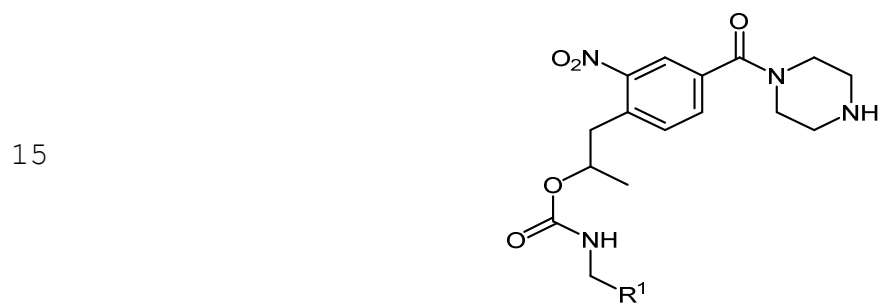


(A3);

en donde R¹ es un medio de soporte, y R³ se selecciona del grupo que consiste de tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo;

10

en donde el proceso comprende poner en contacto un compuesto de Fórmula (II):

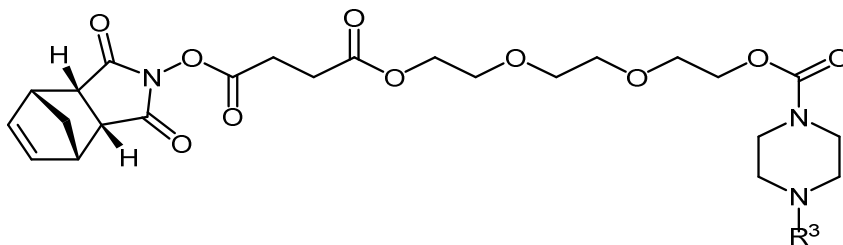


(II);

en donde R¹ es un medio de soporte;

con un compuesto de Fórmula (A2):

20



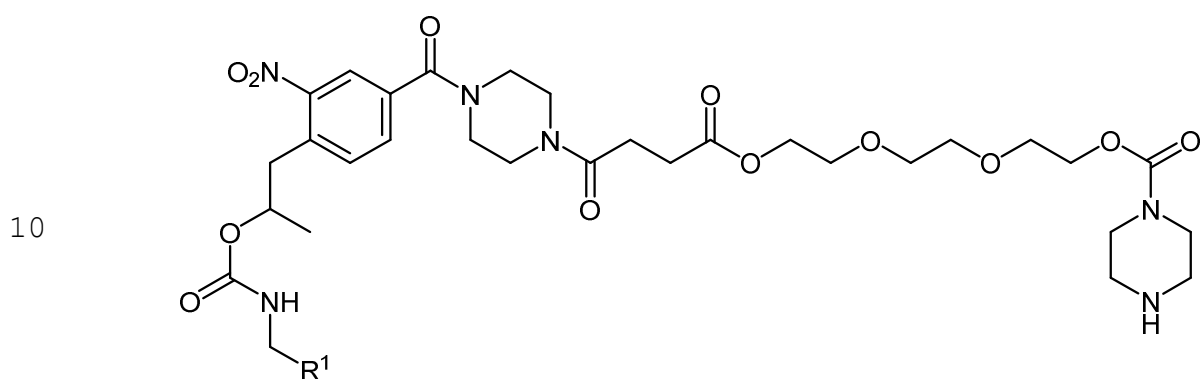
(A2);

25

en donde R^3 se selecciona del grupo que consiste de tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo;

para formar el compuesto de Fórmula (A3).

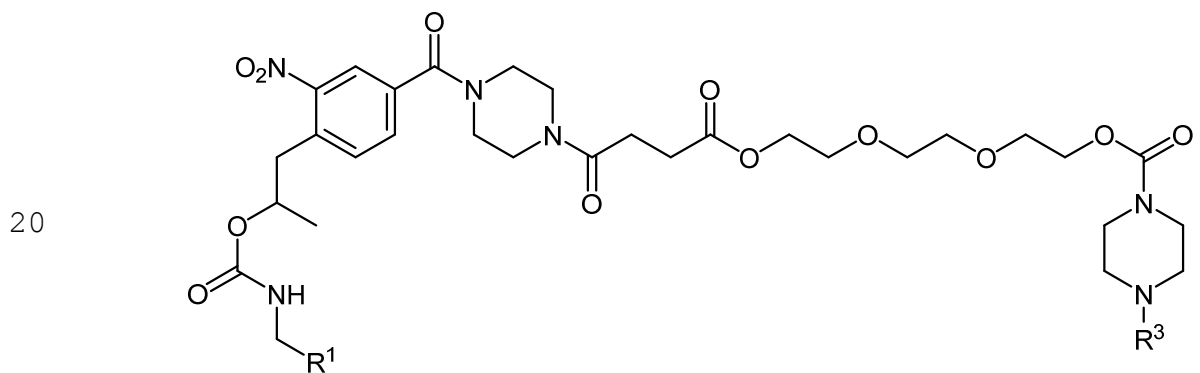
En aún otro aspecto, en la presente se proporciona un proceso para preparar un compuesto de Fórmula (IV):



(IV);

en donde R^1 es un medio de soporte;

en donde el proceso comprende poner en contacto un compuesto de Fórmula (A3):



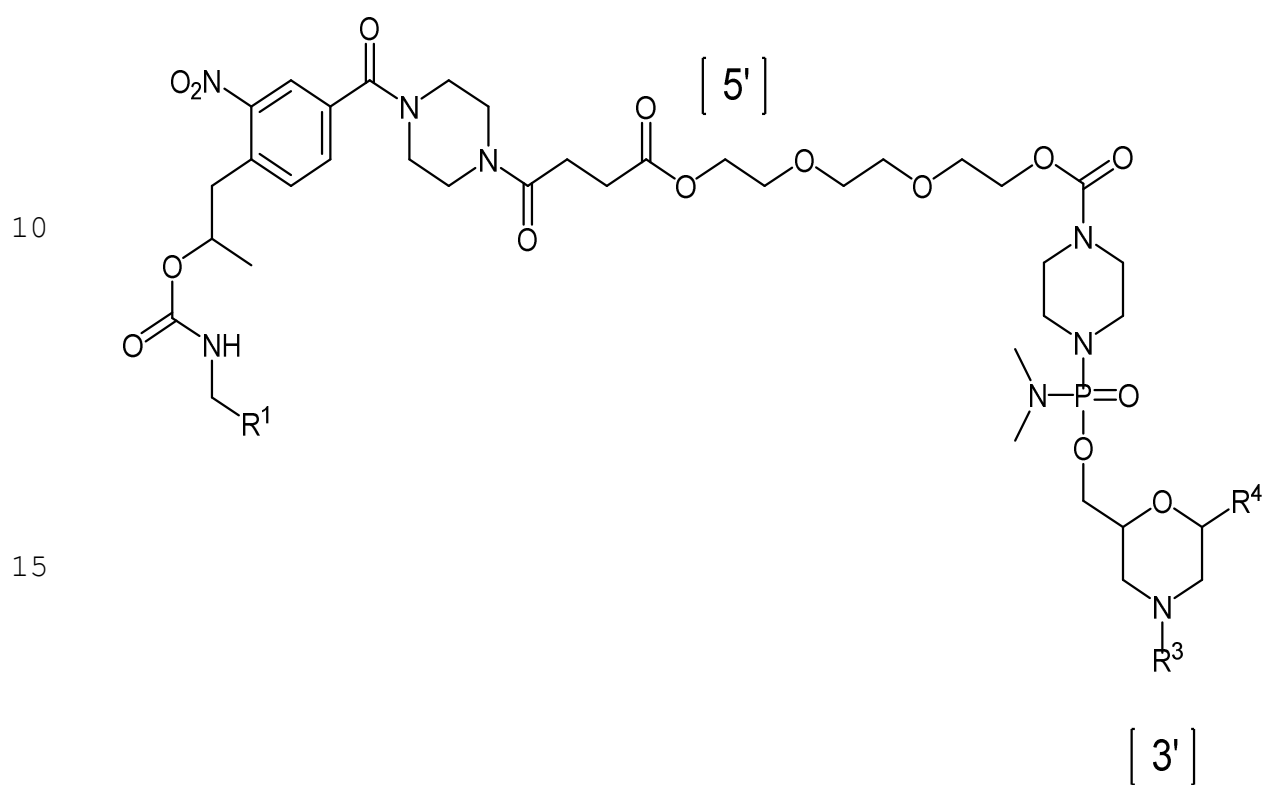
(A3);

en donde R^1 es un medio de soporte, y R^3 se selecciona del grupo que consiste de tritilo, monometoxitritilo,

dimetoxitritilo y trimetoxitritilo;

con un agente de desbloqueo para formar un compuesto de Fórmula (IV).

En todavía otro aspecto, en la presente se proporciona un proceso para preparar un compuesto de Fórmula (A5):

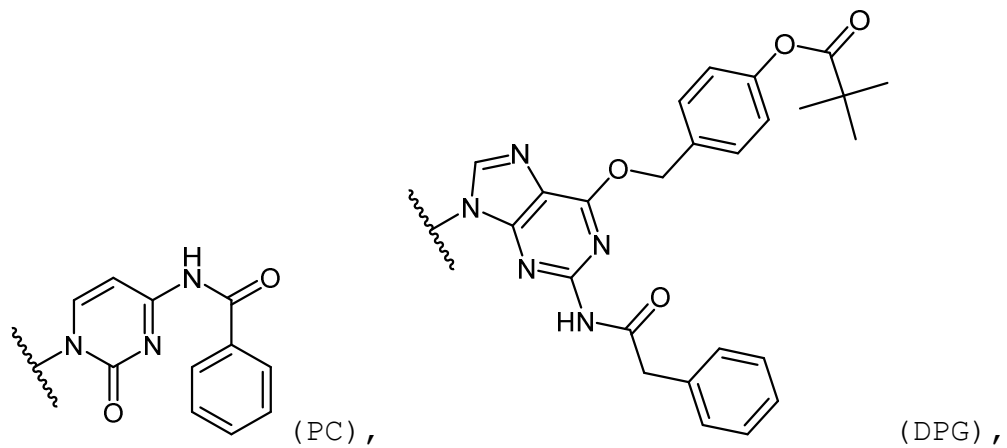


(A5);

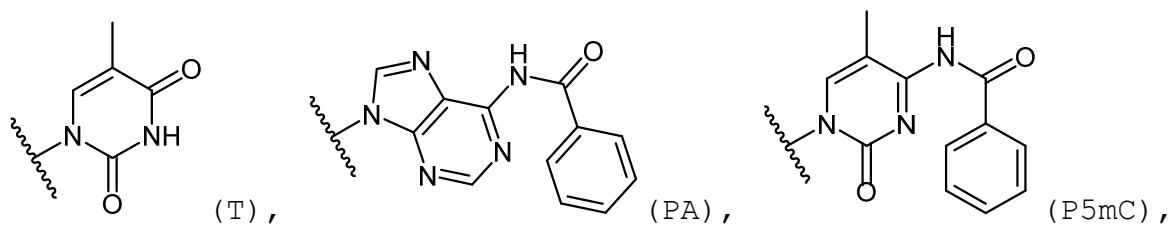
en donde R¹ es un medio de soporte, R³ se selecciona del grupo que consiste de tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo, y

R⁴ se selecciona del grupo que consiste de:

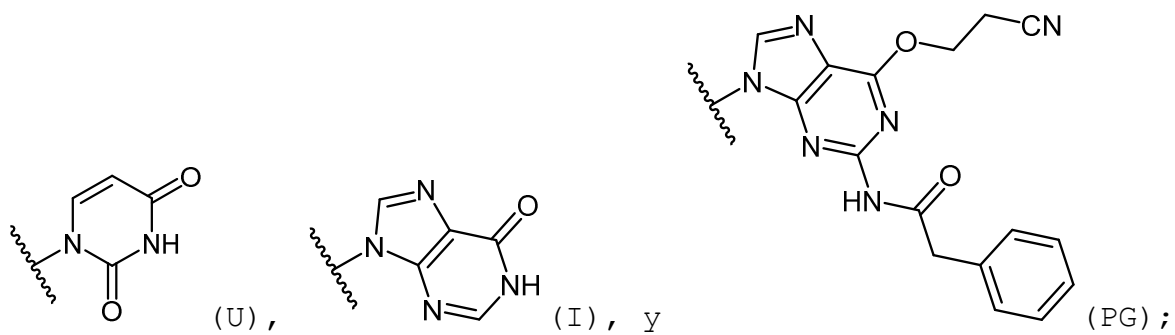
5



10

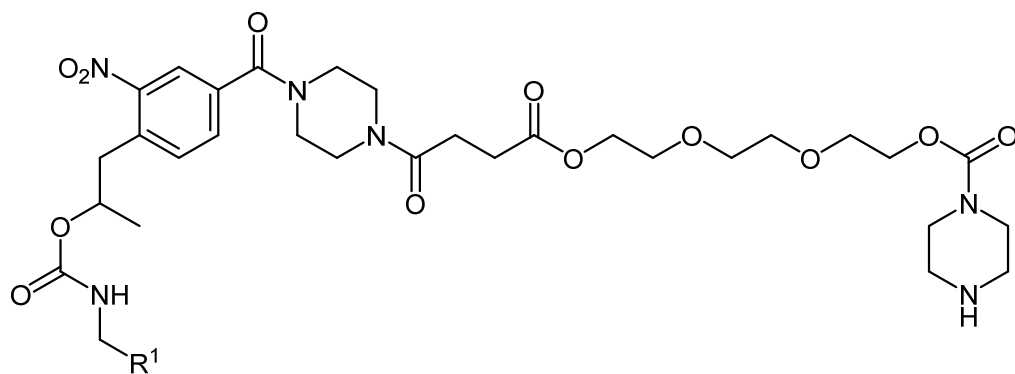


15



en donde el proceso comprende poner en contacto un compuesto de Fórmula (IV) :

20



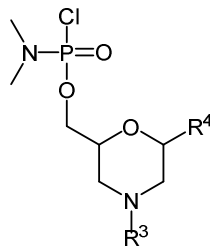
25

(IV) ;

en donde R^1 es un medio de soporte;

con un compuesto de Fórmula (A4):

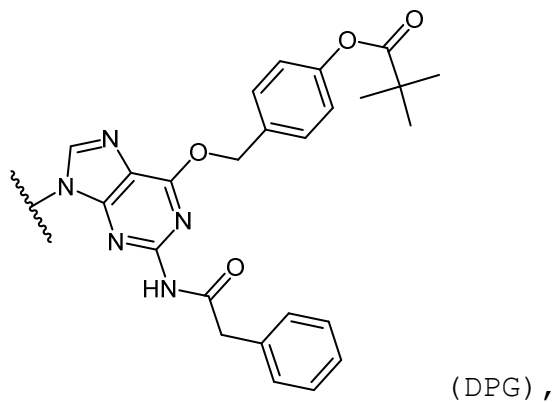
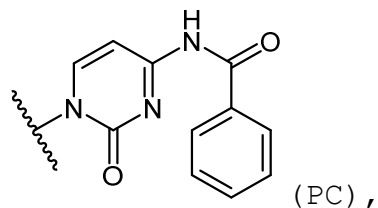
5



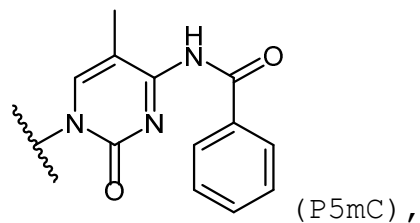
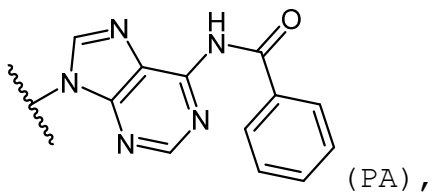
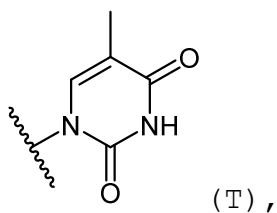
(A4);

en donde R^3 se selecciona del grupo que consiste de
 tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y
 10 trimetoxitritilo, y R^4 se selecciona del grupo que consiste de:

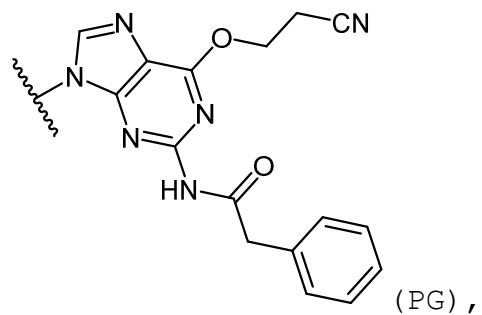
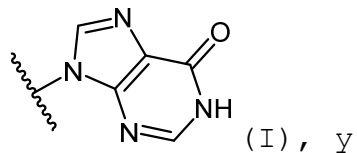
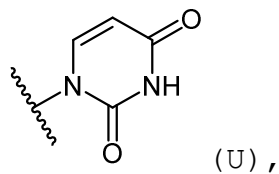
15



20

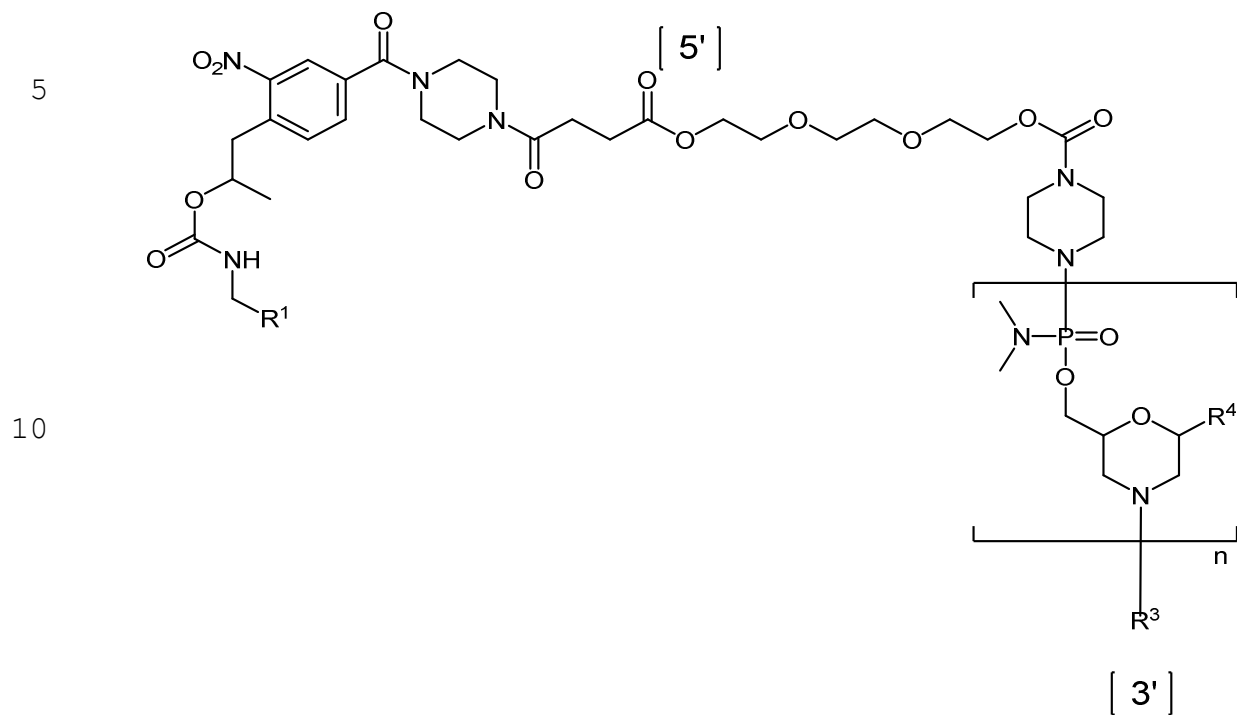


25

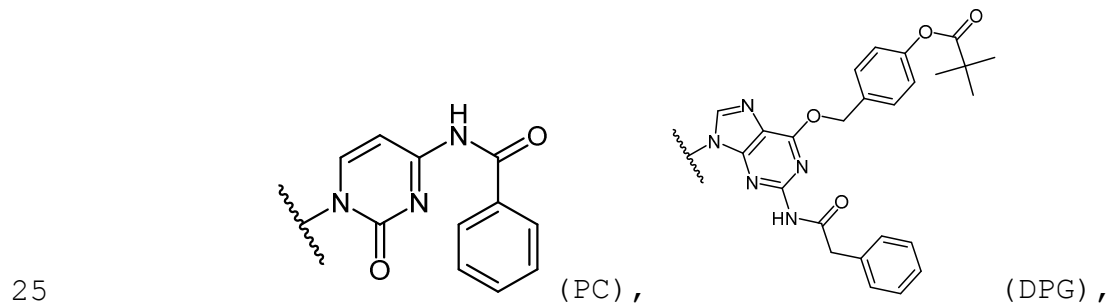


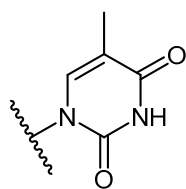
para formar un compuesto de Fórmula (A5).

En otro aspecto, en la presente se proporciona un proceso para preparar un compuesto de Fórmula (A9):

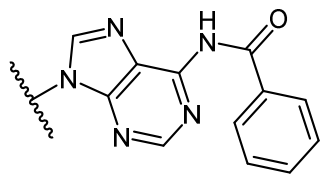


en donde n es un número entero desde 10 a 40, R¹ es un medio de soporte, R³ se selecciona del grupo que consiste de tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo, y R⁴, independientemente para cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:

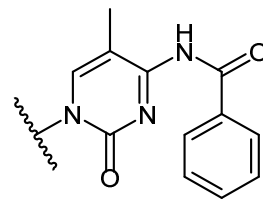




(T) ,

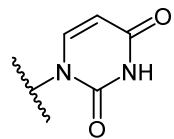


(PA) ,

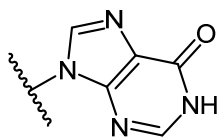


(P5mC) ,

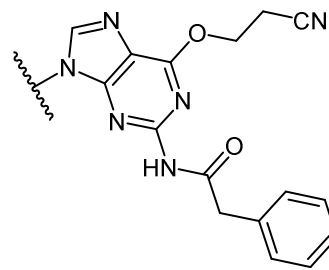
5



(U) ,



(I) , y

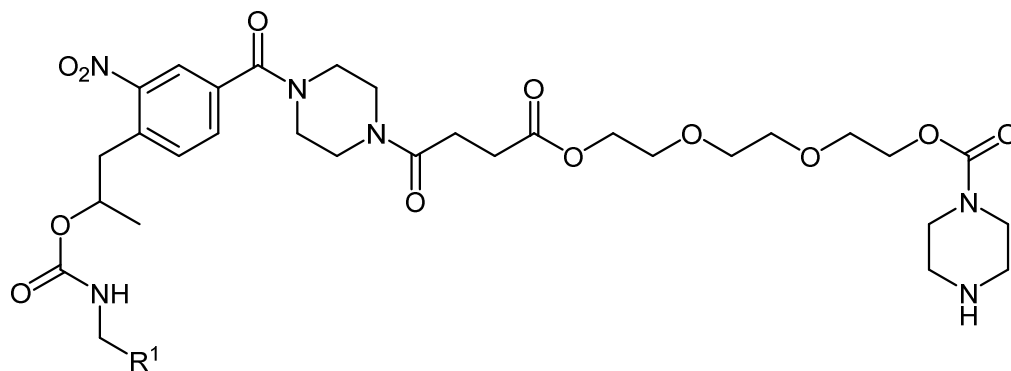


(PG) ; y

en donde el proceso comprende las etapas secuenciales

10 de:

(a) poner en contacto un compuesto de Fórmula (IV):



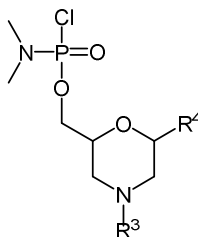
15

(IV) ;

en donde R^1 es un medio de soporte;

20

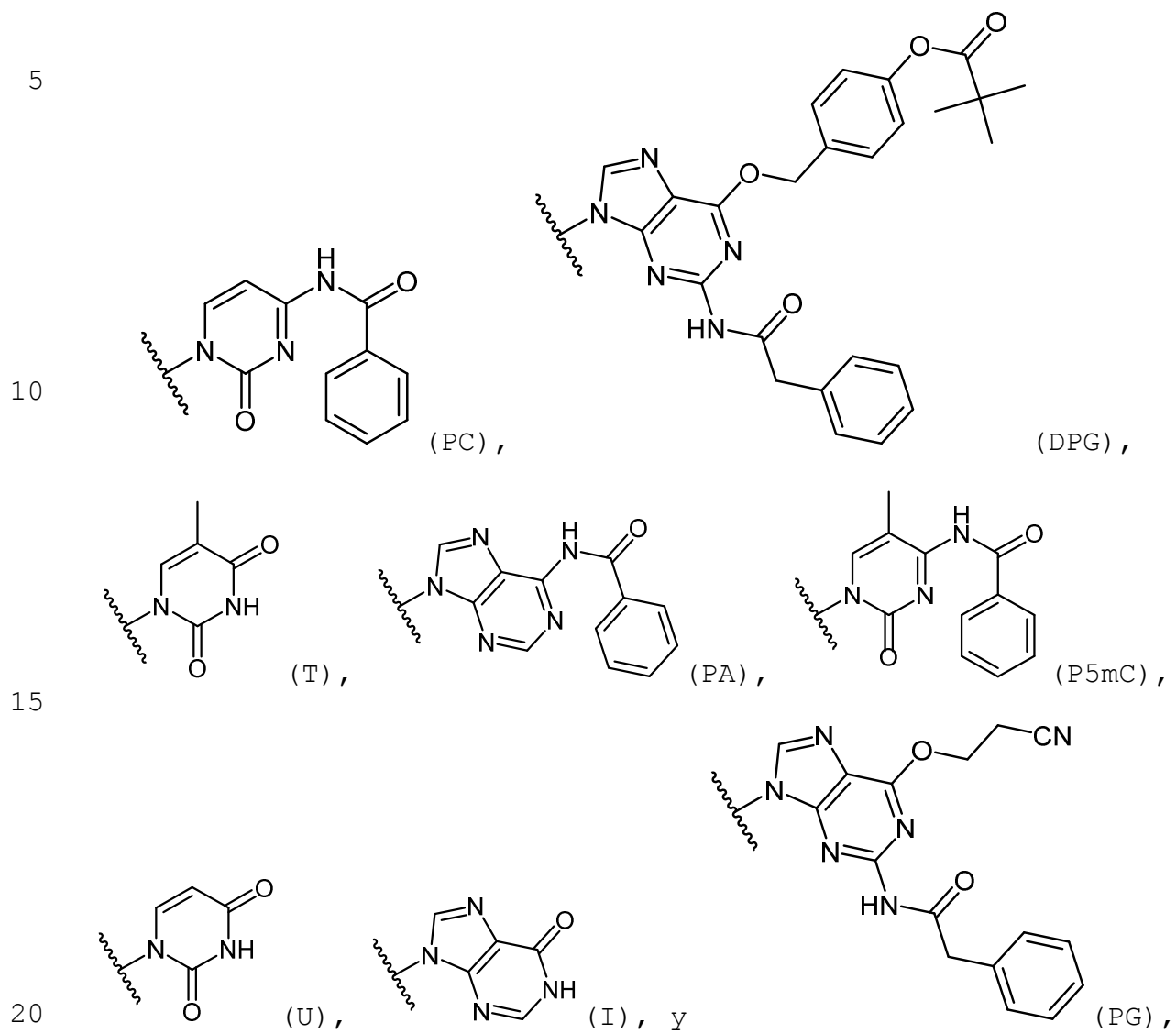
con un compuesto de Fórmula (A4):



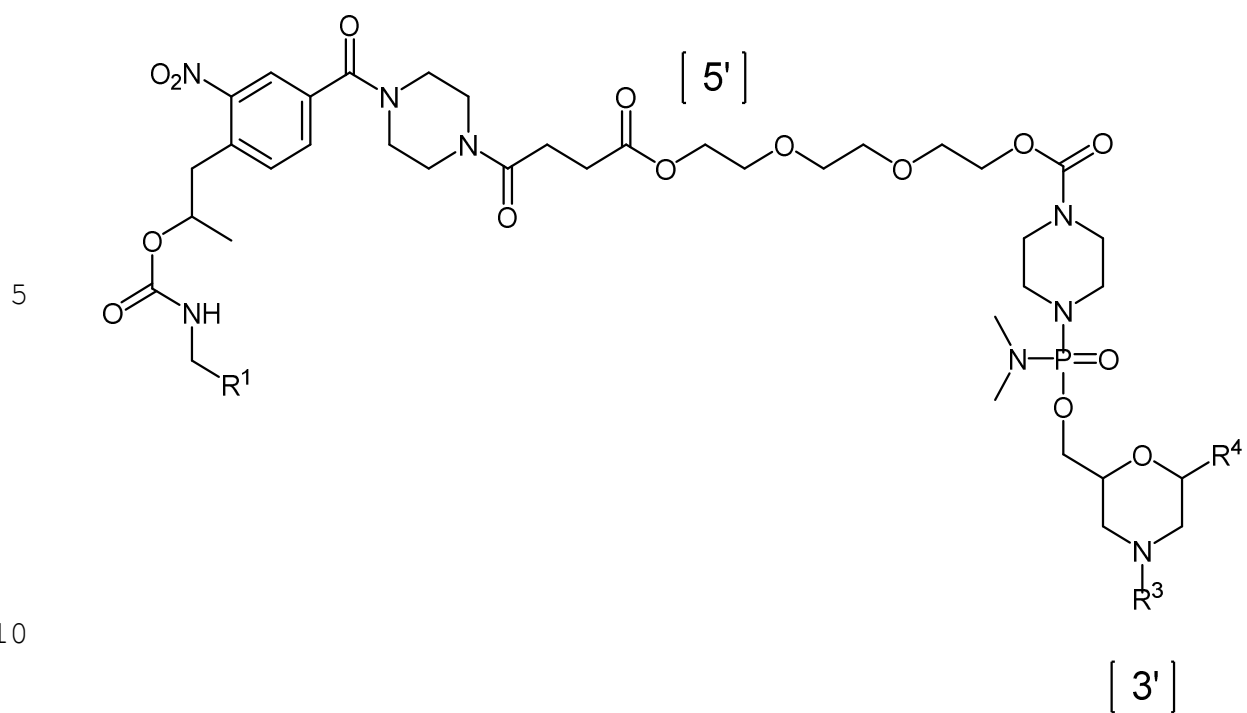
25

(A4) ;

en donde R^3 se selecciona del grupo que consiste de
 tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y
 trimetoxitritilo, y R^4 se selecciona del grupo que consiste de:



para formar un compuesto de Fórmula (A5):

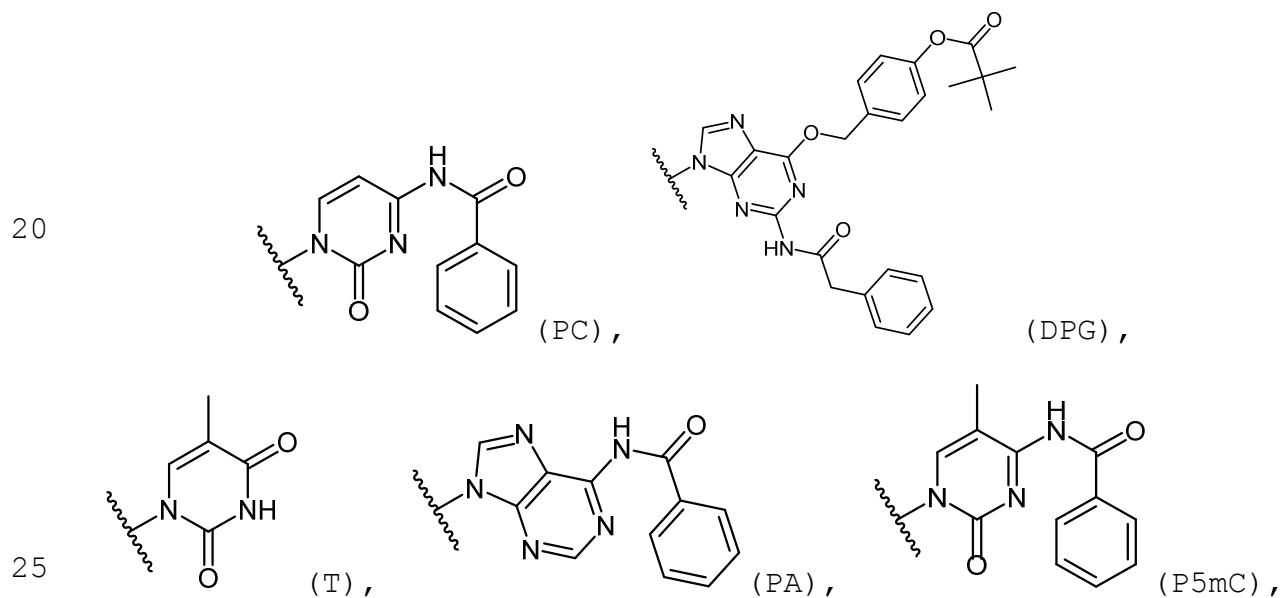


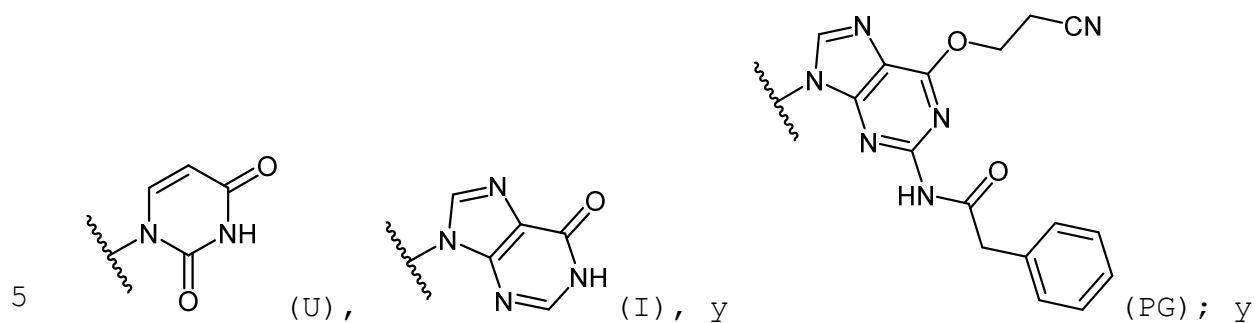
(A5);

en donde R^1 es un medio de soporte, R^3 se selecciona del grupo que consiste de tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo, y

15

R^4 se selecciona del grupo que consiste de:





(b) realizar n-1 iteraciones de las etapas
secuenciales de:

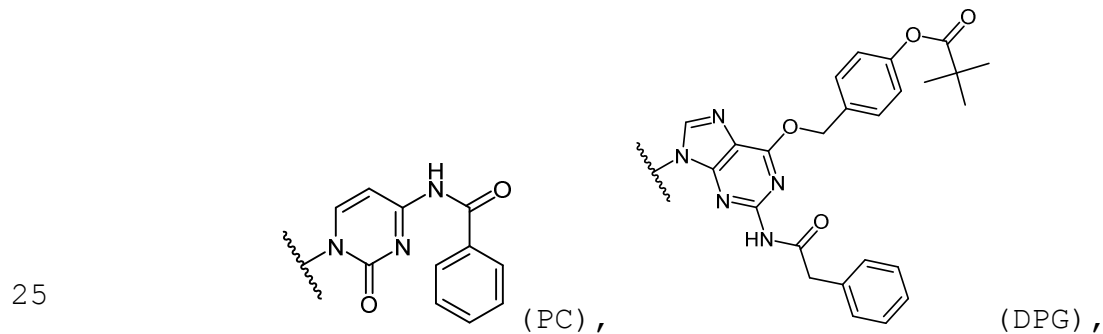
(b1) poner en contacto el producto formado por la
etapa inmediatamente previa con un agente de desbloqueo; y

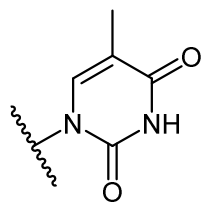
10 (b2) poner en contacto el compuesto formado por la
etapa inmediatamente previa con un compuesto de Fórmula (A8):



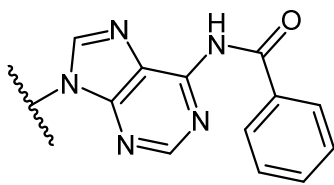
(A8);

en donde R³ se selecciona del grupo que consiste de
tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y
20 trimetoxitritilo, y R⁴ se selecciona del grupo que consiste de:

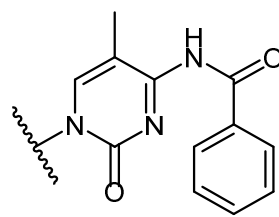




(T) ,

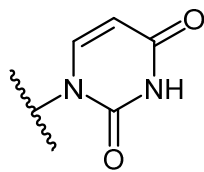


(PA) ,

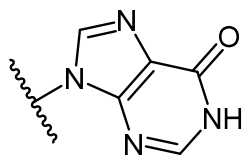


(P5mC) ,

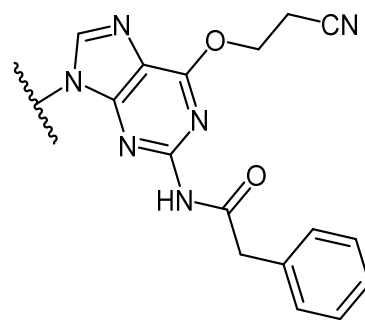
5



(U) ,



(I) , y



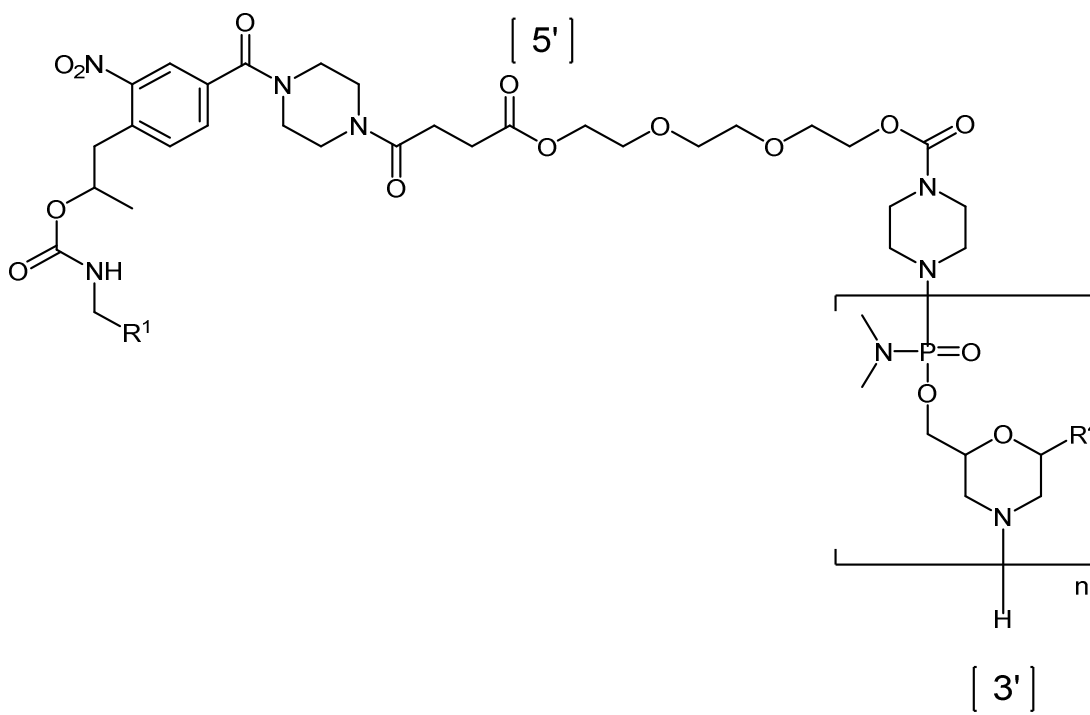
(PG) ,

10

para formar un compuesto de Fórmula (A9) .

En todavía otro aspecto, en la presente se proporciona un proceso para preparar un compuesto de Fórmula (A10) :

15

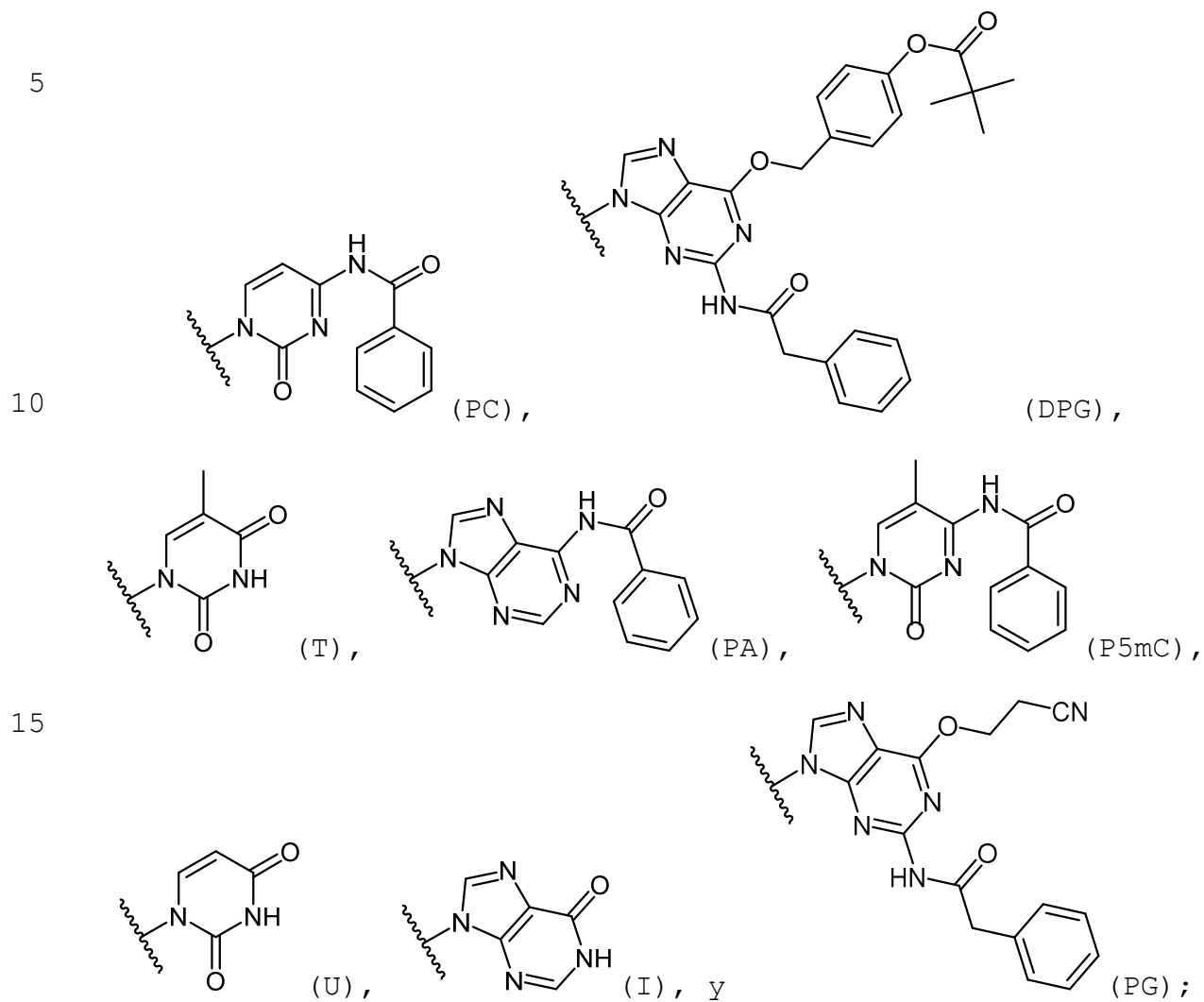


20

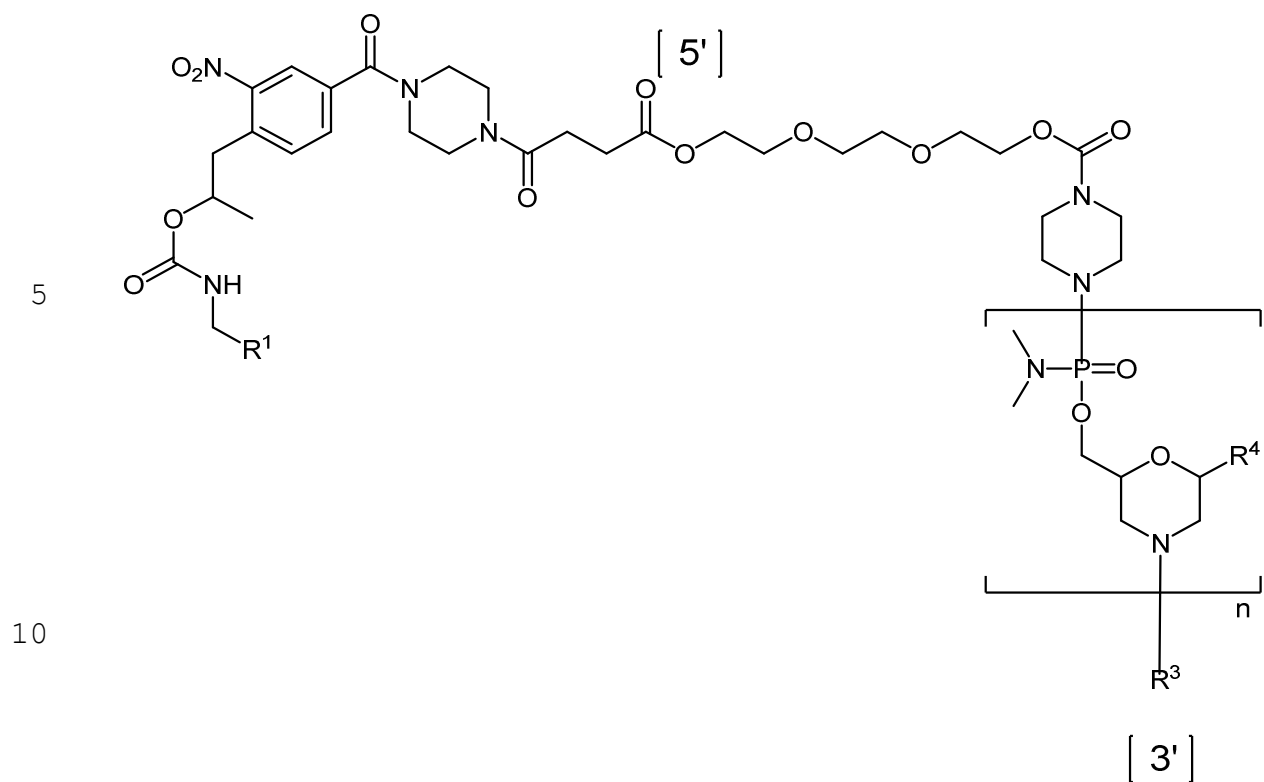
25

(A10) ;

en donde n es un número entero desde 10 a 40, R^1 es un medio de soporte, y R^4 , independientemente de cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:

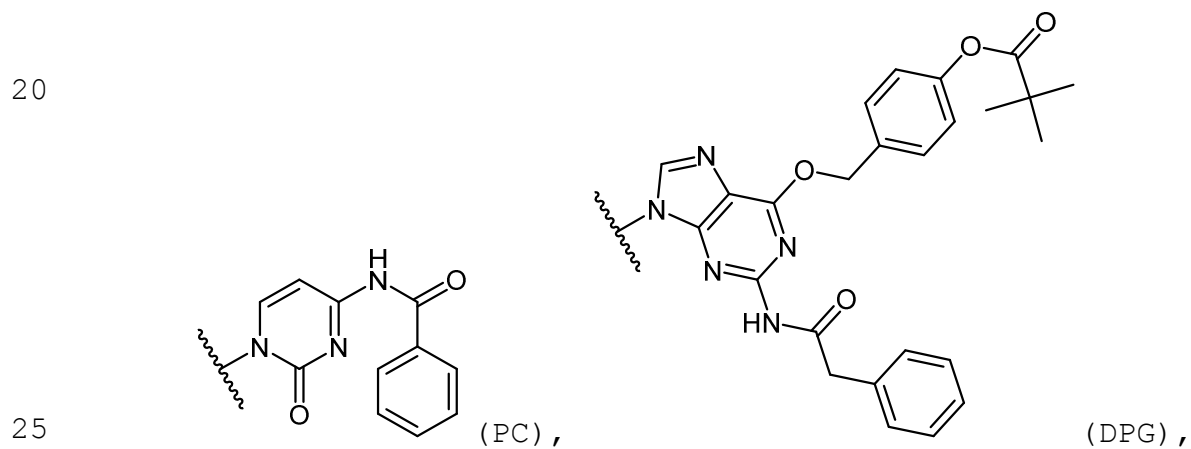


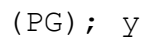
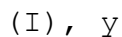
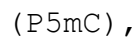
en donde el proceso comprende poner en contacto un compuesto de Fórmula (A9):



(A9) ;

en donde n es un número entero desde 10 a 40, R¹ es
 15 un medio de soporte, R³ se selecciona del grupo que consiste de
 tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y
 trimetoxitritilo, y R⁴, independientemente de cada aparición,
 se selecciona del grupo que consiste de:





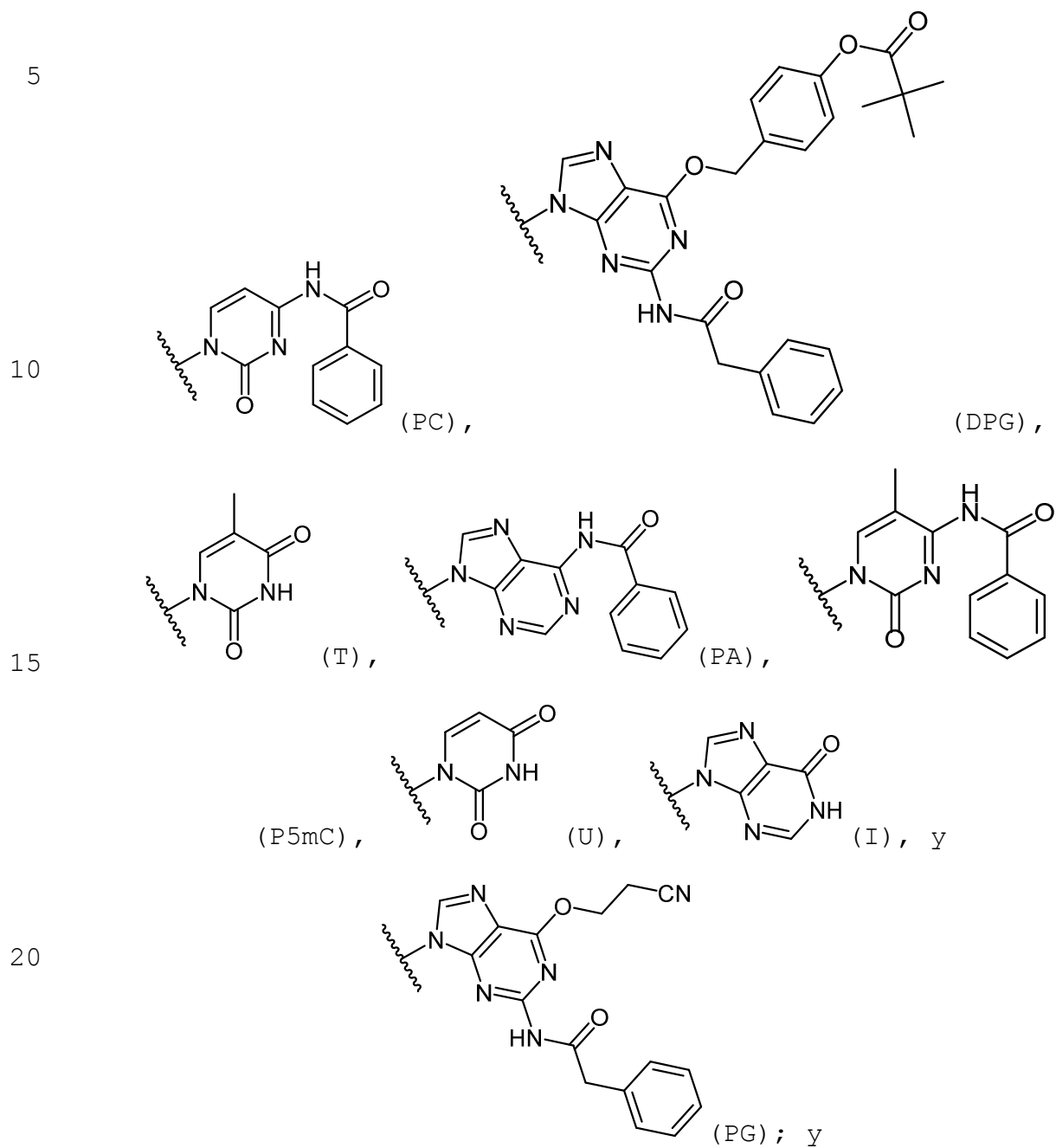
15

20

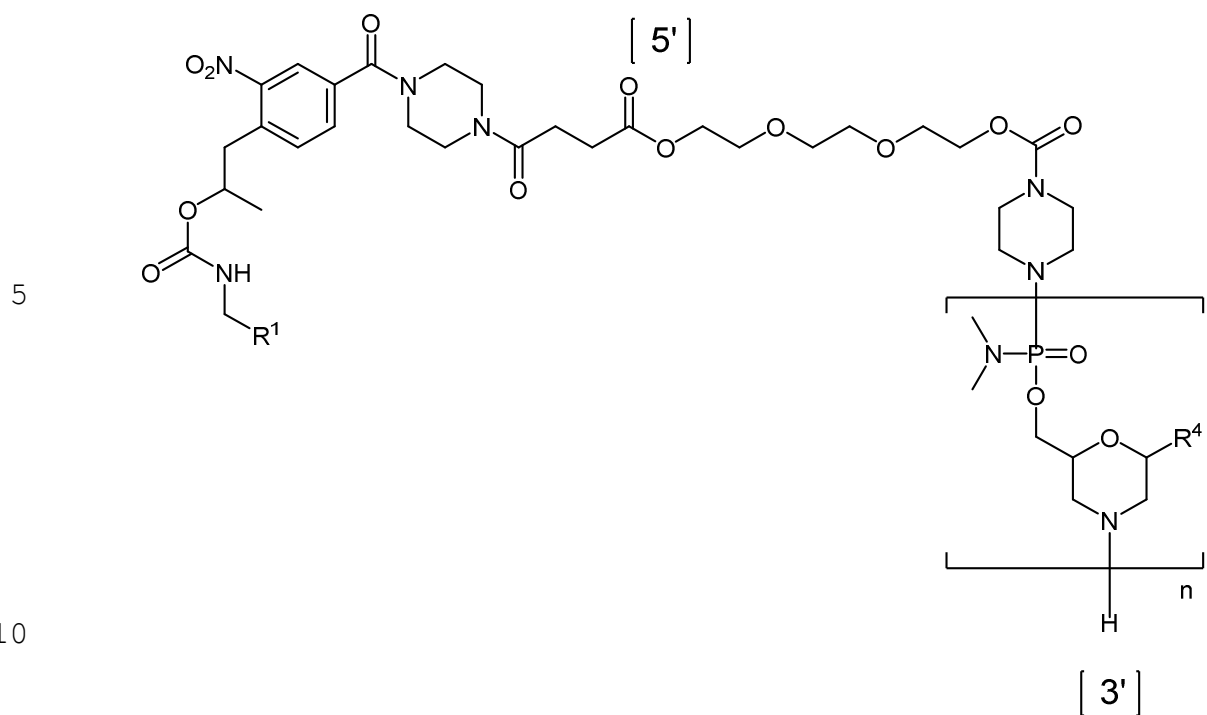


(A11) ;

en donde n es un número entero desde 10 a 40, y R^4 , independientemente de cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:

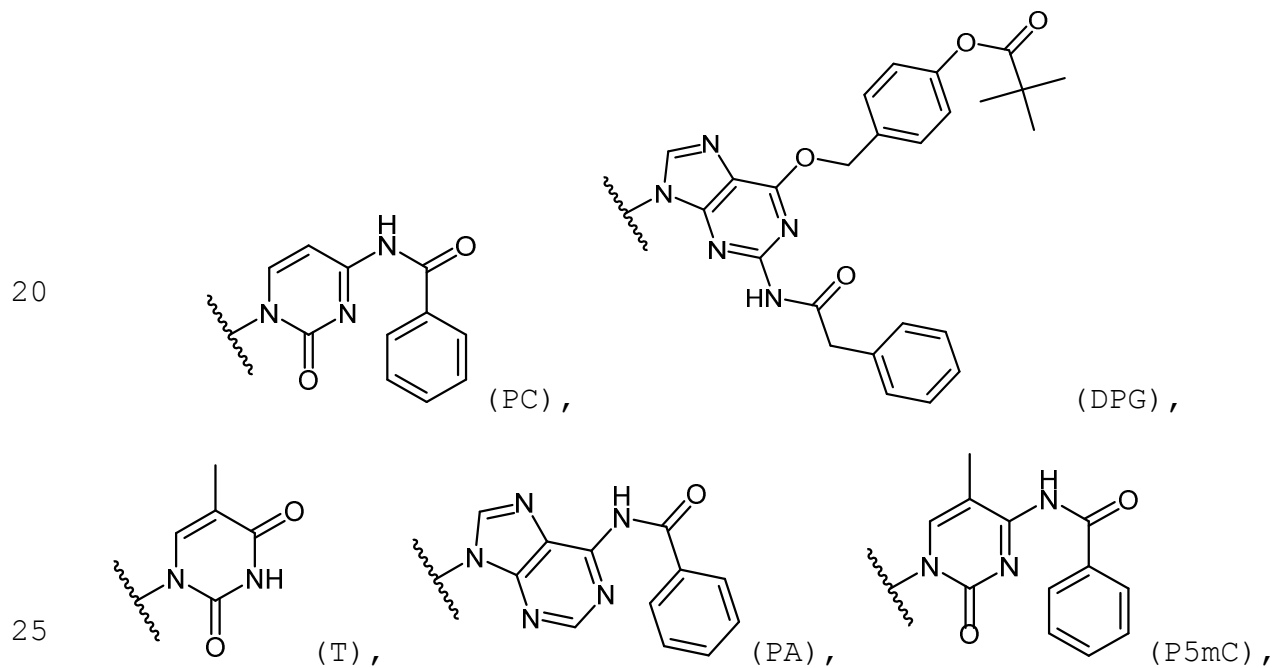


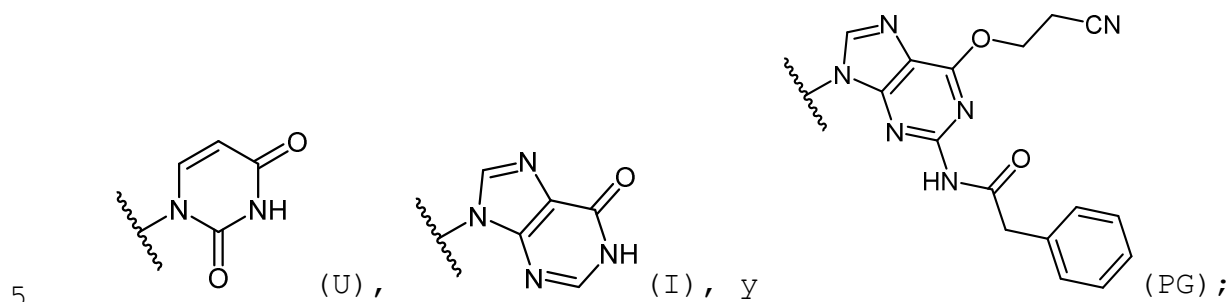
en donde el proceso comprende poner en contacto el
25 compuesto de Fórmula (A10):



(A10) ;

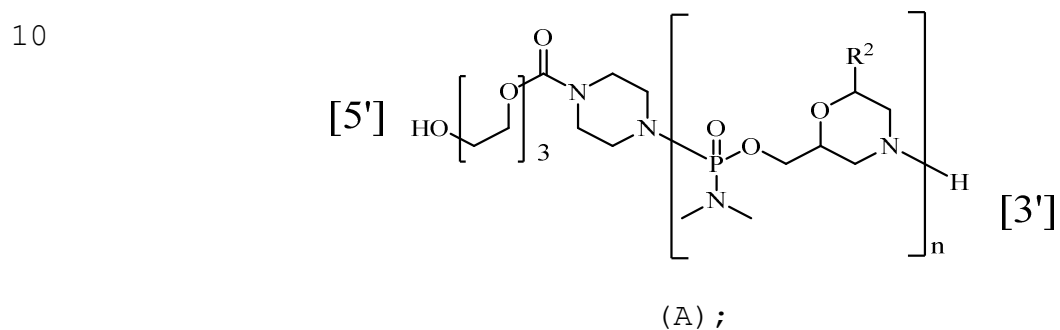
en donde n es un número entero desde 10 a 40, R¹ es
 un medio de soporte, y R⁴, independientemente de cada aparición,
 15 se selecciona del grupo que consiste de:



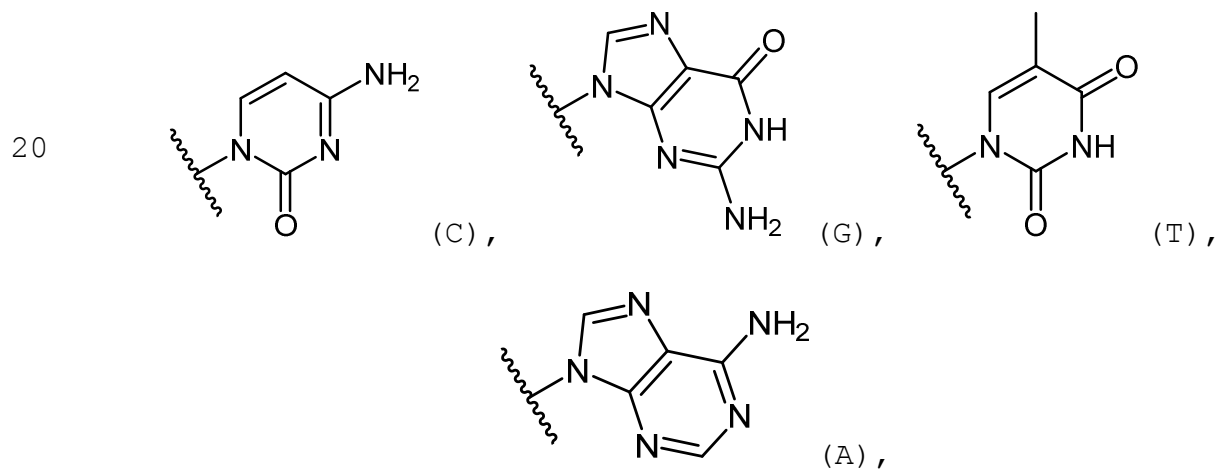


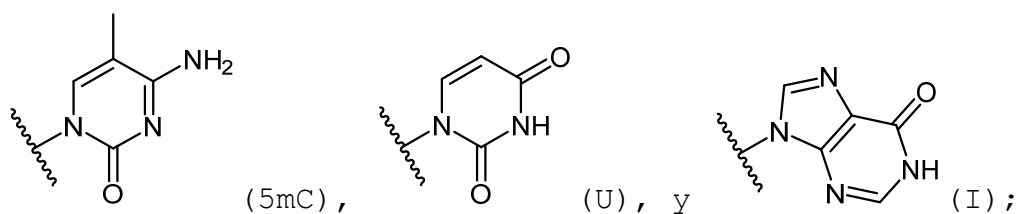
con un agente de escisión para formar un compuesto de Fórmula (A11).

En otro aspecto, en la presente se proporciona un proceso para preparar un compuesto oligomérico de Fórmula (A):

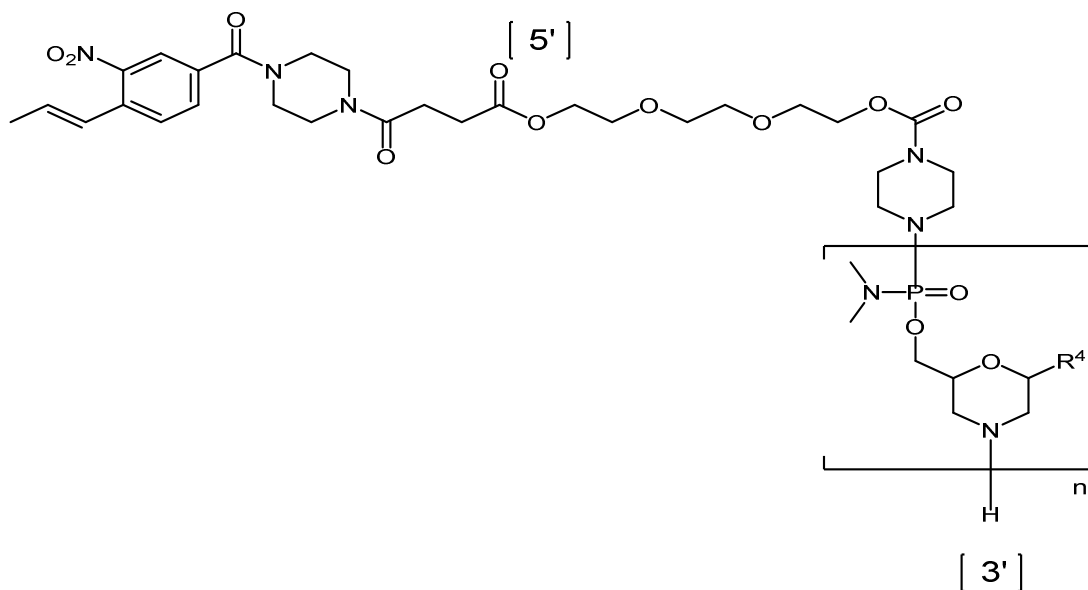


15 en donde n es un número entero desde 10 a 40, y cada R^2 , independientemente de cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:



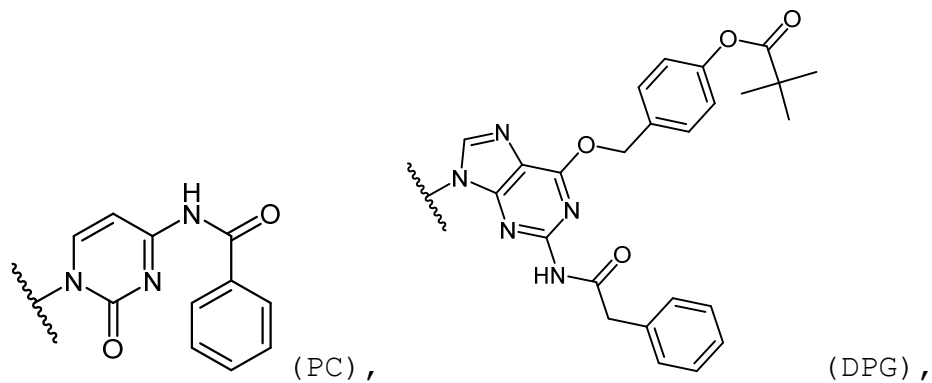


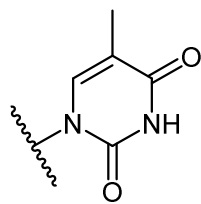
en donde el proceso comprende poner en contacto un
 5 compuesto de Fórmula (A11):



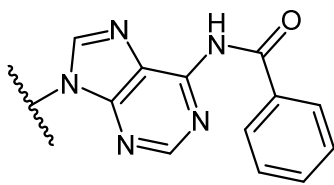
(A11);

en donde n es un número entero desde 10 a 40, y R⁴,
 independientemente de cada aparición, se selecciona del grupo
 que consiste de:

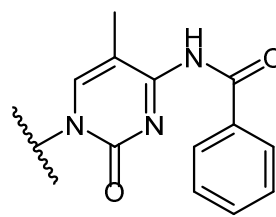




(T) ,

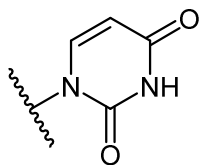


(PA) ,

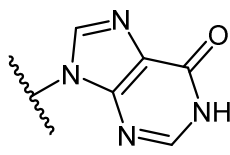


(P5mC) ,

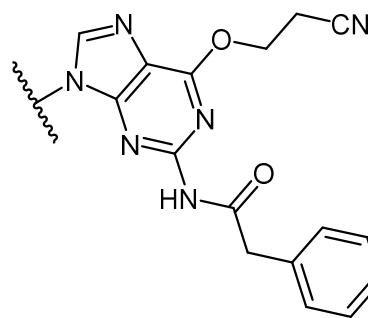
5



(U) ,



(I) , y



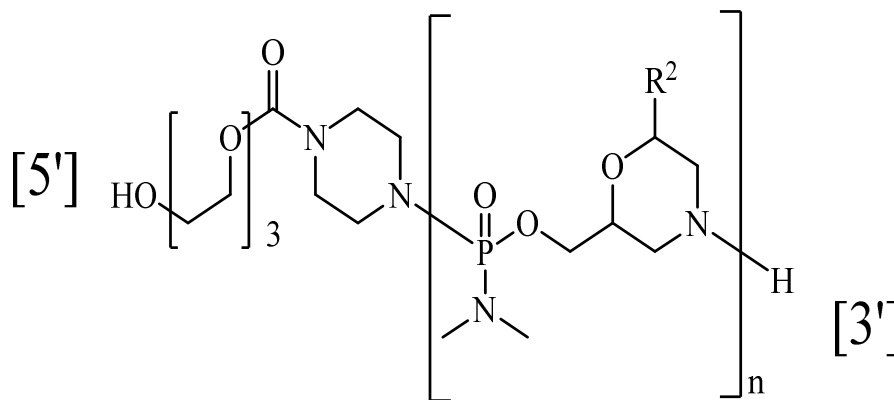
(PG) ; y

10

con un agente de desprotección para formar el compuesto oligomérico de Fórmula (A).

En otro aspecto, en la presente se proporciona un proceso para preparar un compuesto oligomérico de Fórmula (A):

15

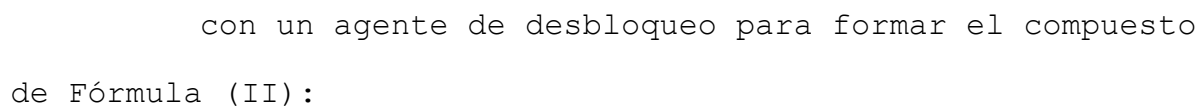


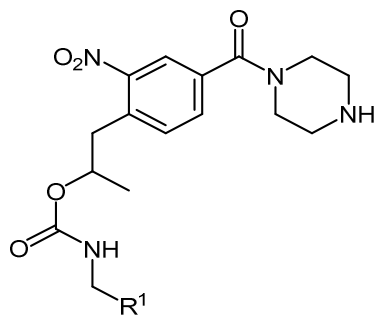
20

(A) ;

en donde n es un número entero desde 10 a 40, y cada R^2 , independientemente de cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:

25

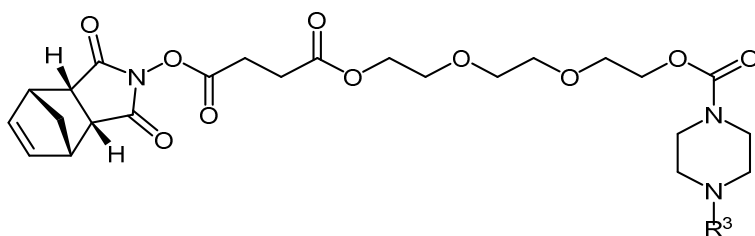




(II);

en donde R^1 es un medio de soporte;

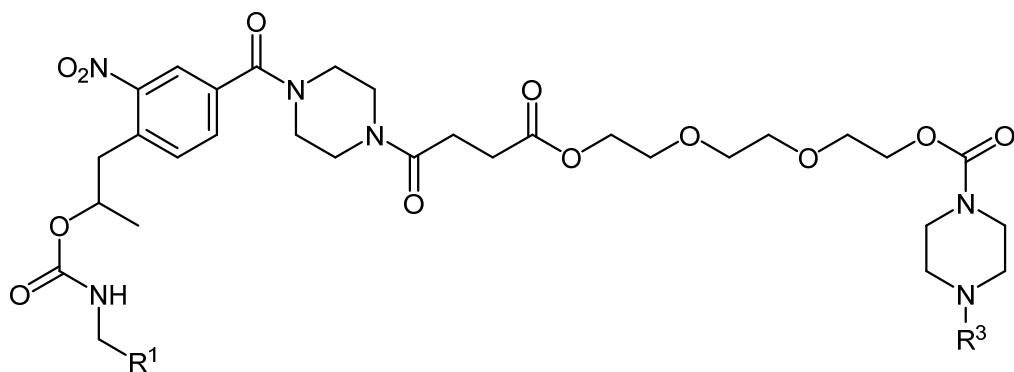
(b) poner en contacto el compuesto de Fórmula (II) con un compuesto de Fórmula (A2):



(A2);

en donde R^3 se selecciona del grupo que consiste de tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo;

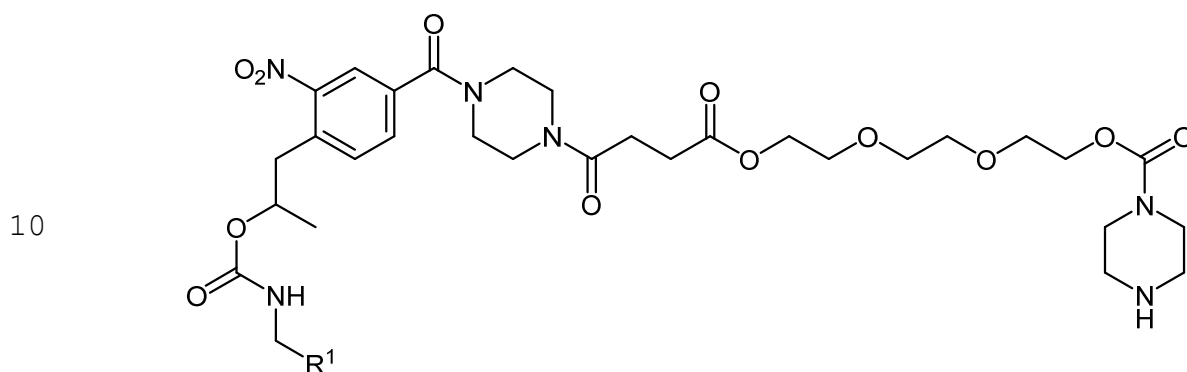
para formar un compuesto de Fórmula (A3):



(A3);

en donde R^1 es un medio de soporte, y R^3 se selecciona del grupo que consiste de tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo;

(c) poner en contacto el compuesto de Fórmula (A3) con un agente de desbloqueo para formar un compuesto de Fórmula (IV):



(IV);

en donde R^1 es un medio de soporte;

(d) poner en contacto el compuesto de Fórmula (IV) con un compuesto de Fórmula (A4):

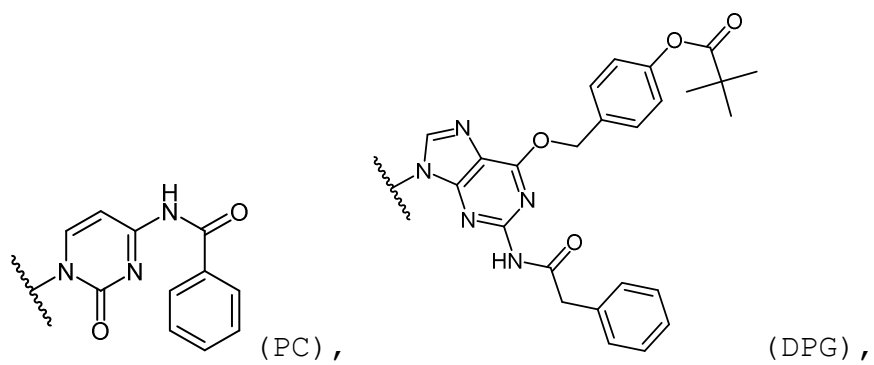


(A4);

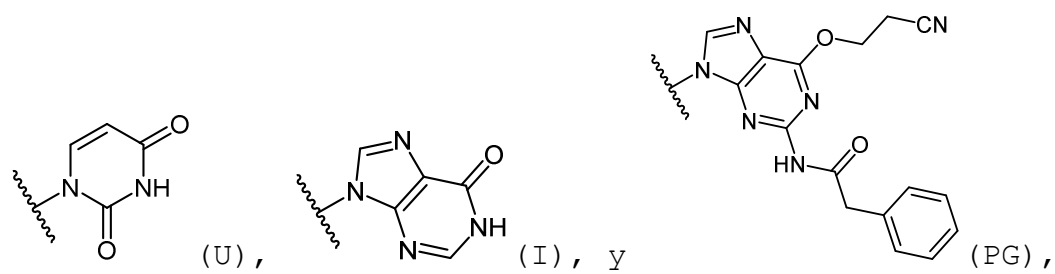
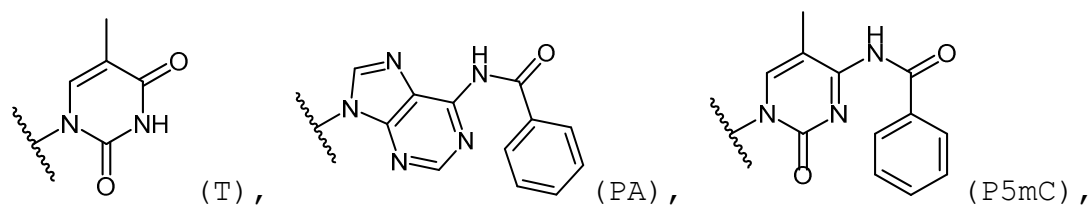
en donde R^3 se selecciona del grupo que consiste de tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo, y R^4 se selecciona del grupo que consiste de:

25

5



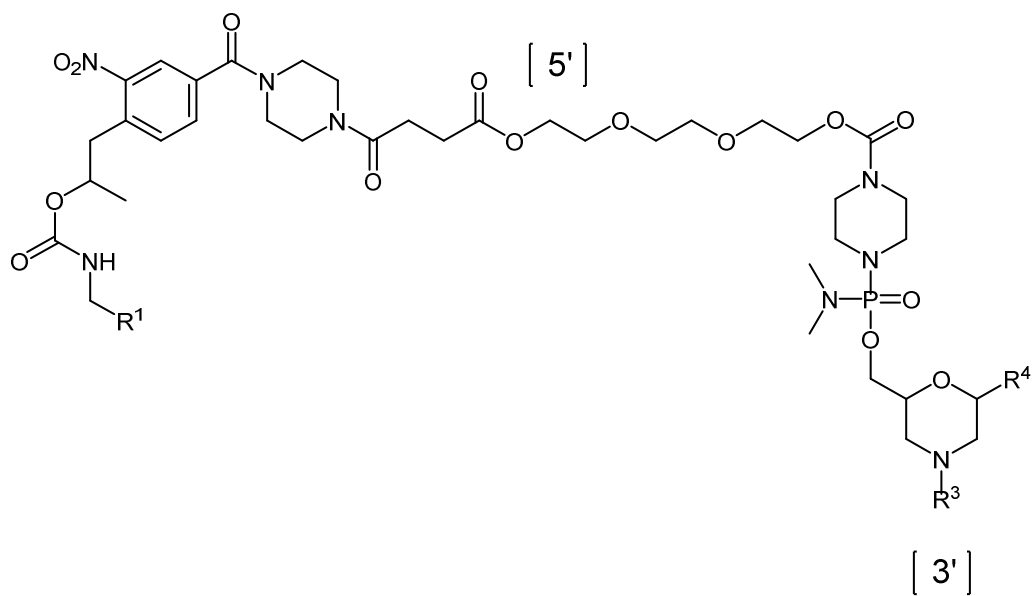
10



15

para formar un compuesto de Fórmula (A5):

20

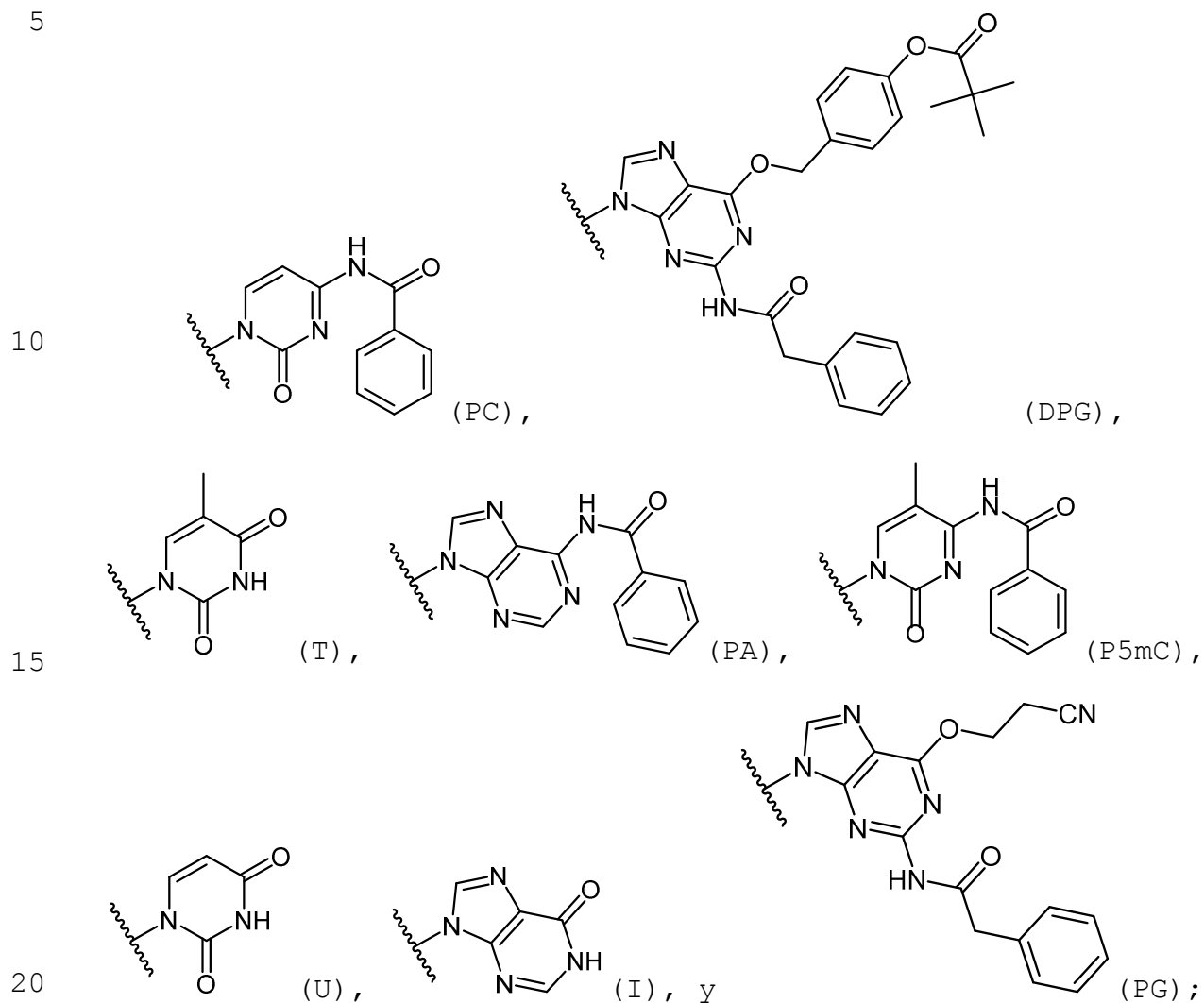


25

(A5) ;

en donde R^1 es un medio de soporte, R^3 se selecciona del grupo que consiste de tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo, y

R^4 se selecciona del grupo que consiste de:



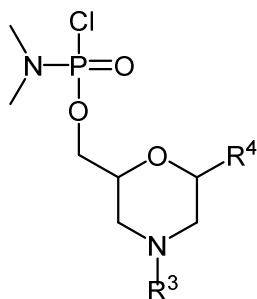
(e) realizar $n-1$ iteraciones de las etapas secuenciales de:

(e1) poner en contacto el producto formado por la etapa inmediatamente previa con un agente de desbloqueo; y

25 (e2) poner en contacto el compuesto formado por la

etapa inmediatamente previa con un compuesto de Fórmula (A8):

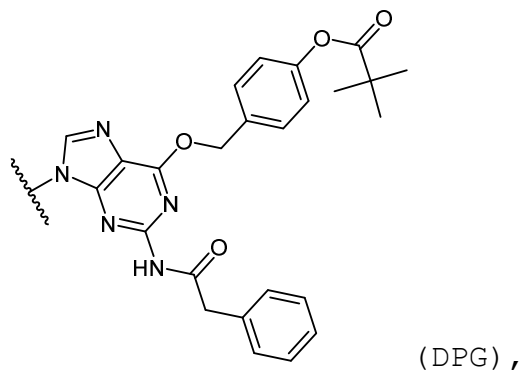
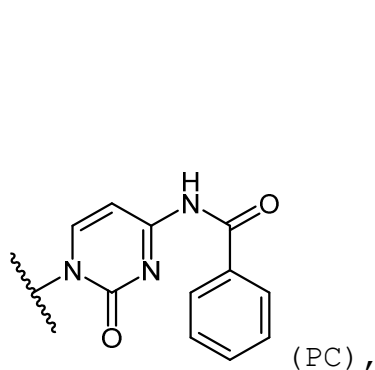
5



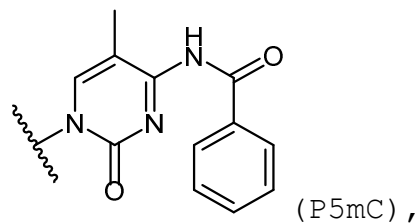
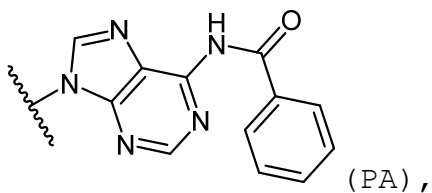
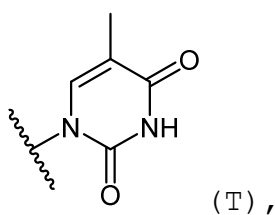
(A8);

en donde R³ se selecciona del grupo que consiste de
 tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y
 10 trimetoxitritilo, y R⁴, independientemente de cada compuesto de
 Fórmula (A8), se selecciona del grupo que consiste de:

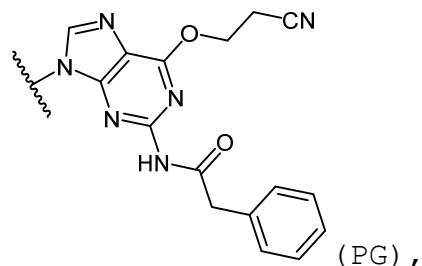
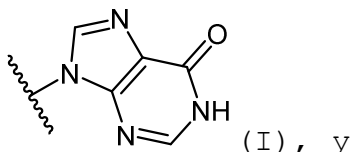
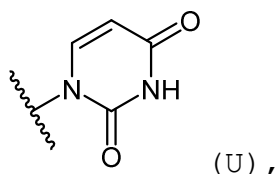
15



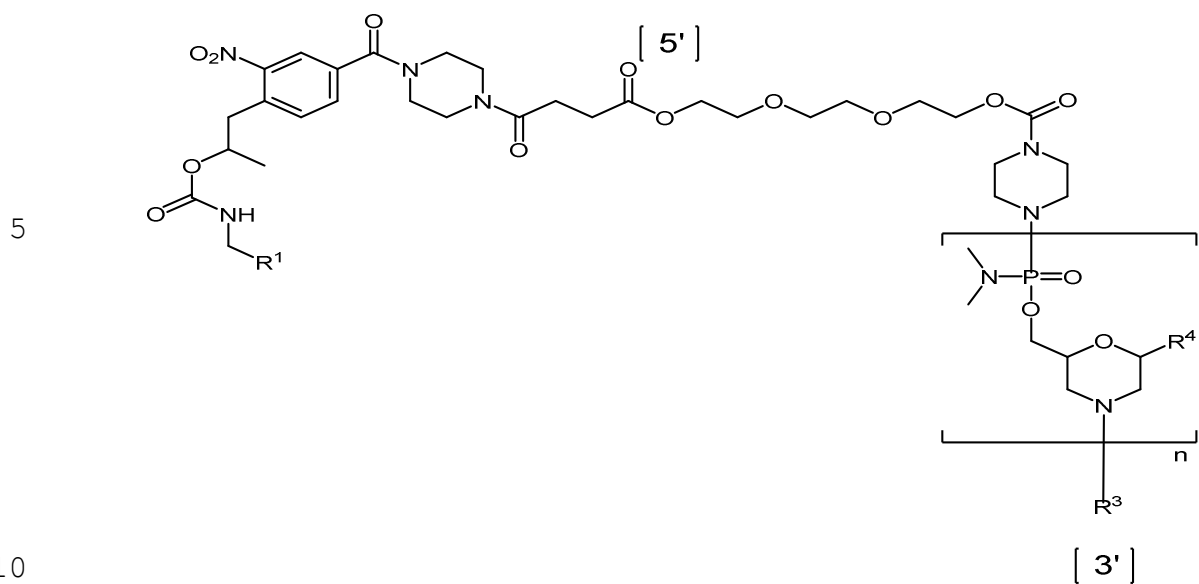
20



25



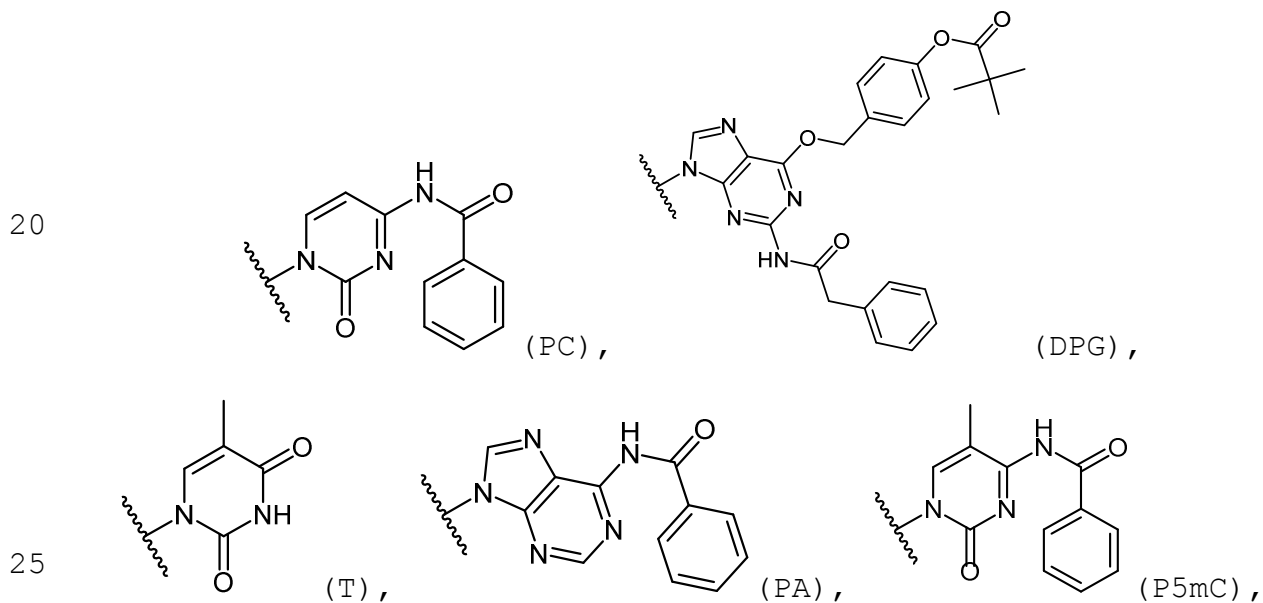
para formar un compuesto de Fórmula (A9):

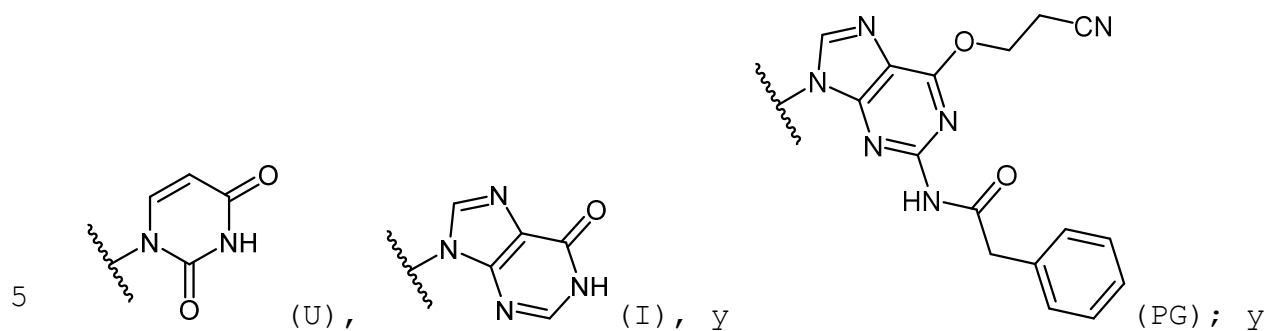


(A9) ;

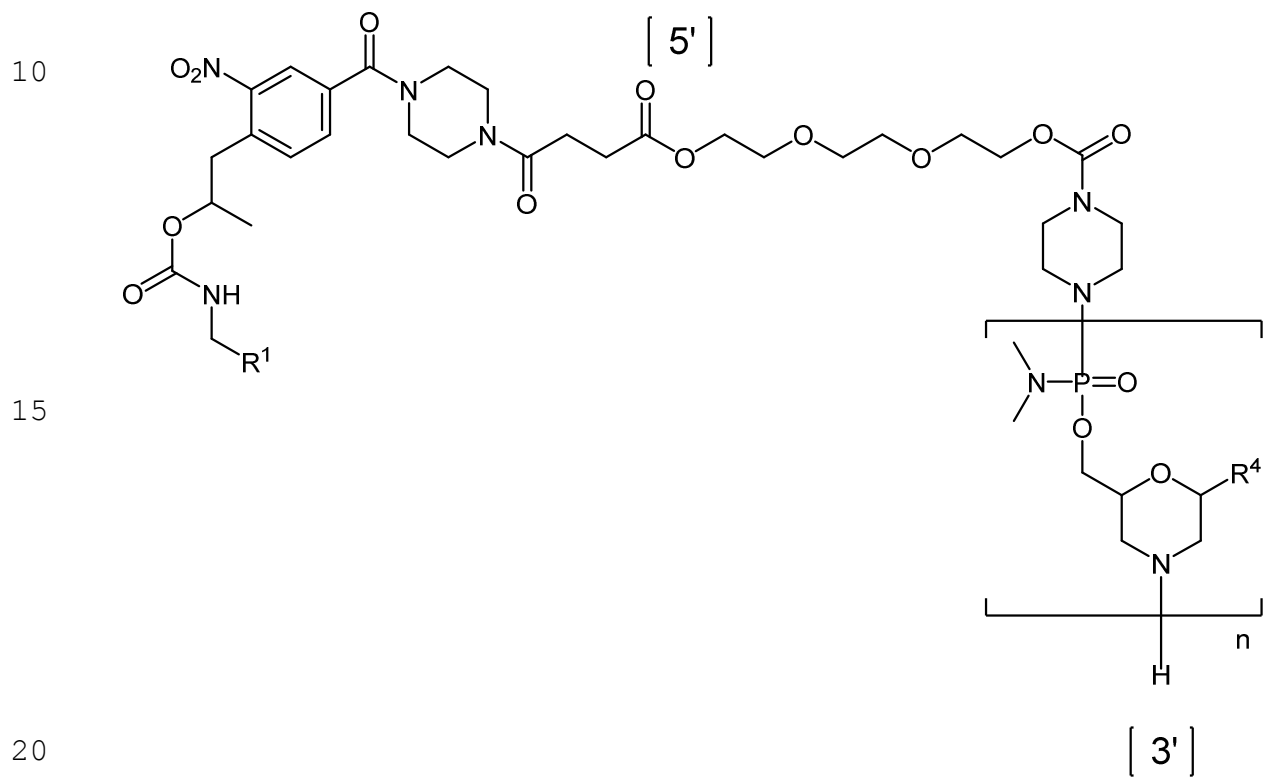
en donde n es un número entero desde 10 a 40, R¹ es un medio de soporte, R³ se selecciona del grupo que consiste de tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo, y R⁴, independientemente de cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:

15





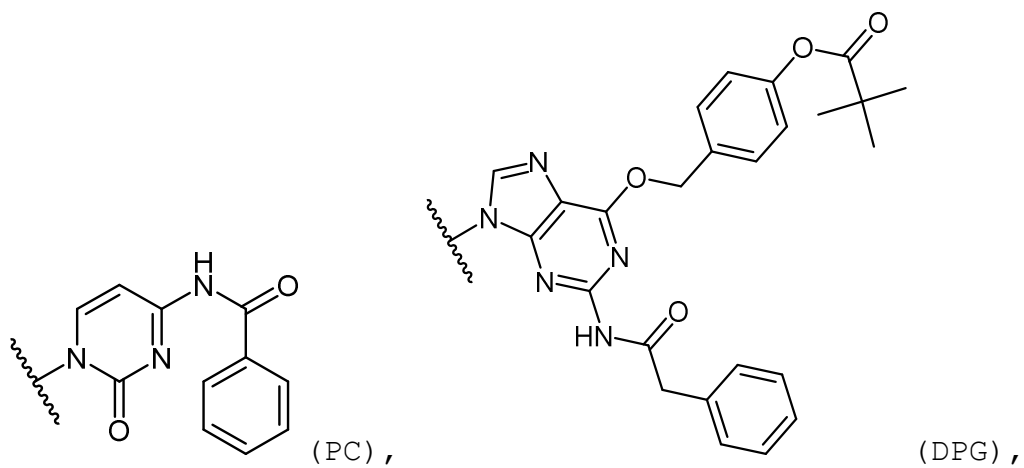
(f) poner en contacto el compuesto de Fórmula (A9) con un agente de desbloqueo para formar un compuesto de Fórmula (A10):



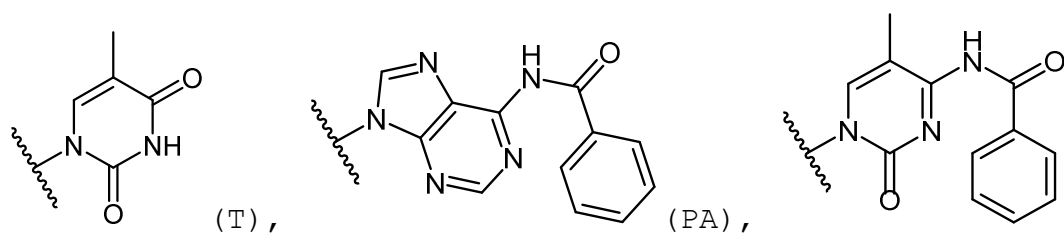
(A10);

en donde n es un número entero desde 10 a 40, R¹ es un medio de soporte, y R⁴, independientemente de cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:

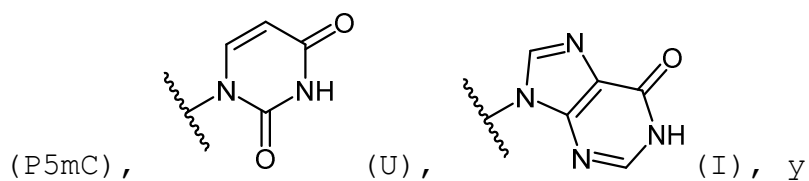
5



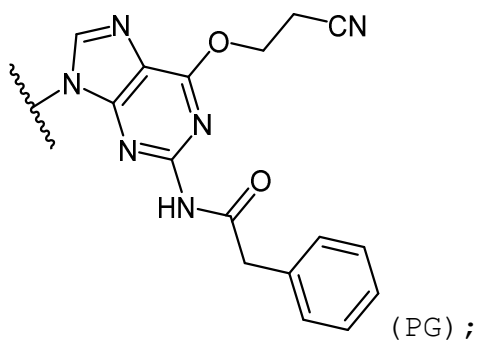
10



15

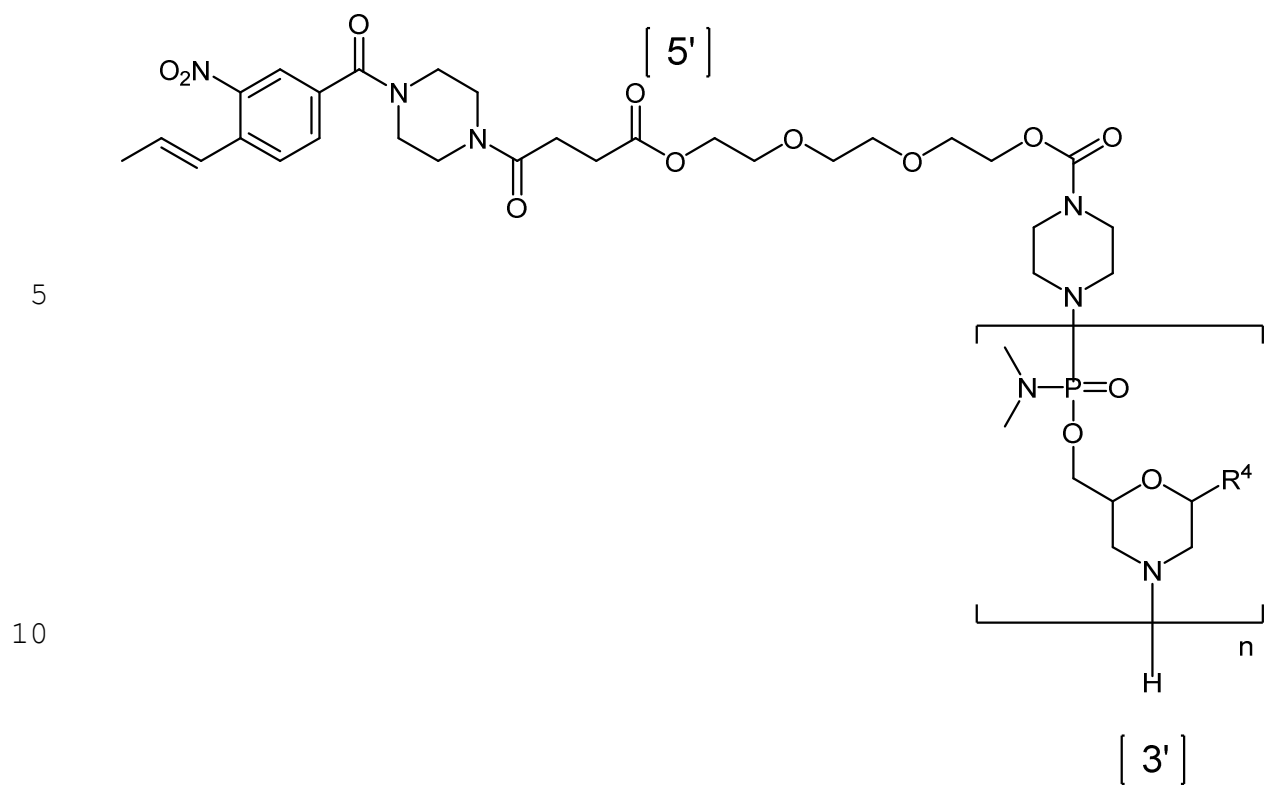


20



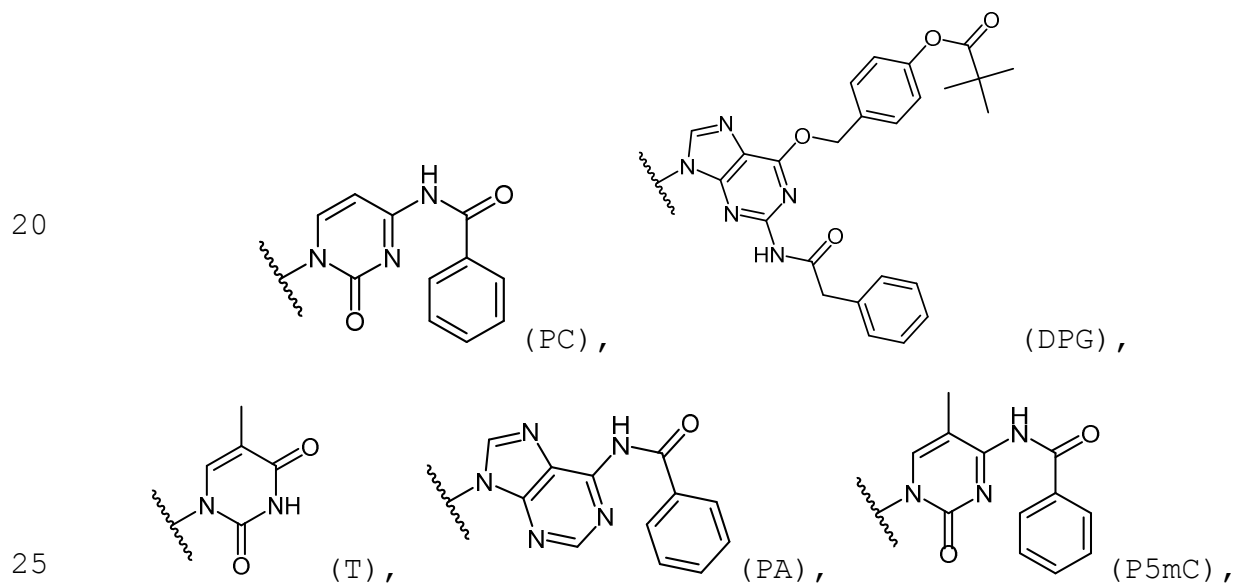
(g) poner en contacto el compuesto de Fórmula (A10) con un agente de escisión para formar un compuesto de Fórmula (A11) :

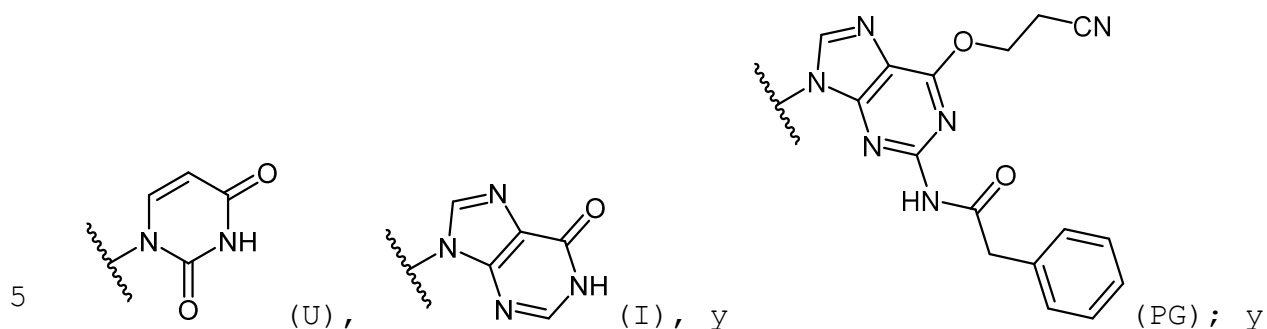
25



(A11) ;

en donde n es un número entero desde 10 a 40, y R⁴,
 15 independientemente de cada aparición, se selecciona del grupo
 que consiste de:





(h) poner en contacto el compuesto de Fórmula (A11) con un agente de desprotección para formar el compuesto oligomérico de Fórmula (A).

10 En una modalidad, la etapa (d) o etapa (e2) comprende además poner en contacto el compuesto de Fórmula (IV) o el compuesto formado por la etapa inmediatamente previa, respectivamente, con un agente de terminación de cadena.

En otra modalidad, cada etapa se realiza en la presencia de al menos un solvente.

15 En todavía otra modalidad, el agente de desbloqueo usado en cada etapa es una solución que comprende un ácido halogenado.

En aún otra modalidad, el agente de desbloqueo usado en cada etapa es ácido cianoacético.

20 En otra modalidad, el ácido halogenado se selecciona del grupo que consiste de ácido cloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido fluoroacético, ácido difluoroacético, y ácido trifluoroacético.

25 En otra modalidad, el ácido halogenado es ácido trifluoroacético.

En todavía otra modalidad, al menos una de las etapas (a), (c), (e1), y (f) comprende además la etapa de poner en contacto el compuesto desbloqueado de cada etapa con un agente de neutralización.

5 En aún otra modalidad, cada una de las etapas (a), (c), (e1), y (f) comprende además la etapa de poner en contacto el compuesto desbloqueado de cada etapa con un agente de neutralización.

10 En otra modalidad, el agente de neutralización está en una solución que comprende diclorometano y alcohol isopropílico.

En todavía otra modalidad, el agente de neutralización es un monoalquilo, dialquilo, o trialquil amina.

15 En aún otra modalidad, el agente de neutralización es N,N-diisopropiletilamina.

En otra modalidad, el agente de desbloqueo usado en cada etapa es una solución que comprende 4-cianopiridina, diclorometano, ácido trifluoroacético, trifluoroetanol y agua.

20 En todavía otra modalidad, el agente de terminación de cadena está en una solución que comprende etilmorfolina y metilpirrolidinona.

En aún otra modalidad, el agente de terminación de cadena es un anhídrido ácido.

25 En otra modalidad, el anhídrido ácido es anhídrido benzoico.

En otra modalidad, los compuestos de Fórmula (A4) y Fórmula (A8) están cada uno, independientemente, en una solución que comprende etilmorfolina y dimetilimidazolidinona.

En otra modalidad, el agente de escisión comprende
5 ditiotreitolo y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno.

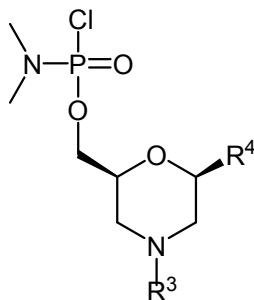
En aún otra modalidad, el agente de escisión está en una solución que comprende N-metil-2-pirrolidona.

En todavía otra modalidad, el agente de desprotección comprende NH_3 .

10 En aún otra modalidad, el agente de desprotección está en una solución acuosa.

En todavía otra modalidad, el medio de soporte comprende poliestireno con 1% divinilbenceno reticulado.

En otra modalidad, el compuesto de Fórmula (A4) es
15 de Fórmula (A4a):



20

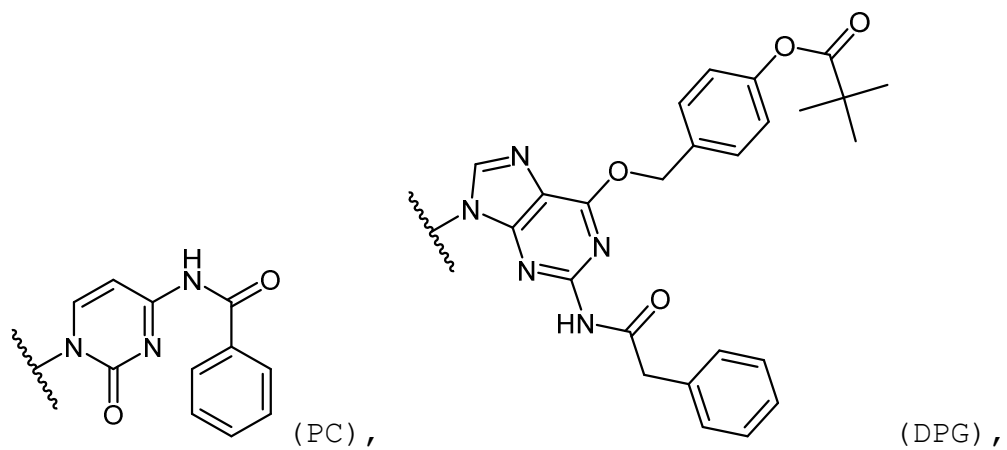
(A4a);

en donde:

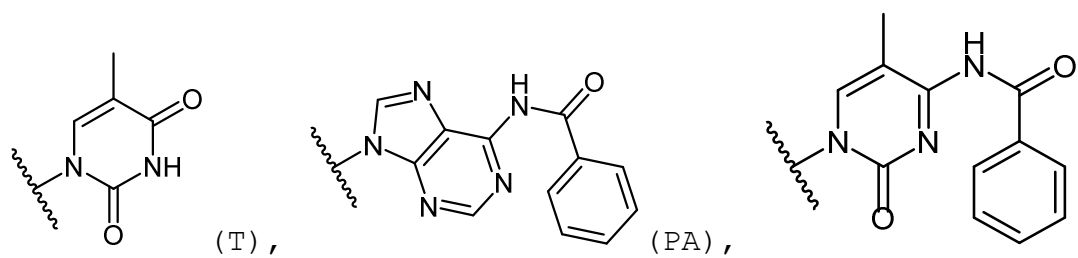
R^3 se selecciona del grupo que consiste de tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo, y

25 R^4 se selecciona de:

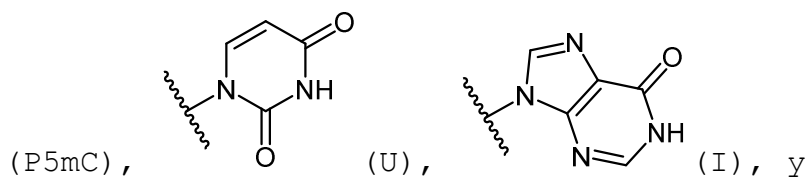
5



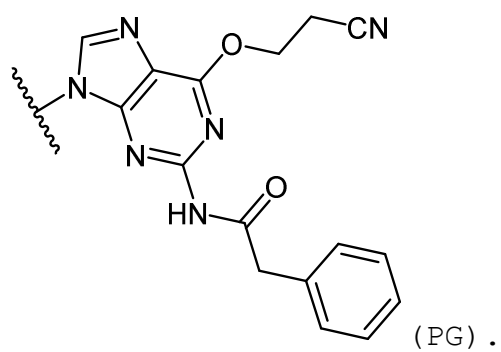
10



15

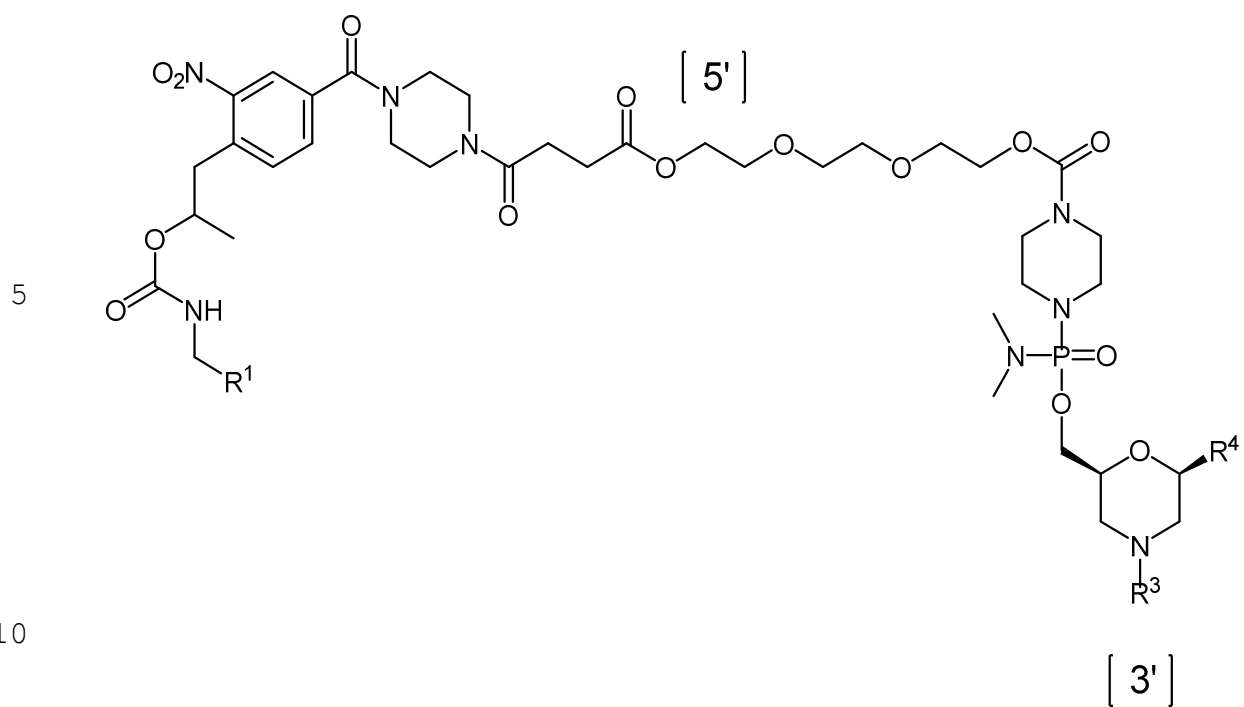


20



En otra modalidad, el compuesto de Fórmula (A5) es de Fórmula (A5a) :

25



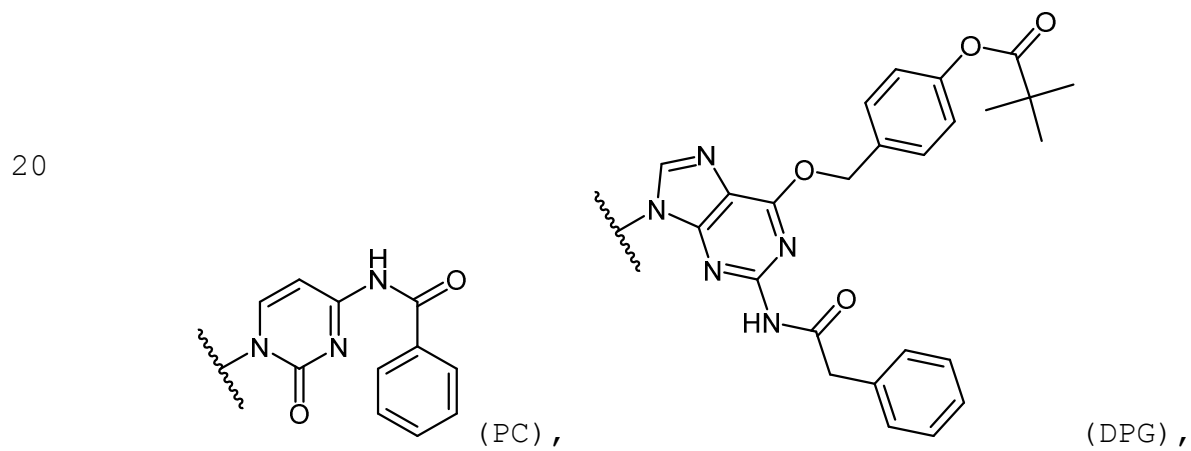
(A5a) ;

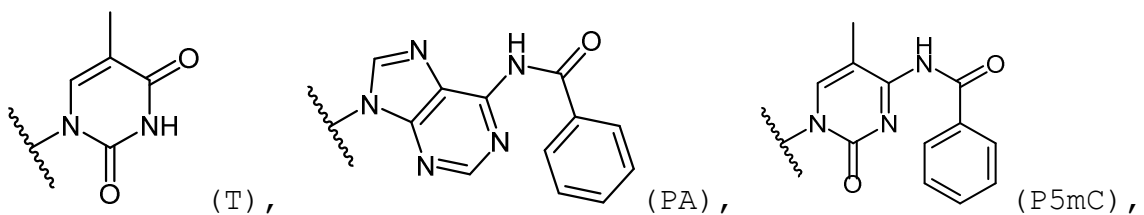
en donde:

R¹ es un medio de soporte

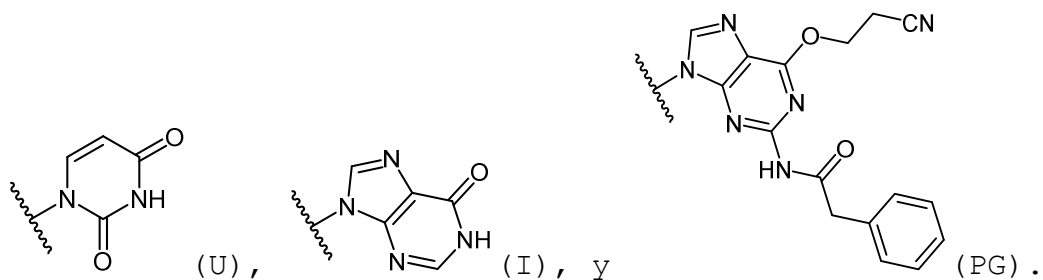
15 R³ se selecciona del grupo que consiste de tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo, y

R⁴ se selecciona de:

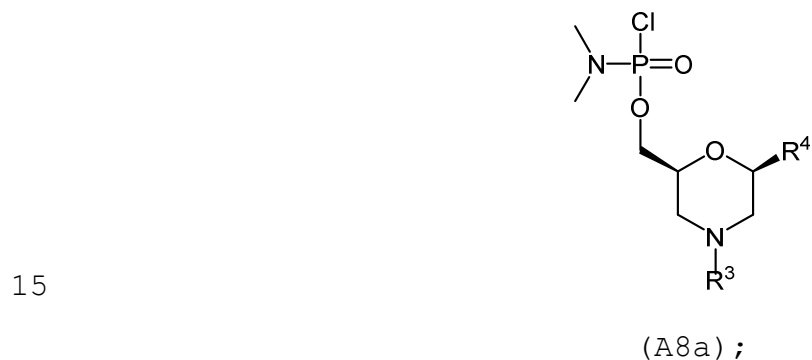




5



En todavía otra modalidad, el compuesto de Fórmula
 10 (A8) es de Fórmula (A8a):

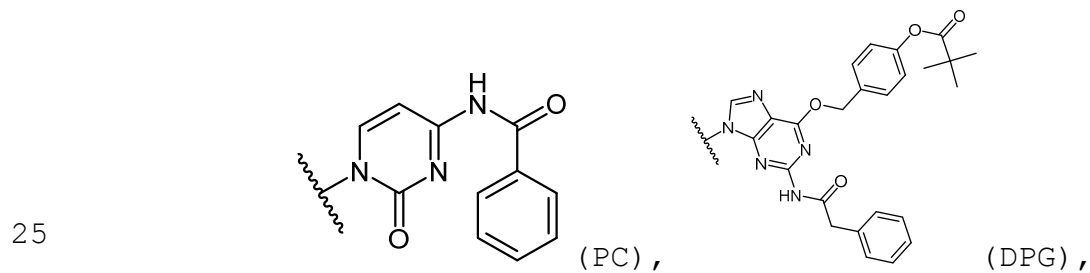


15

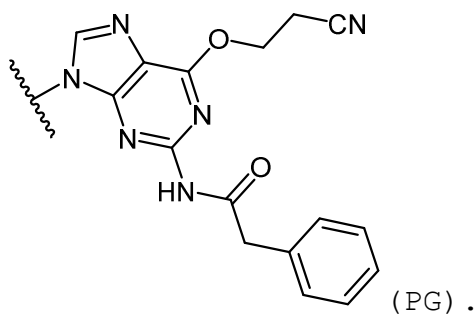
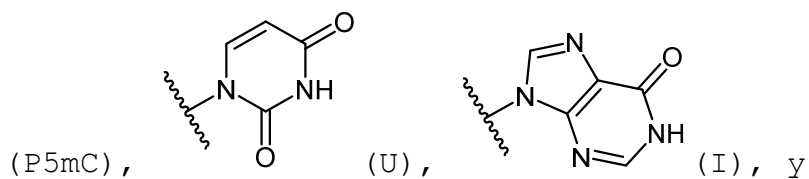
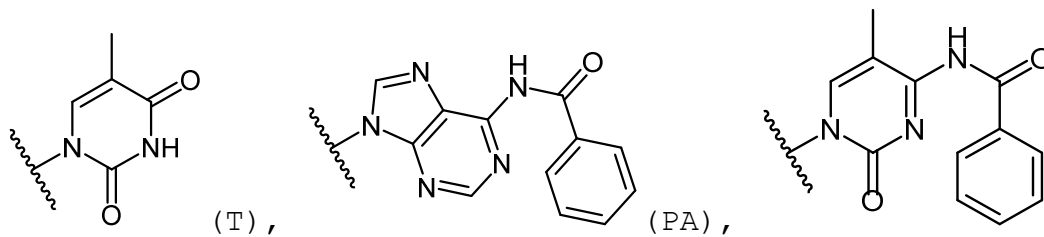
en donde:

R^3 se selecciona del grupo que consiste de tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo, y

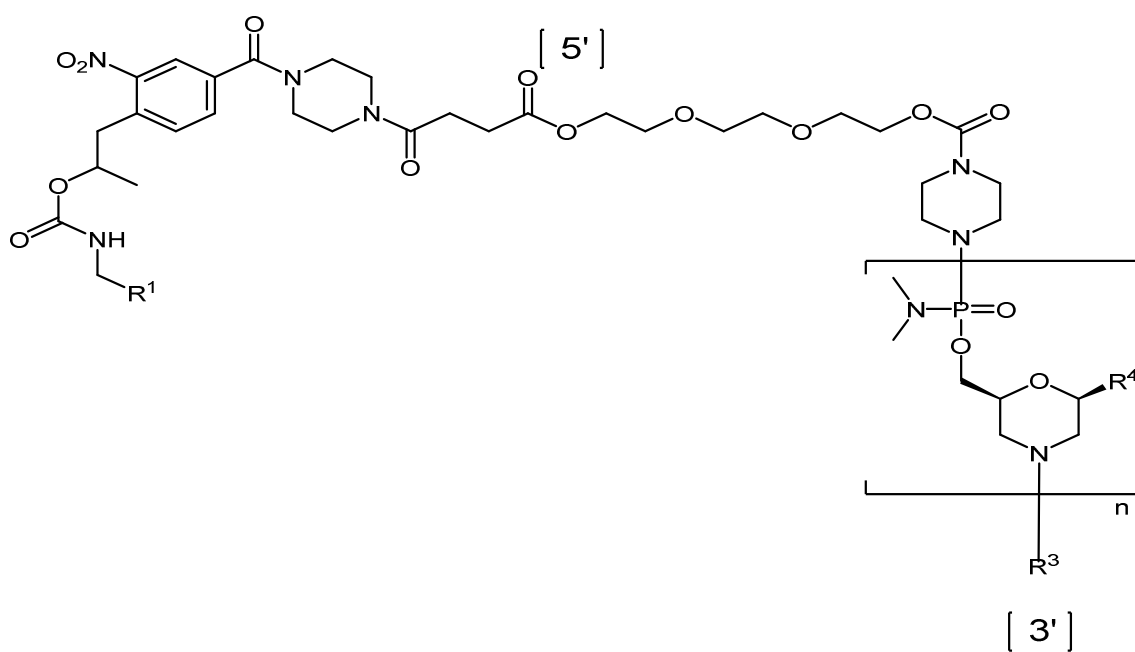
20 R^4 , independientemente en cada aparición del compuesto de Fórmula (A8a), se selecciona del grupo que consiste de:



25



En aún otra modalidad, el compuesto de Fórmula (A9) es de Fórmula (A9a):



(A9a);

en donde:

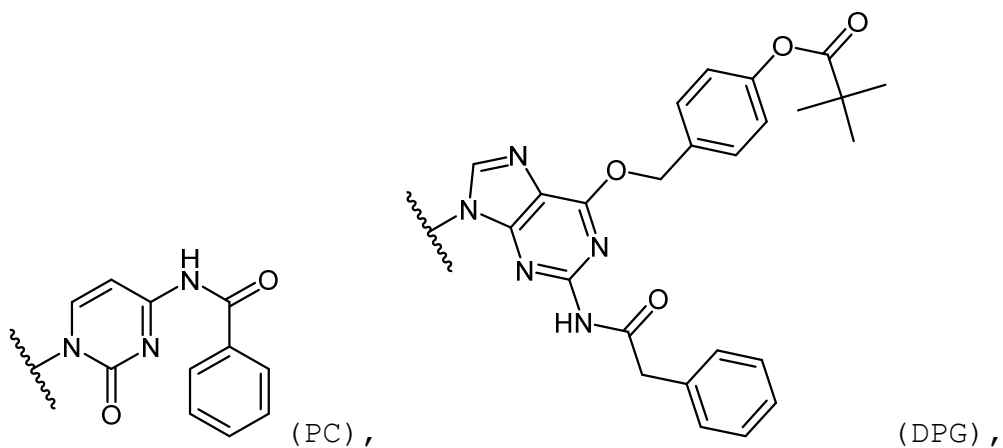
n es un número entero desde 10 a 40,

R¹ es un medio de soporte

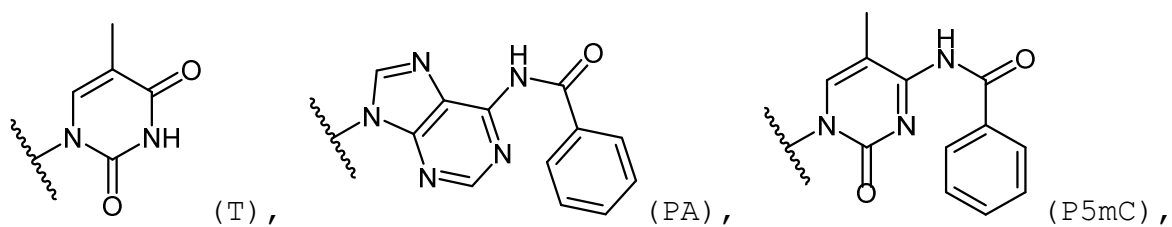
R³ se selecciona del grupo que consiste de tritilo,
5 monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo, y

R⁴, independientemente de cada aparición, se
selecciona del grupo que consiste de:

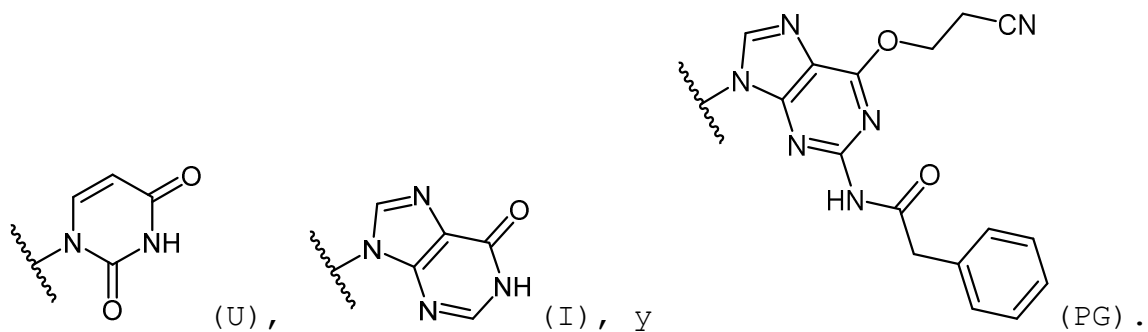
10



15

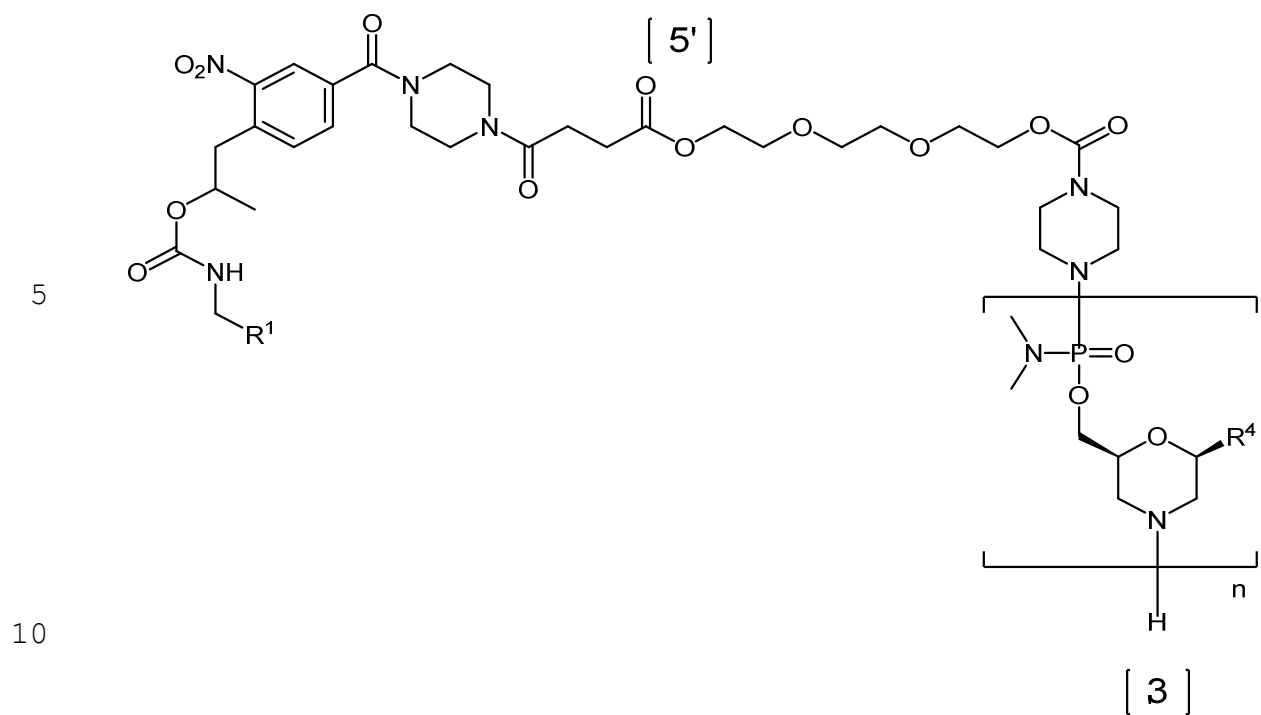


20



25

En otra modalidad, el compuesto de Fórmula (A10) es
de Fórmula (A10a):



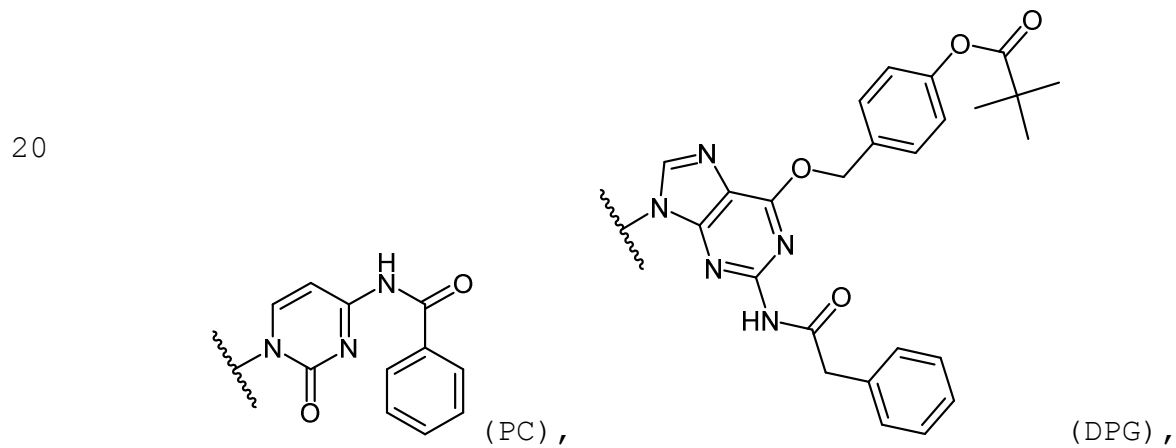
(A10a);

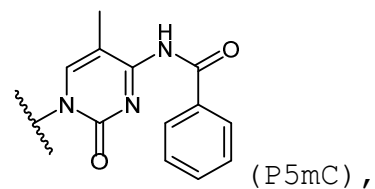
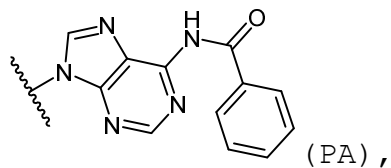
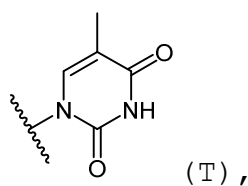
en donde:

n es un número entero desde 10 a 40,

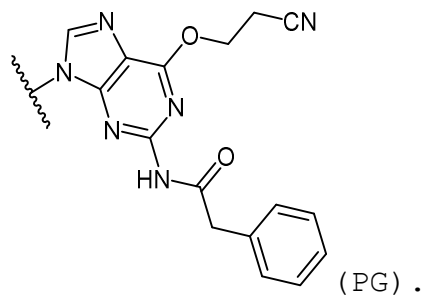
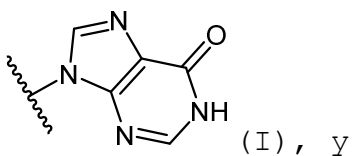
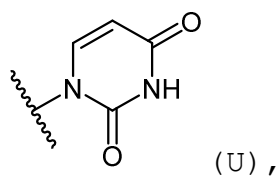
15 R^1 es un medio de soporte, y

R^4 , independientemente de cada aparición, se
selecciona del grupo que consiste de:



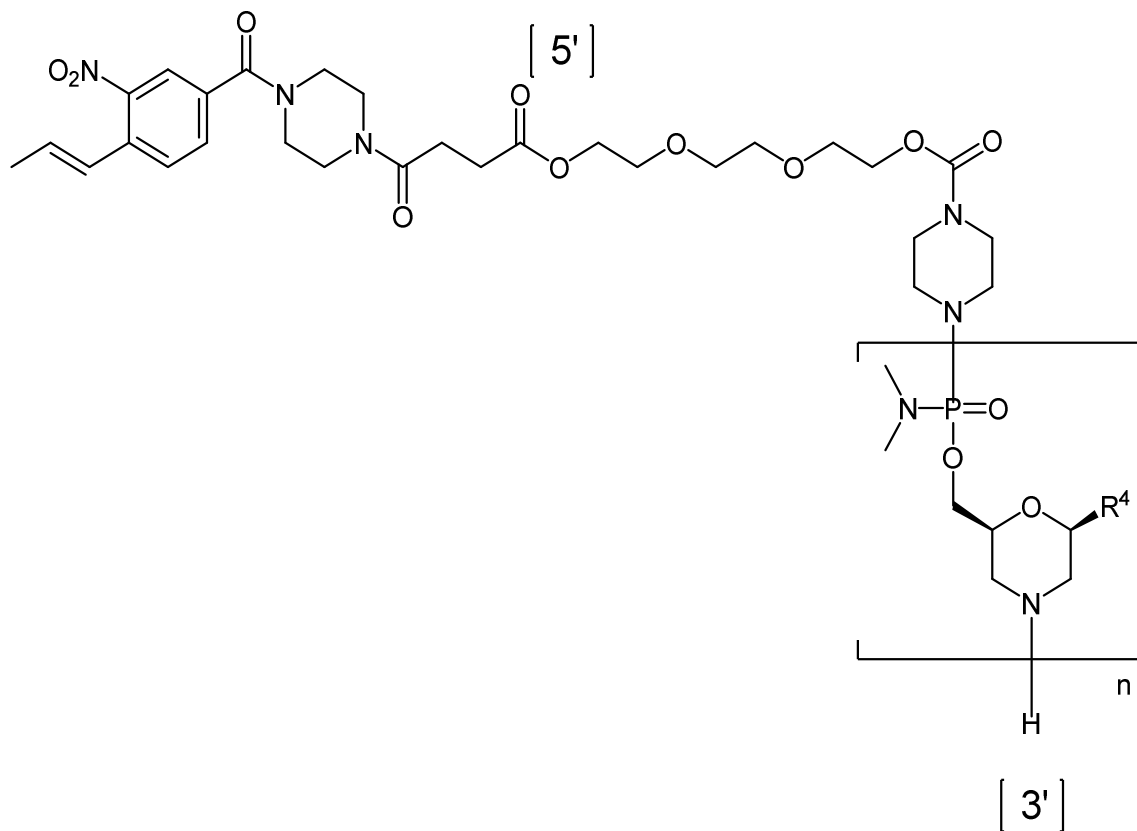


5



10 En otra modalidad, el compuesto de Fórmula (A11) es
de Fórmula (A11a):

15



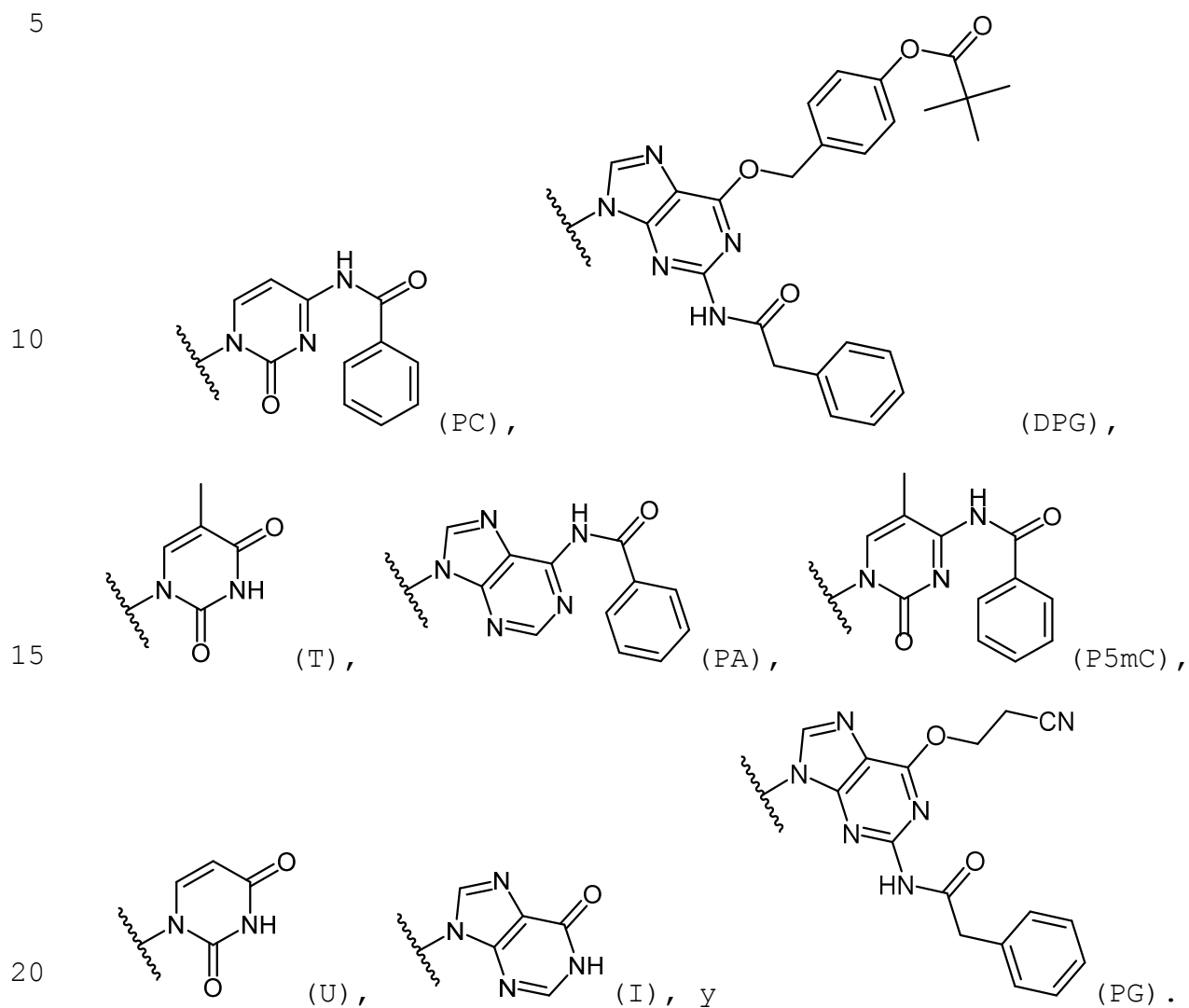
25

(A11a) ;

en donde:

n es un número entero desde 10 a 40, y

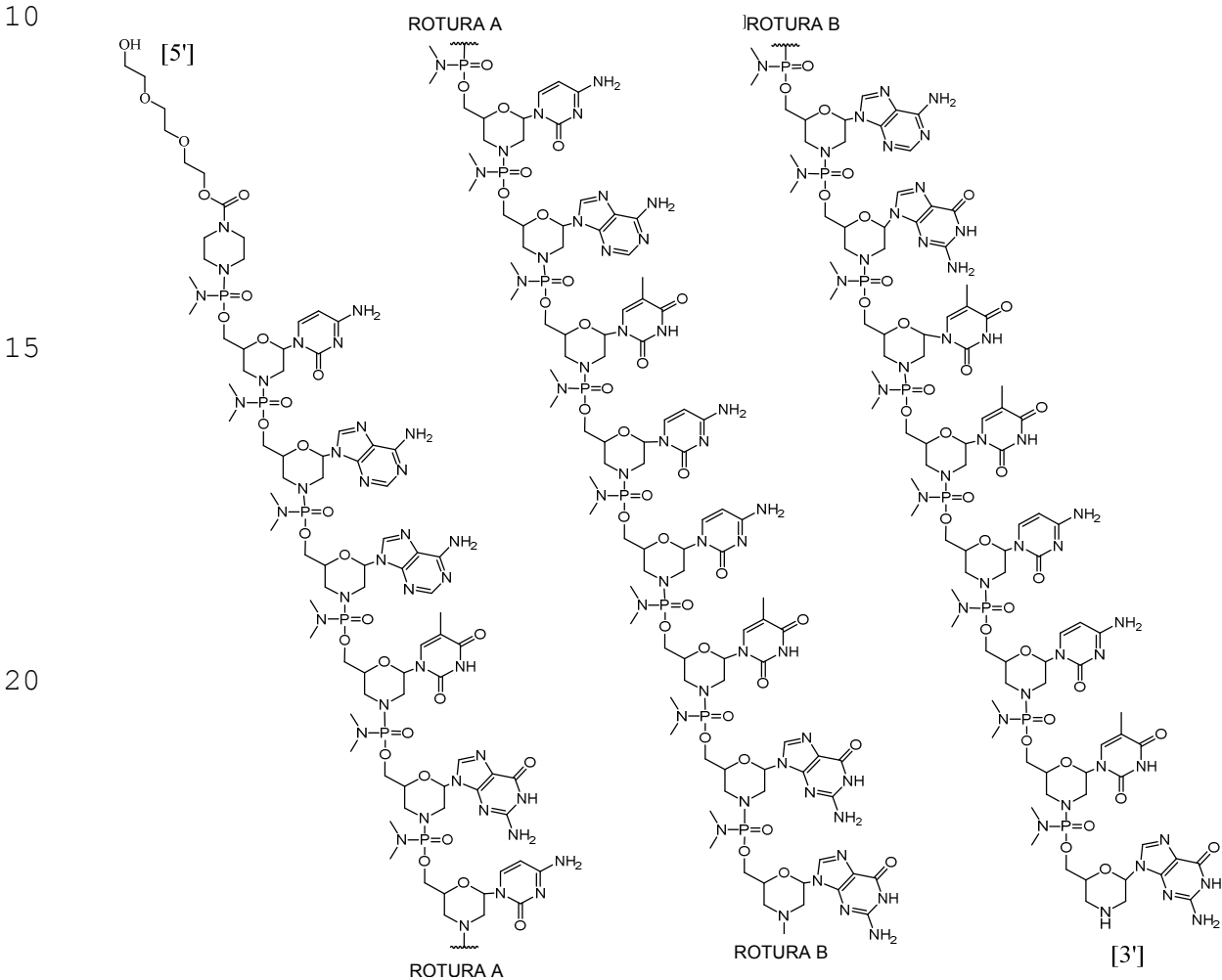
R^4 , independientemente de cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:



En una modalidad del compuesto oligomérico de Fórmula (A), n es 22, y R^2 en cada posición es desde 1 a 22 y 5' a 3':

Posición No. 5' a 3'	R ²	Posición No. 5' a 3'	R ²	Posición No. 5' a 3'	R ²
1	C	11	C	21	T
2	A	12	T	22	G
3	A	13	G		
4	T	14	G		
5	G	15	A		
6	C	16	G		
7	C	17	T		
8	A	18	T		
9	T	19	C		
10	C	20	C		

en donde el compuesto oligomérico de Fórmula (A) es un compuesto de Fórmula (C):



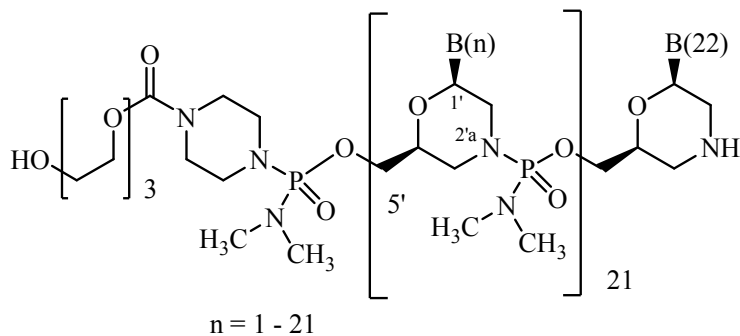
(C) ,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Casimersen, antes conocido por su nombre de código "SPR-4045", es un PMO que tiene la secuencia de base 5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3' (SEQ ID NO:1). Casimersen está registrado bajo el Número de Registro CAS 1422958-19-7. Los nombres químicos incluyen:

todo-P-ambo-[P,2',3'-tridesoxi-P-(dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-seco] (2'a→5') (C-A-A-T-G-C-C-A-T-C-C-T-G-G-A-G-T-T-C-C-T-G) 5'-[4-({2-[2-(2-hidroxietoxi)etoxi]etoxi}carbonil)-N,N-dimetilpiperazin-1-fosfonamidato].

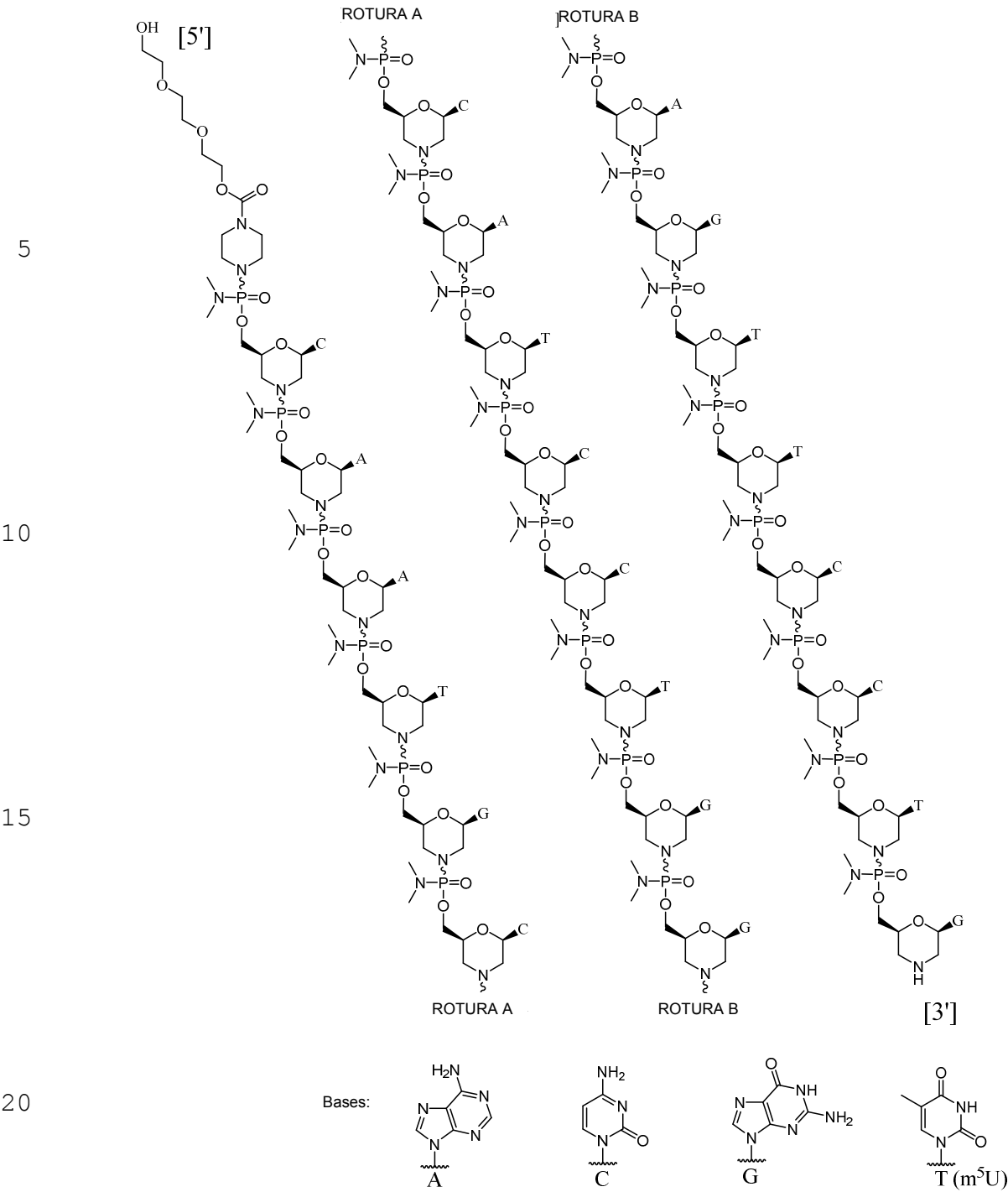
Casimersen tiene la siguiente estructura:



B(1-22):

C-A-A-T-G-C-C-A-T-C-C-T-G-G-A-G-T-T-C-C-T-G

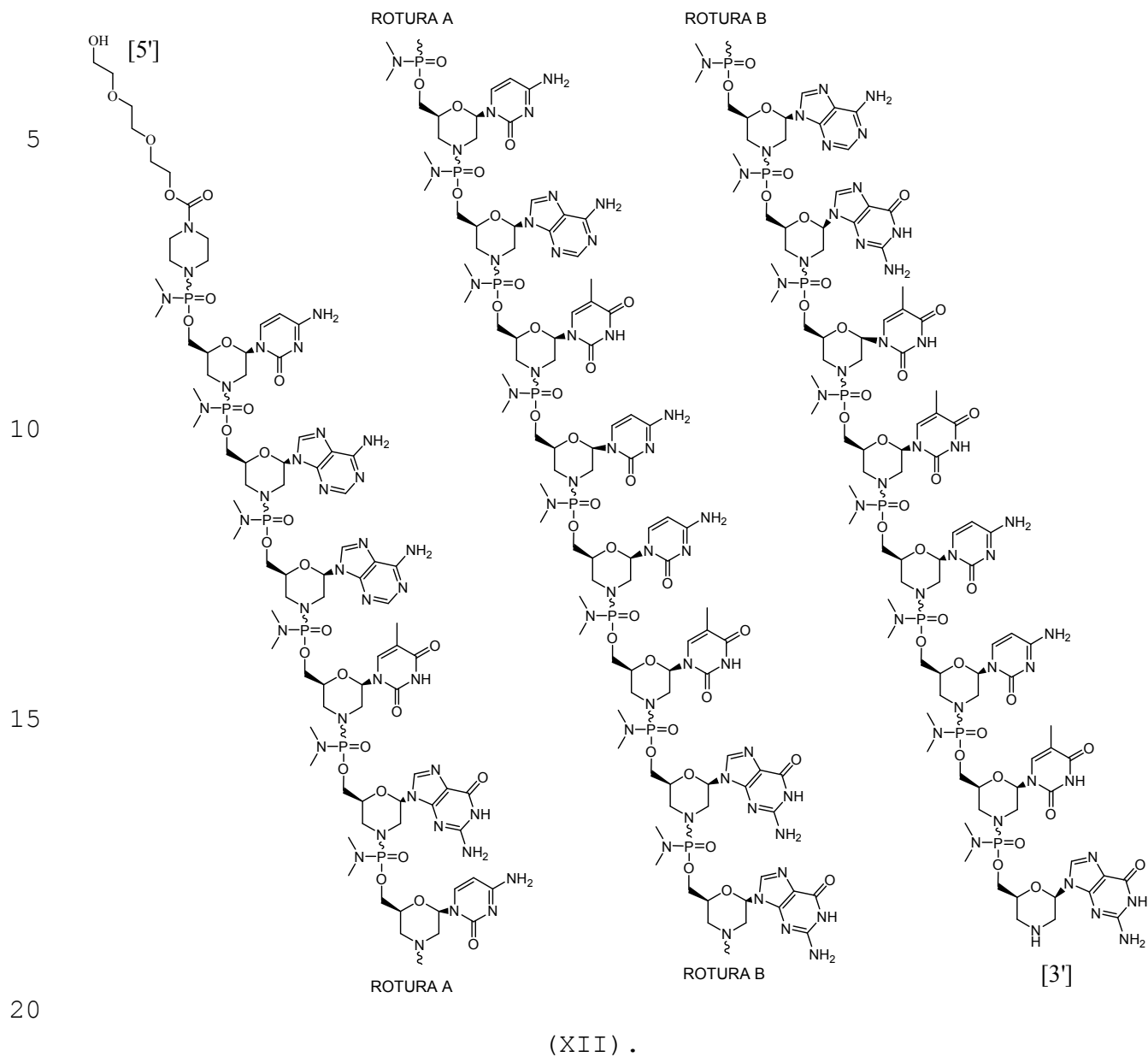
y también se representa por la siguiente estructura química:



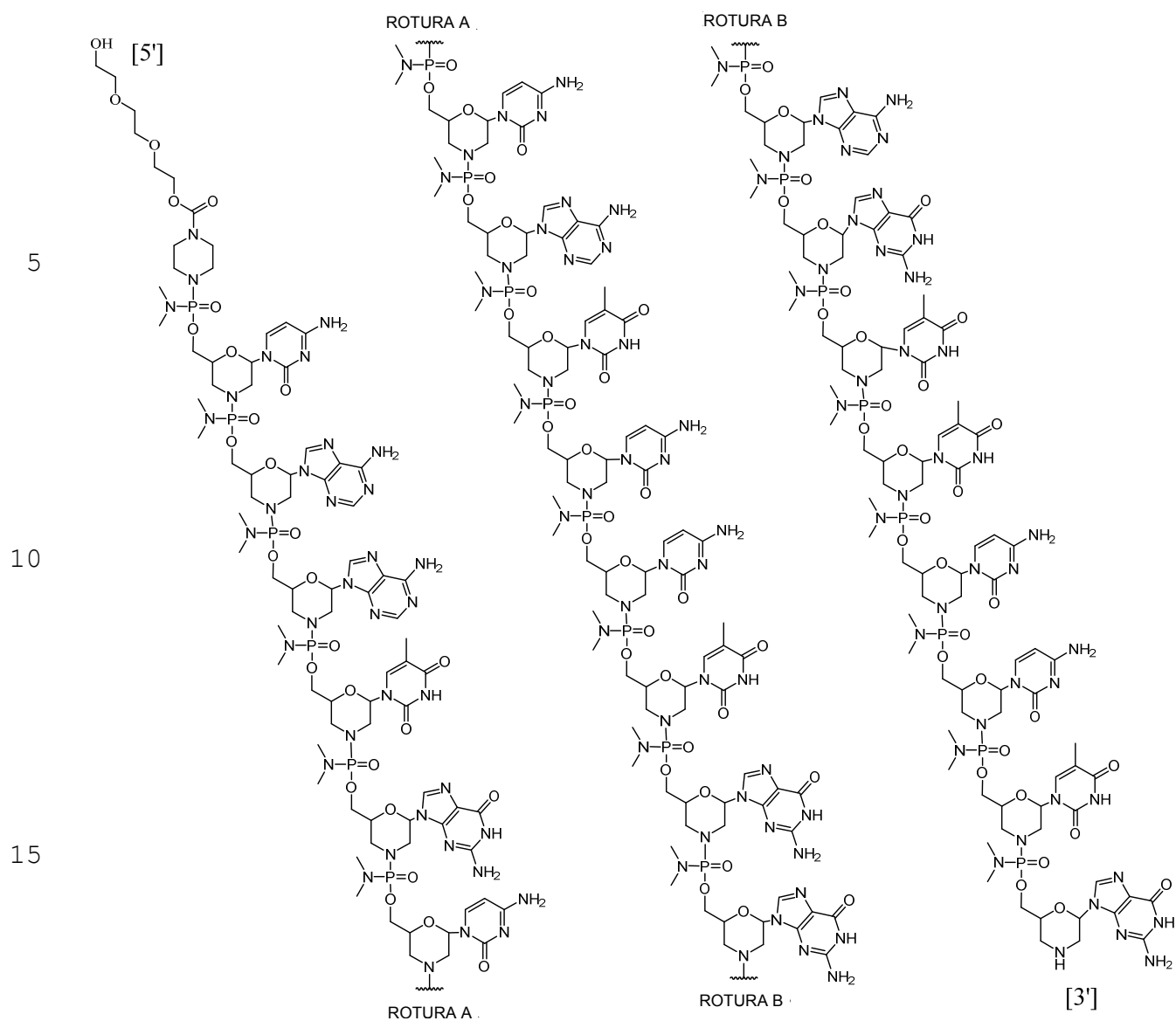
La secuencia de bases del extremo 5' al extremo 3' es:

CAATGCCATCCTGGAGTTCTG

Casimersen también se puede representar por la estructura de Fórmula (XII):



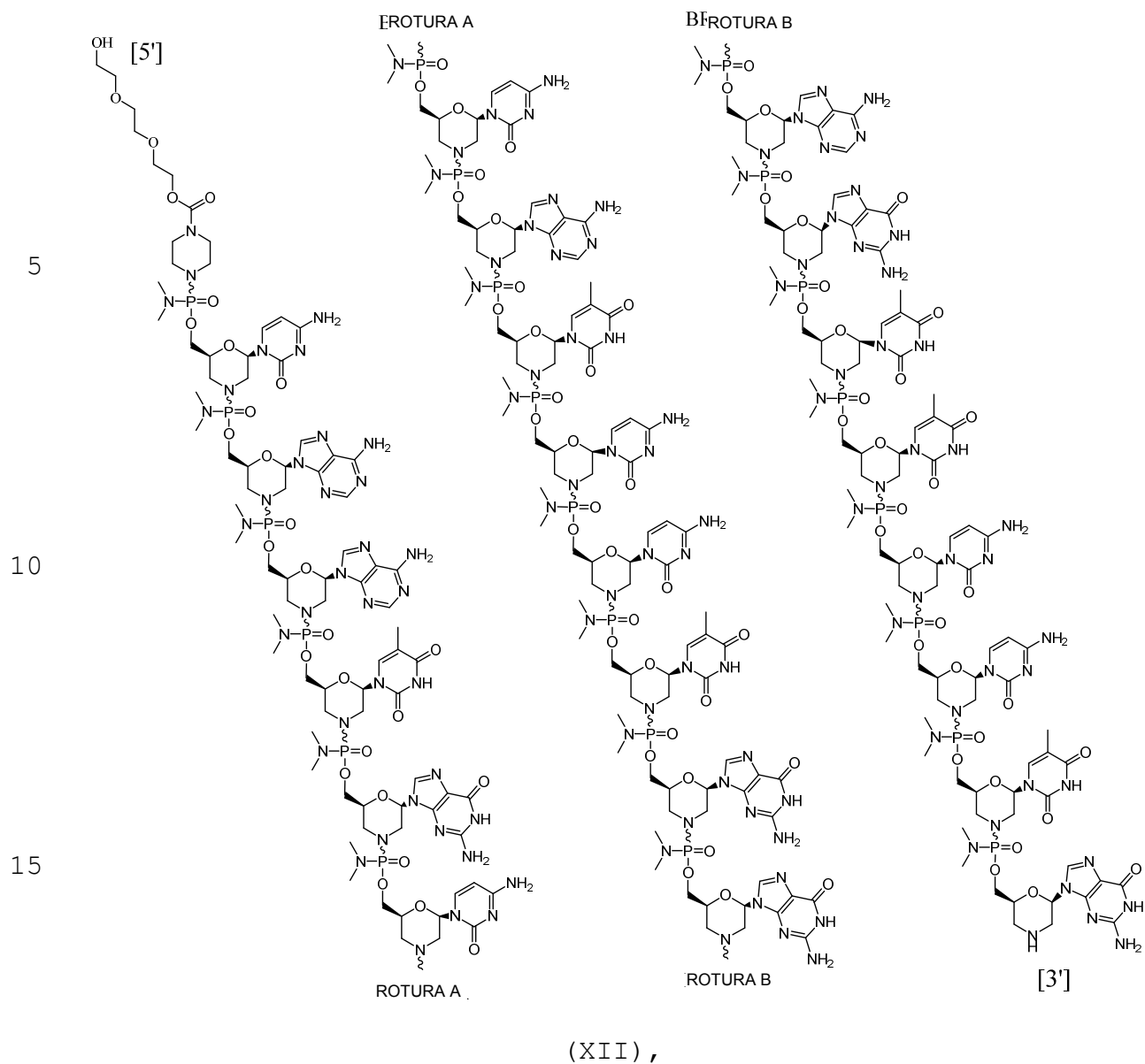
Por lo tanto, en una modalidad del proceso descrito anteriormente, el compuesto oligomérico de Fórmula (A) es un compuesto de Fórmula (C):



(C),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En todavía otra modalidad, el compuesto oligomérico de Fórmula (G) es un compuesto oligomérico de Fórmula (XII):

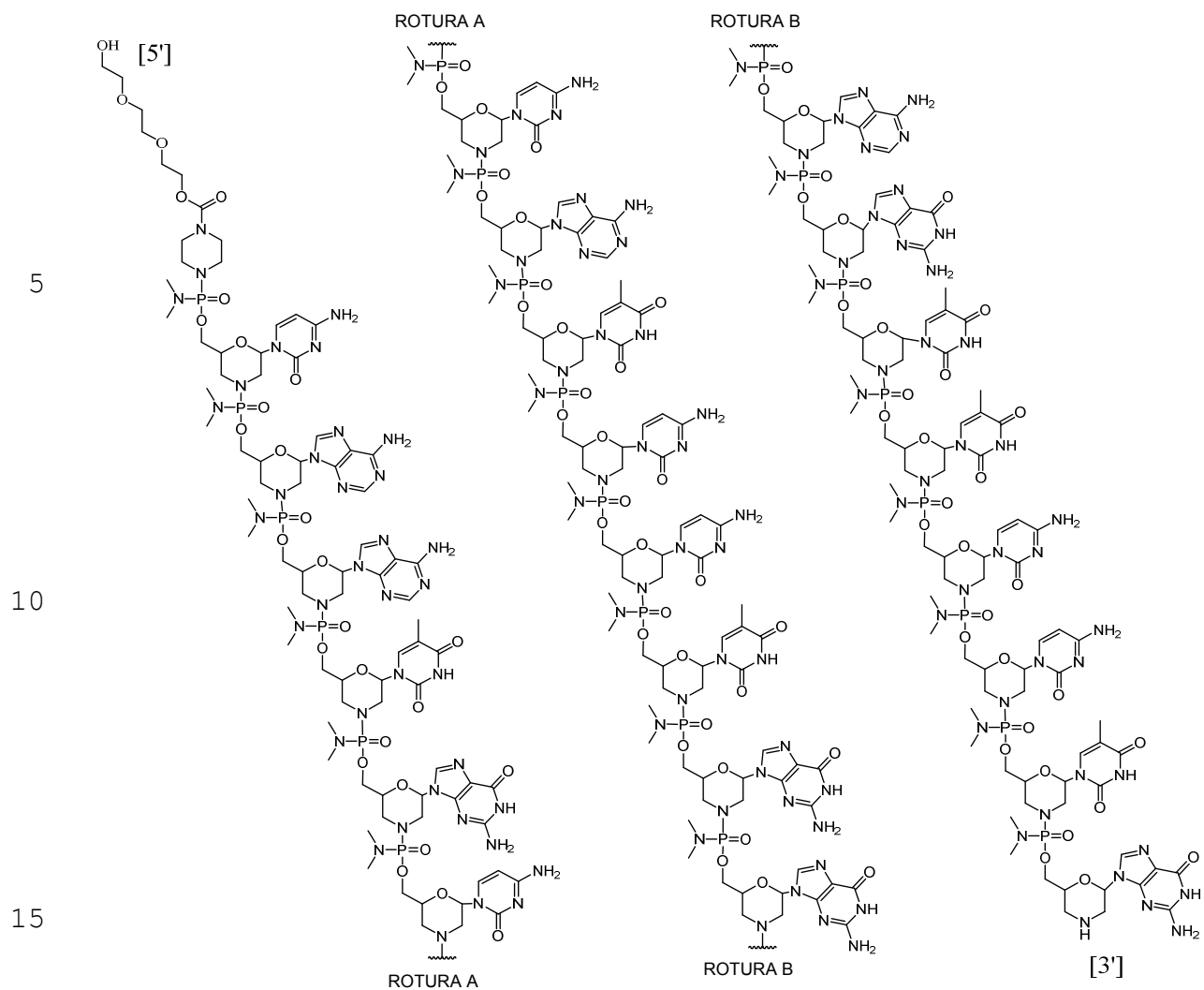


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Procesos para Preparar Casimersen

En la presente se proporcionan procesos para preparar Casimersen.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un proceso para preparar un compuesto oligomérico de Fórmula (C):

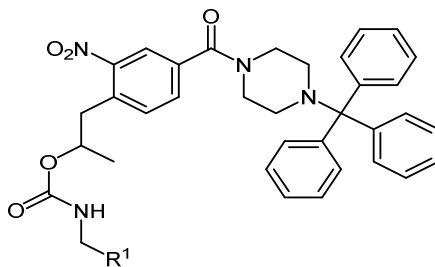


(C) ;

en donde el proceso comprende las etapas secuenciales

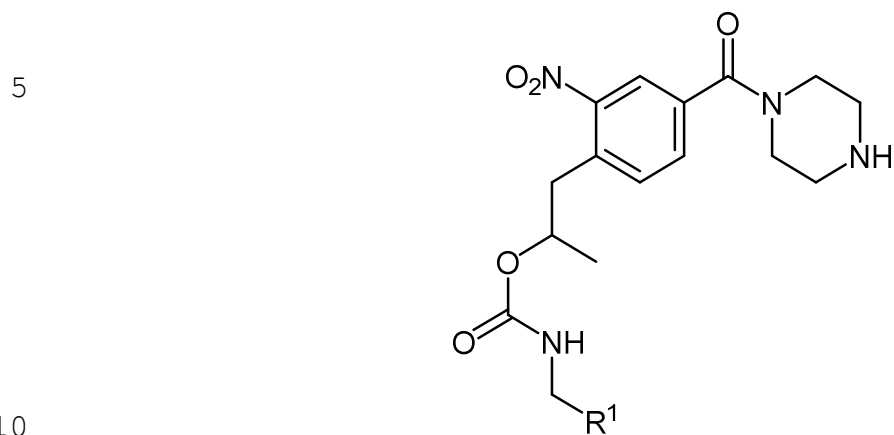
de:

20 (a) poner en contacto un compuesto de Fórmula (I):



(I) ;

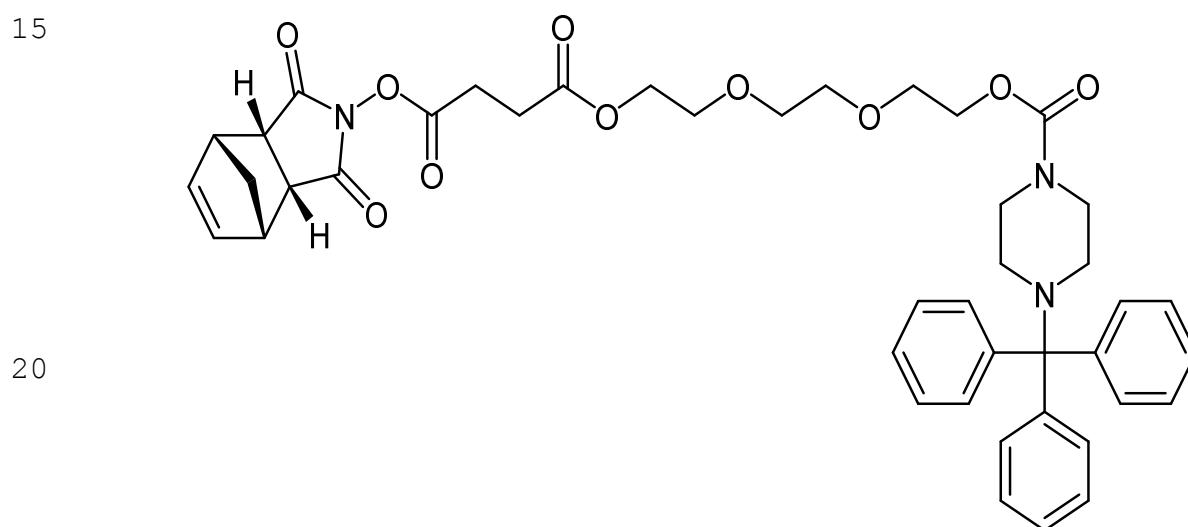
en donde R^1 es un medio de soporte,
 con un agente de desbloqueo para formar el compuesto
 de Fórmula (II):



(II);

en donde R^1 es un medio de soporte;

(b) poner en contacto el compuesto de Fórmula (II)
 con compuesto (B):



(B);

para formar un compuesto de Fórmula (III):



en donde R^1 es un medio de soporte;

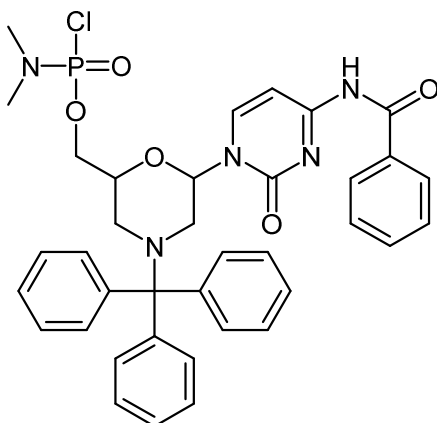
15



en donde R^1 es un medio de soporte;

(d) poner en contacto el compuesto de Fórmula (IV)
25 con un compuesto de Fórmula (D):

5



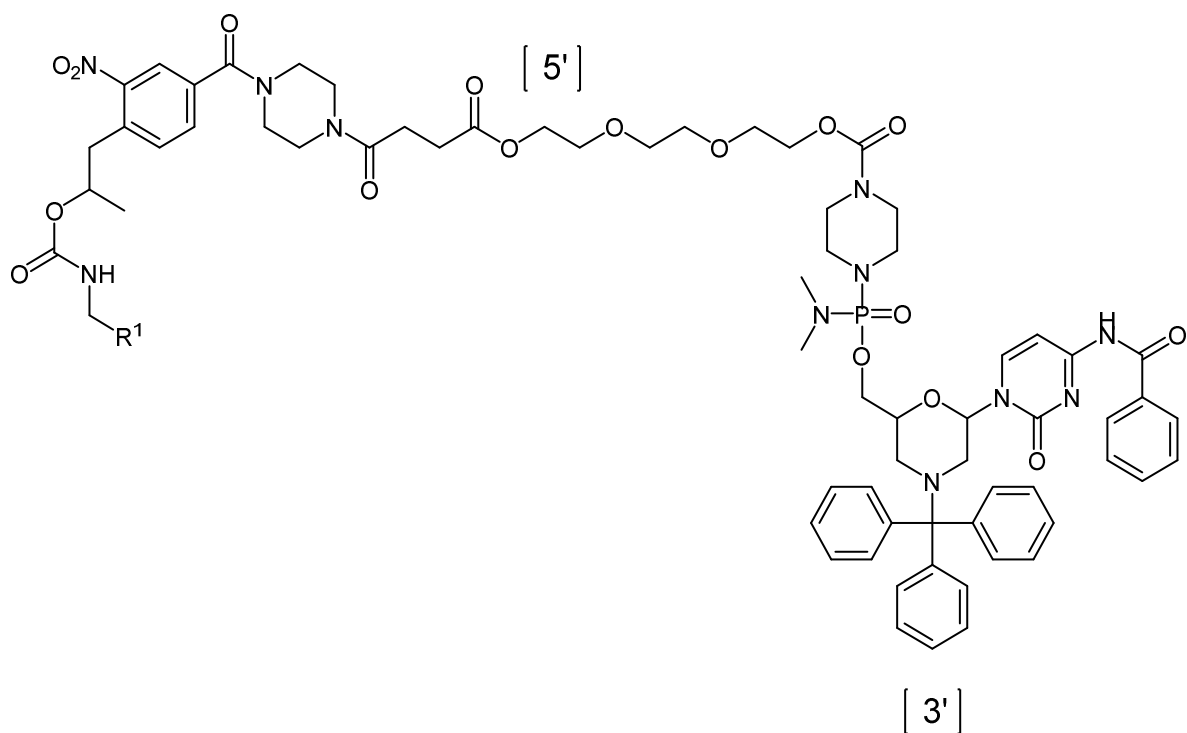
(D) ;

para formar un compuesto de Fórmula (V) :

10

15

20

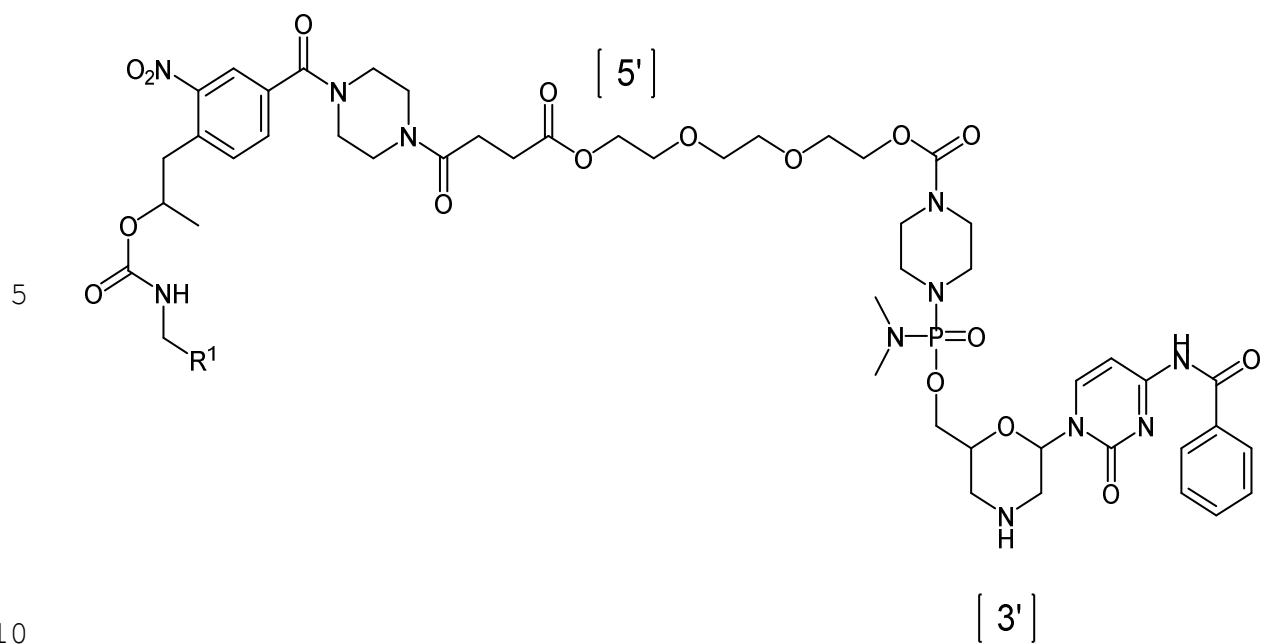


(V) ;

en donde R¹ es un medio de soporte;

(e) poner en contacto el compuesto de Fórmula (V) con un agente de desbloqueo para formar un compuesto de Fórmula (VI) :

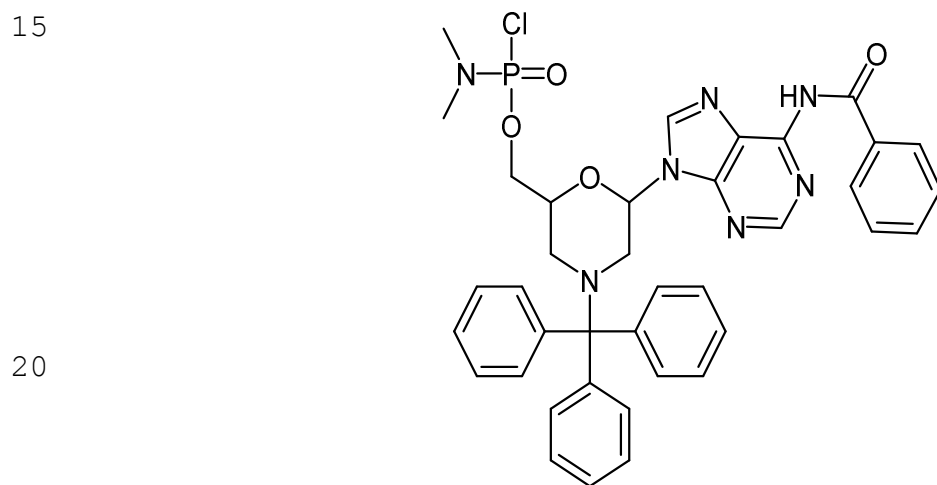
25



(VI) ;

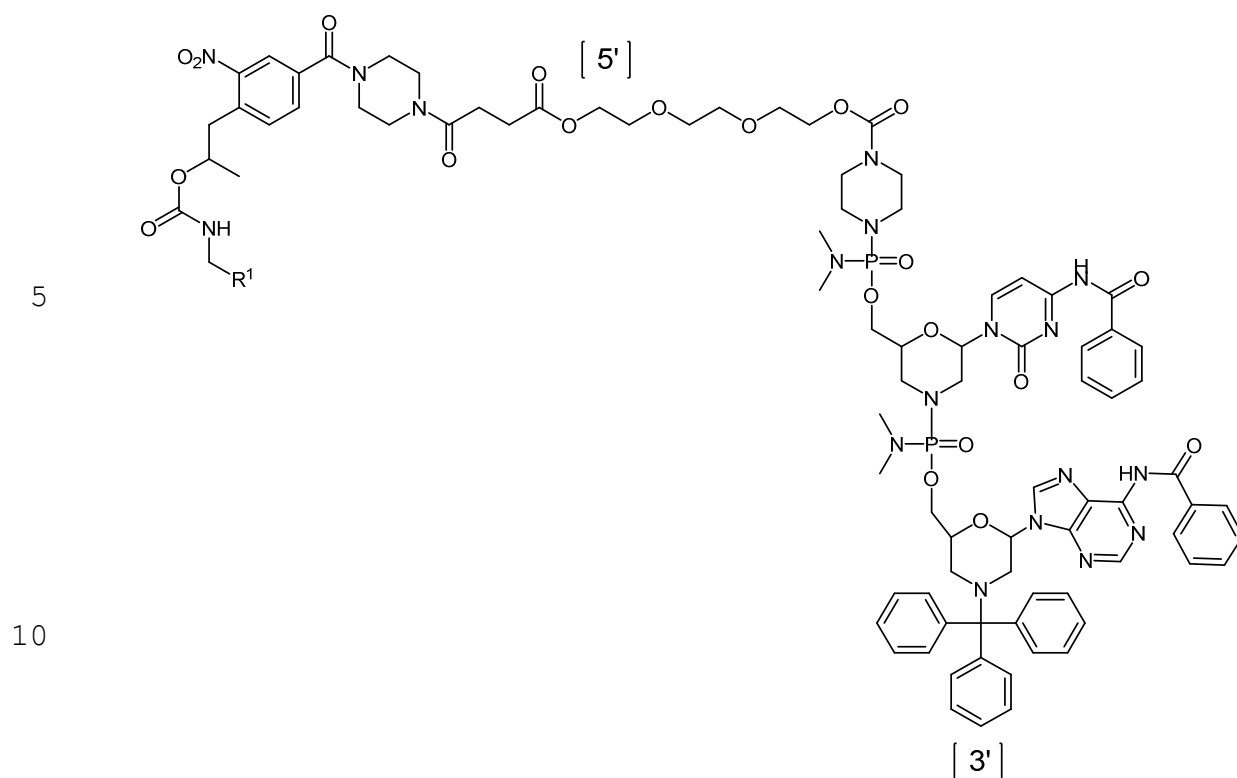
en donde R^1 es un medio de soporte;

(f) poner en contacto el compuesto de Fórmula (VI) con un compuesto de Fórmula (F) :



(F) ;

para formar un compuesto de Fórmula (VII) :



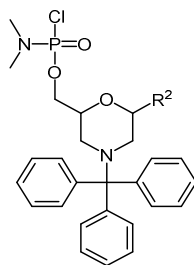
(VII) ;

en donde R^1 es un medio de soporte;

15 (g) realizar 20 iteraciones de las etapas
secuenciales de:

(g1) poner en contacto el producto formado por la
etapa inmediatamente previa con un agente de desbloqueo; y

(g2) poner en contacto el compuesto formado por la
20 etapa inmediatamente previa con un compuesto de Fórmula (VIII):

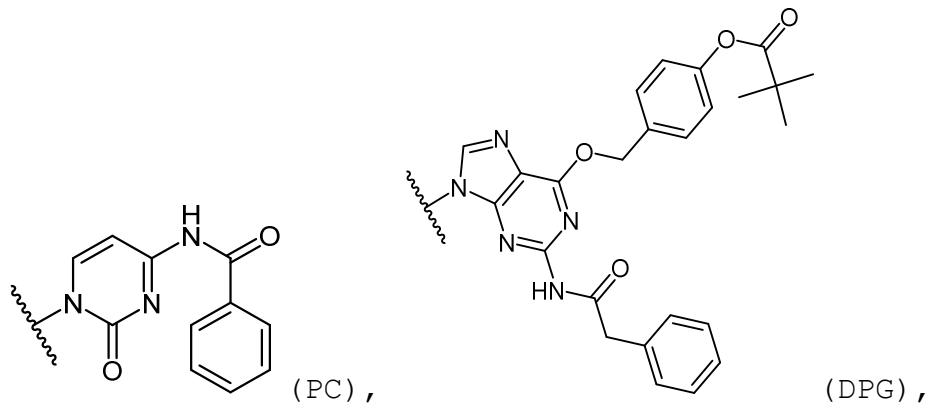


(VIII) ;

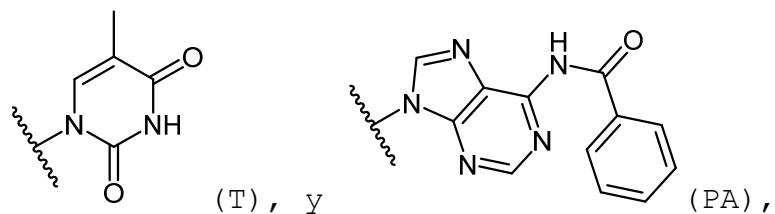
25

en donde R^2 , independientemente de cada compuesto de
Fórmula (VIII), se selecciona del grupo que consiste de:

5



10



en donde, para cada iteración desde 1 a 20, R^2 es:

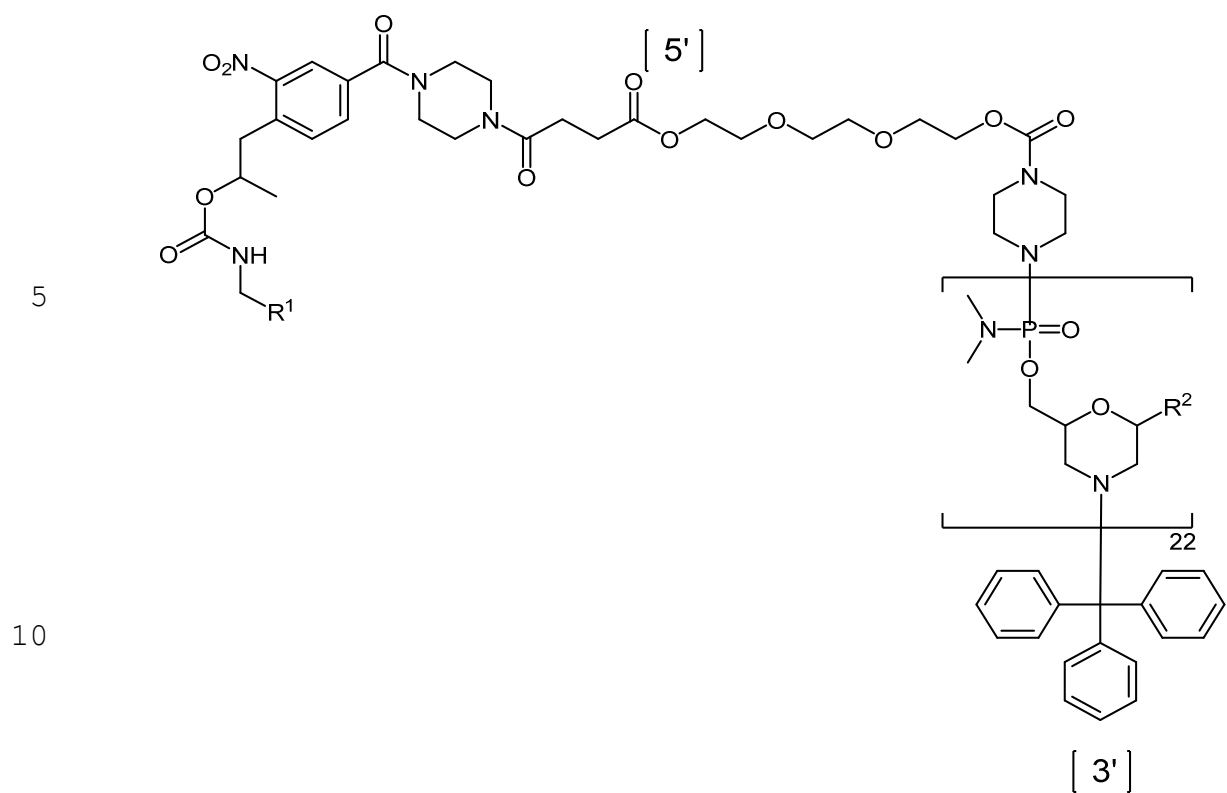
15

Iteración No.	R^2	Iteración No.	R^2
1	PA	11	DPG
2	T	12	DPG
3	DPG	13	PA
4	PC	14	DPG
5	PC	15	T
6	PA	16	T
7	T	17	PC
8	PC	18	PC
9	PC	19	T
10	T	20	DPG

20

para formar un compuesto de Fórmula (IX):

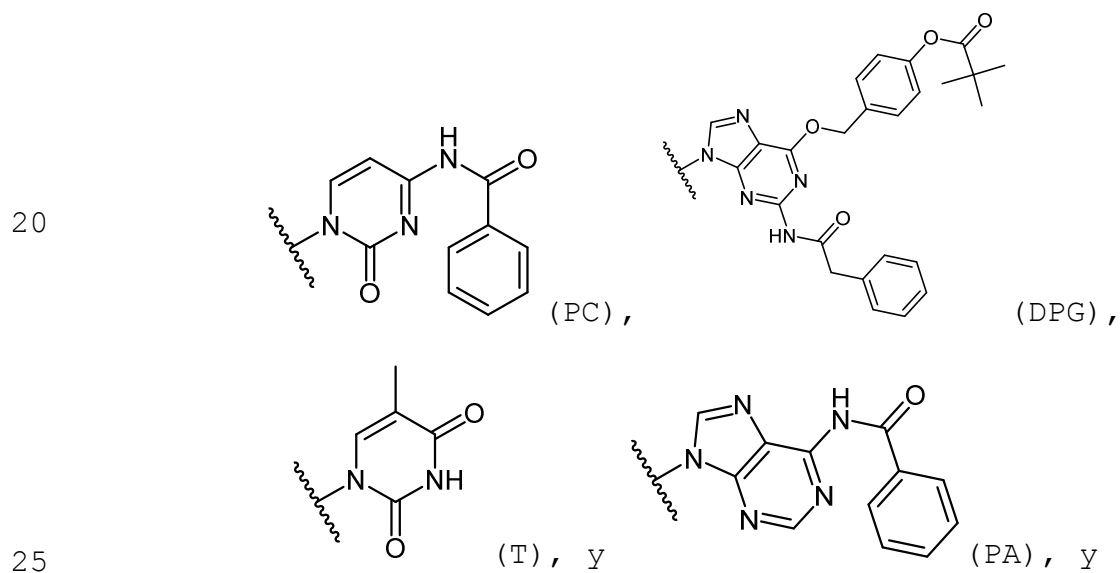
25



(IX) ;

en donde R^1 es un medio de soporte,

15 en donde R^2 , independientemente de cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:



15

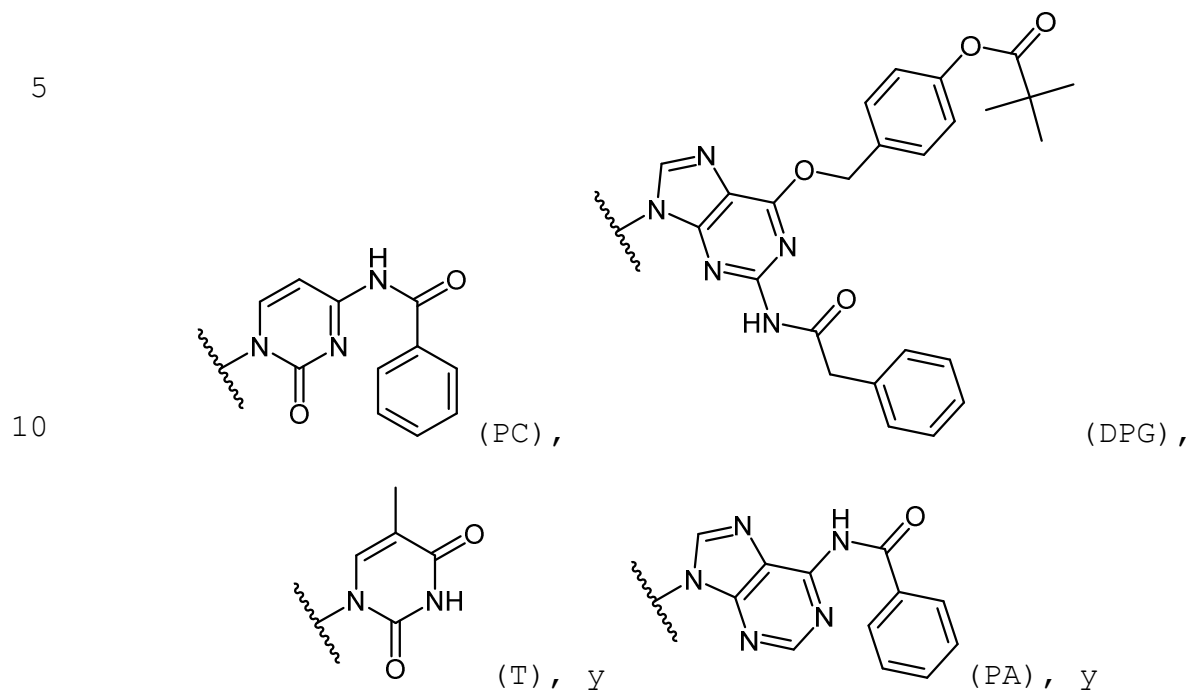
20

25



en donde R^1 es un medio de soporte,

en donde R^2 , independientemente de cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:



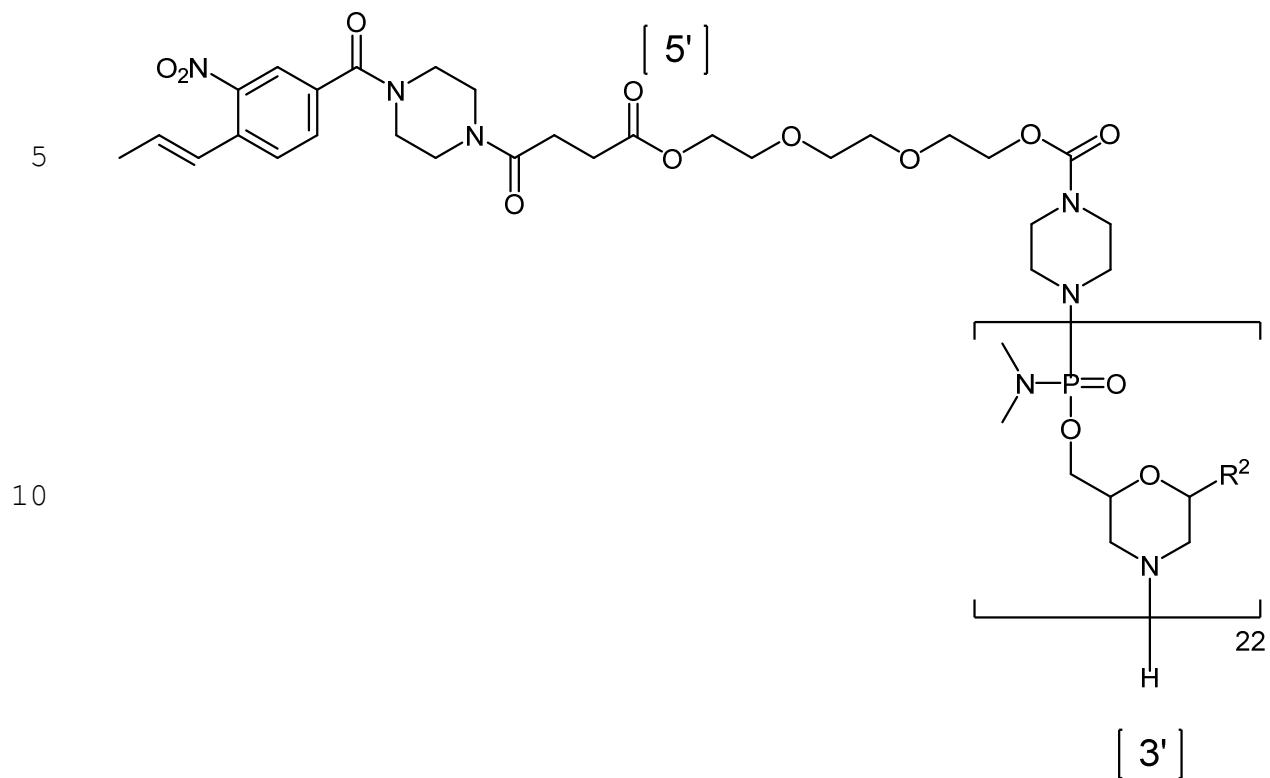
15 en donde R^2 en cada posición es desde 1 a 22 y 5' a 3' :

20

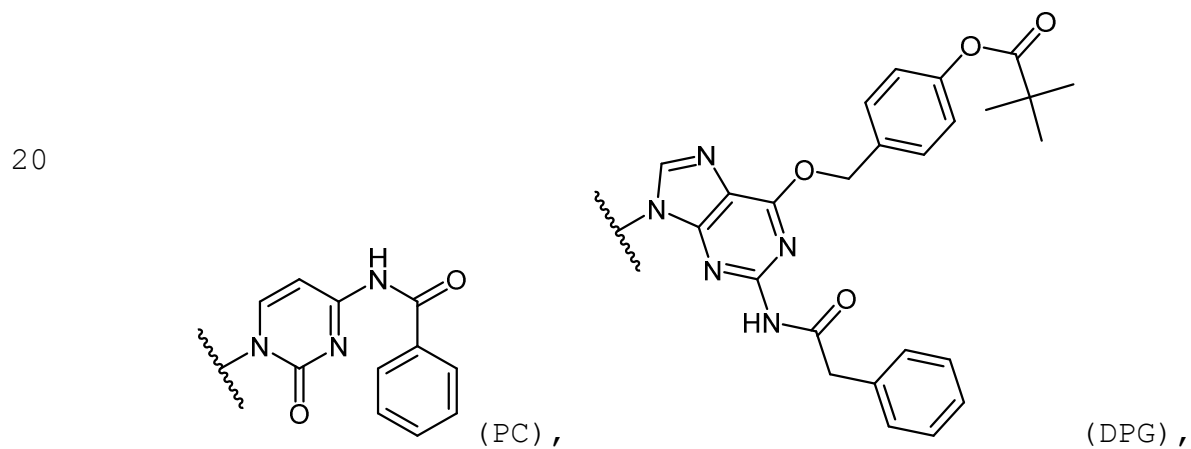
25

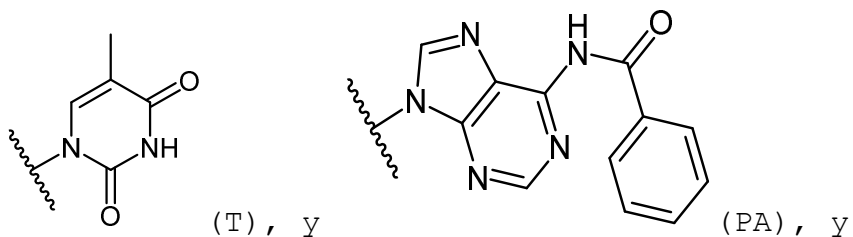
Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2
1	PC	11	PC	21	T
2	PA	12	T	22	DPG
3	PA	13	DPG		
4	T	14	DPG		
5	DPG	15	PA		
6	PC	16	DPG		
7	PC	17	T		
8	PA	18	T		
9	T	19	PC		
10	PC	20	PC		

(i) poner en contacto el compuesto de Fórmula (X) con un agente de escisión para formar un compuesto de Fórmula (XI):



en donde R^2 , independientemente de cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:





5 en donde R^2 en cada posición es desde 1 a 22 y 5' a 3' :

10

Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2
1	PC	11	PC	21	T
2	PA	12	T	22	DPG
3	PA	13	DPG		
4	T	14	DPG		
5	DPG	15	PA		
6	PC	16	DPG		
7	PC	17	T		
8	PA	18	T		
9	T	19	PC		
10	PC	20	PC		

15

y

(j) poner en contacto el compuesto de Fórmula (XI) con un agente de desprotección para formar el compuesto oligomérico de Fórmula (C).

20

En una modalidad, la etapa (d), la etapa (f), la etapa (g2), o combinaciones de las mismas comprenden además poner en contacto el compuesto de Fórmula (IV), Fórmula (VI), o el compuesto formado por la etapa inmediatamente previa, respectivamente, con un agente de terminación de cadena.

25

En ciertas modalidades, cada una de la etapa (d), la etapa (f) y la etapa (g2) comprende además poner en contacto

el compuesto de Fórmula (IV), Fórmula (VI), o el compuesto formado por la etapa inmediatamente previa, respectivamente, con un agente de terminación de cadena.

En otra modalidad, cada etapa se realiza en la presencia de al menos un solvente.

En todavía otra modalidad, el agente de desbloqueo usado en cada etapa es una solución que comprende un ácido halogenado.

En aún otra modalidad, el agente de desbloqueo usado en cada etapa es ácido cianoacético.

En otra modalidad, el ácido halogenado se selecciona del grupo que consiste de ácido cloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido fluoroacético, ácido difluoroacético, y ácido trifluoroacético.

En todavía otra modalidad, el ácido halogenado es ácido trifluoroacético.

En aún otra modalidad, al menos una de las etapas (c), (e), y (g1) comprende además la etapa de poner en contacto el compuesto desbloqueado de cada etapa con un agente de neutralización.

En otra modalidad, cada una de las etapas (c), (e), y (g1) comprende además la etapa de poner en contacto el compuesto desbloqueado de cada etapa con un agente de neutralización.

En todavía otra modalidad, el agente de

neutralización está en una solución que comprende diclorometano y alcohol isopropílico.

En aún otra modalidad, el agente de neutralización es un monoalquilo, dialquilo, o trialquil amina.

5 En otra modalidad, el agente de neutralización es N,N-diisopropiletilamina.

En todavía otra modalidad, el agente de desbloqueo usado en cada etapa es una solución que comprende 4-cianopiridina, diclorometano, ácido trifluoroacético,
10 trifluoroetanol y agua.

En aún otra modalidad, el agente de terminación de cadena está en una solución que comprende etilmorfolina y metilpirrolidinona.

En otra modalidad, el agente de terminación de cadena
15 es un anhídrido ácido.

En todavía otra modalidad, el anhídrido ácido es anhídrido benzoico.

En aún otra modalidad, el compuesto de Fórmula (VIII), Fórmula (D), y Fórmula (F) están cada uno,
20 independientemente, en una solución que comprende etilmorfolina y dimetilimidazolidinona.

En otra modalidad, el agente de escisión comprende ditiotreitol y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno.

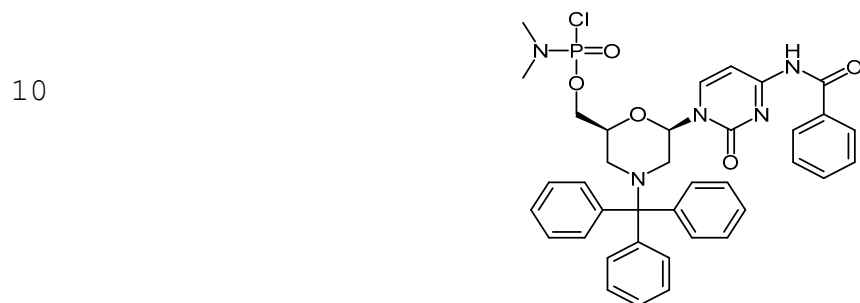
En todavía otra modalidad, el agente de escisión está
25 en una solución que comprende N-metil-2-pirrolidona.

En aún otra modalidad, el agente de desprotección comprende NH_3 .

En otra modalidad, el agente de desprotección está en una solución acuosa.

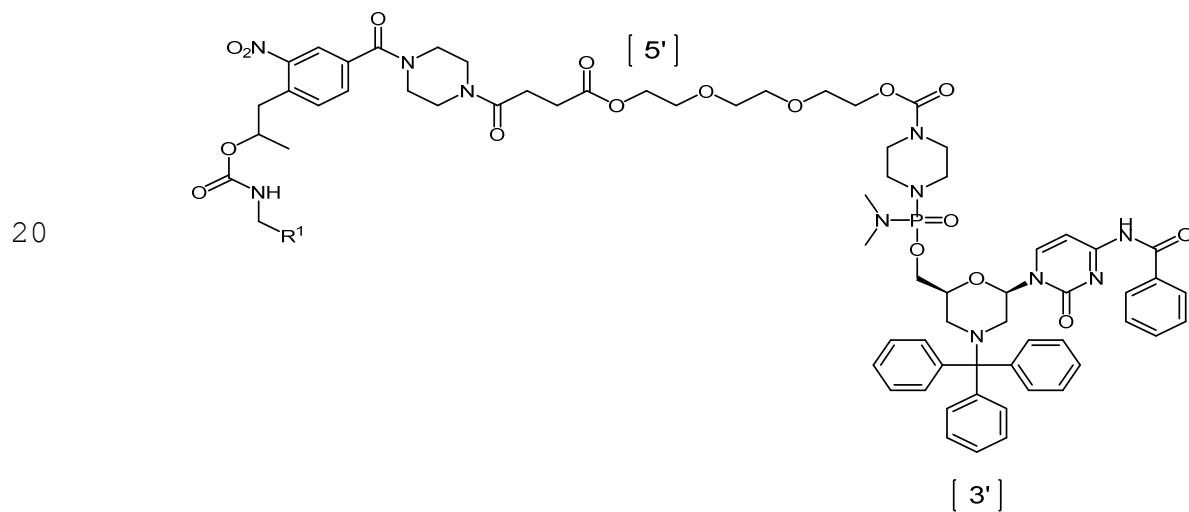
5 En todavía otra modalidad, el medio de soporte comprende poliestireno con 1% divinilbenceno reticulado.

En otra modalidad, el compuesto de Fórmula (D) es de Fórmula (D1):



(D1) .

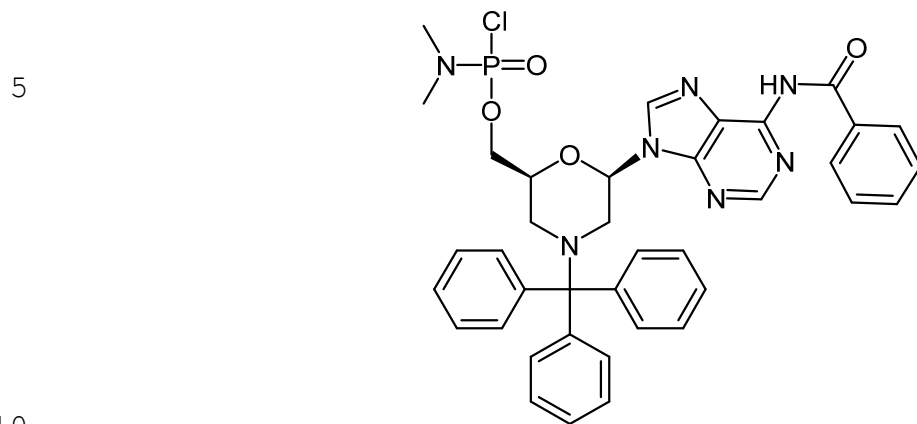
15 En otra modalidad, el compuesto de Fórmula (V) es de Fórmula (Va):



25 (Va) ,

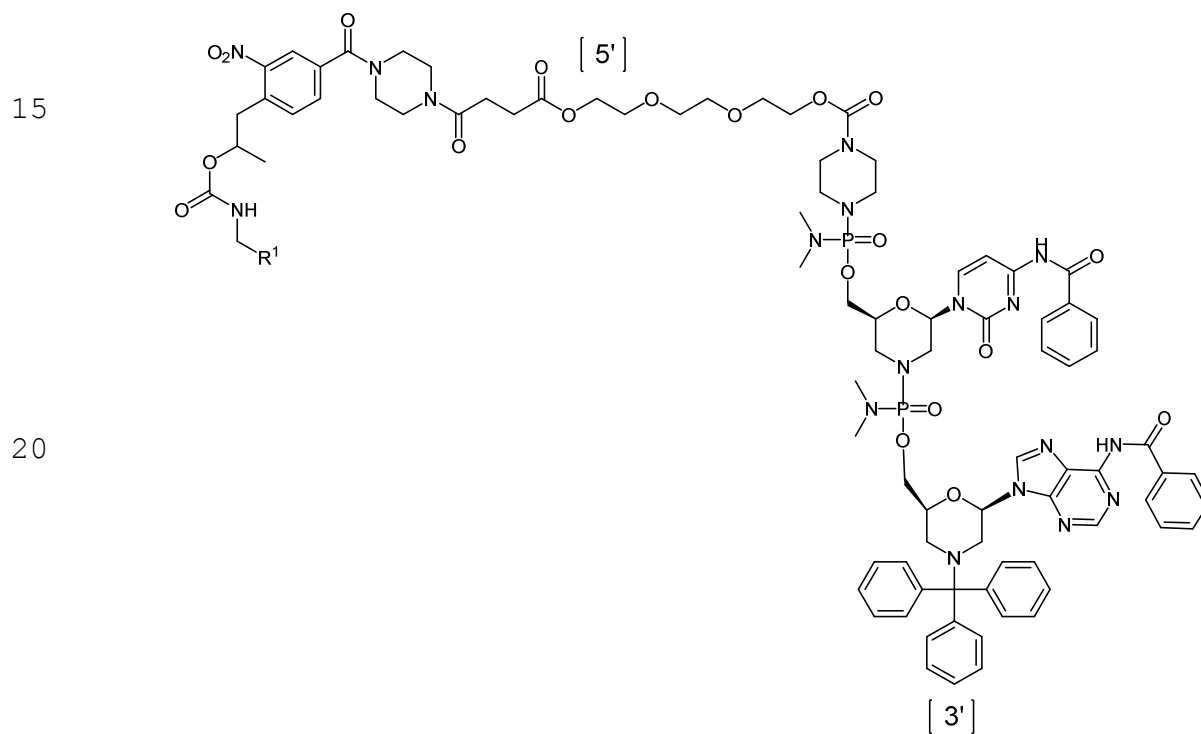
en donde R^1 es un medio de soporte.

En otra modalidad, el compuesto de Fórmula (F) es de
Fórmula (F1):



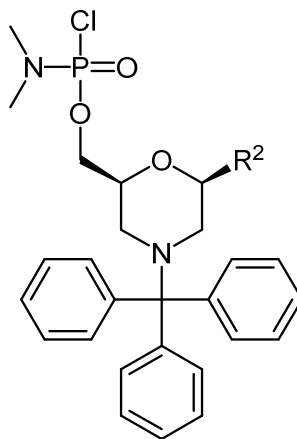
(F1).

En otra modalidad, el compuesto de Fórmula (VII) es
de Fórmula (VIIa):



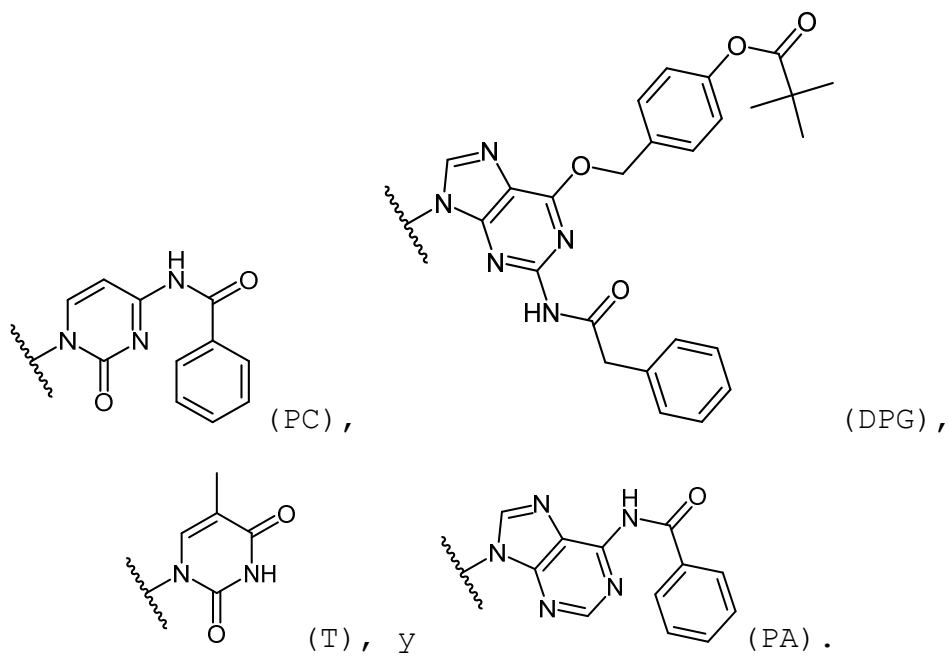
en donde R^1 es un medio de soporte.

En otra modalidad, el compuesto de Fórmula (VIII) es de Fórmula (VIIIa):



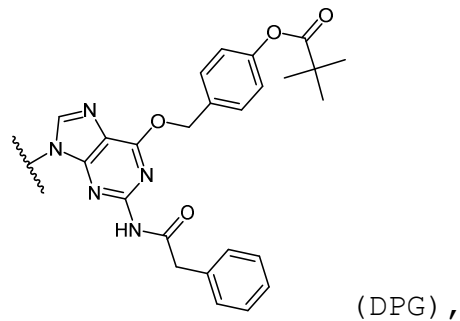
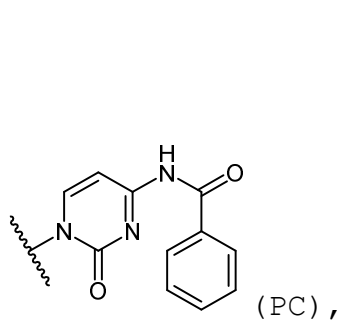
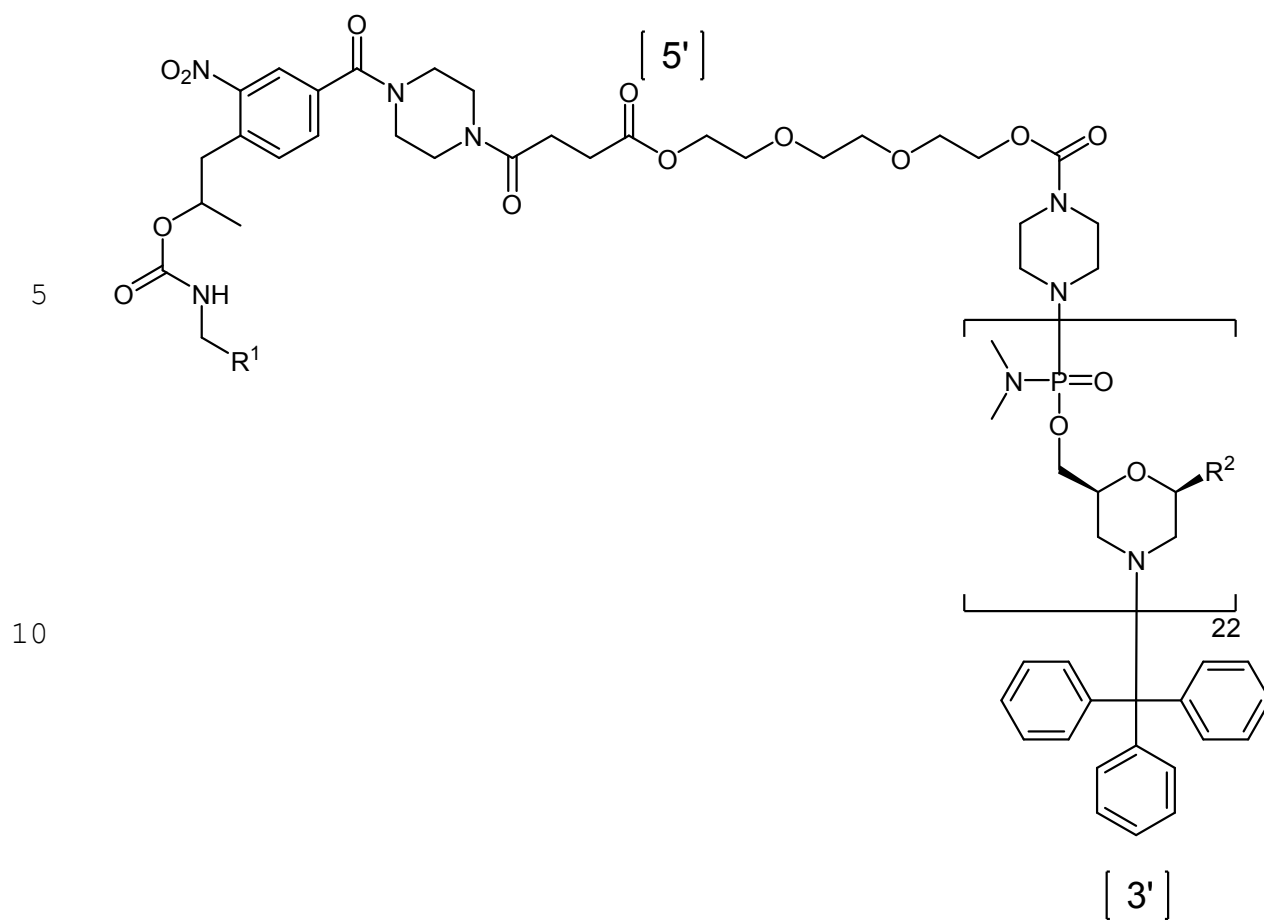
(VIIIa);

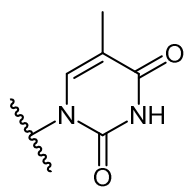
en donde R^2 , independientemente de cada compuesto de Fórmula (VIIIa), se selecciona del grupo que consiste de:



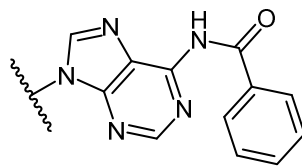
En otra modalidad, el compuesto de Fórmula (IX) es

de Fórmula (IXa):





(T), y



(PA), y

en donde R^2 en cada posición es desde 1 a 22 y 5' a

5

3' :

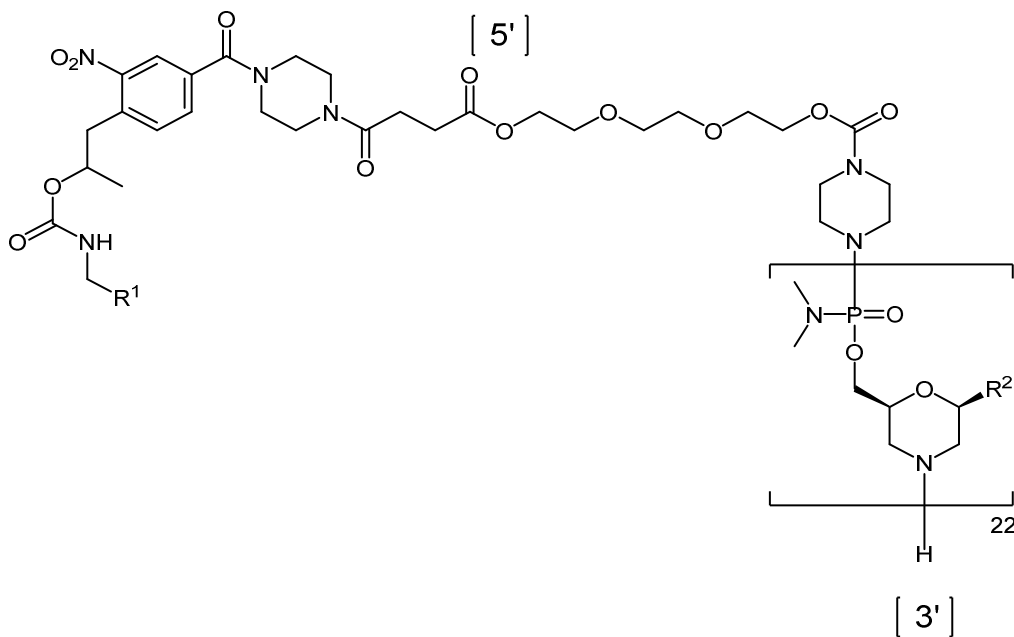
Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2
1	PC	11	PC	21	T
2	PA	12	T	22	DPG
3	PA	13	DPG		
4	T	14	DPG		
5	DPG	15	PA		
6	PC	16	DPG		
7	PC	17	T		
8	PA	18	T		
9	T	19	PC		
10	PC	20	PC		

10

En otra modalidad, el compuesto de Fórmula (X) es de

Fórmula (Xa):

15



20

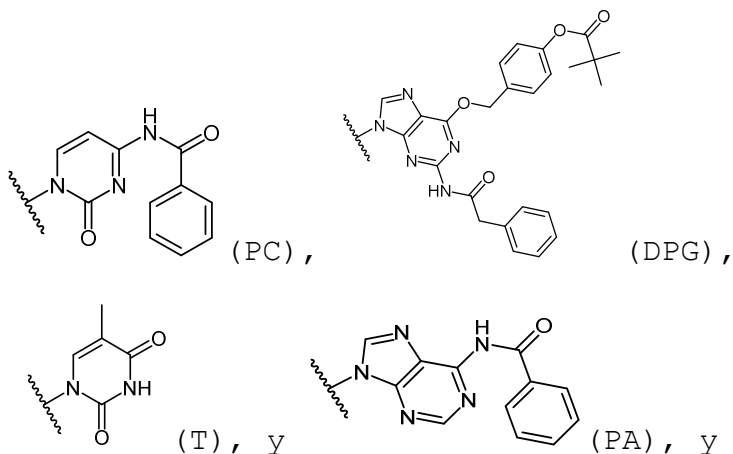
25

(Xa),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

R^1 es un medio de soporte, y

R^2 , independientemente en cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:



en donde R^2 en cada posición es desde 1 a 22 y 5' a 3' :

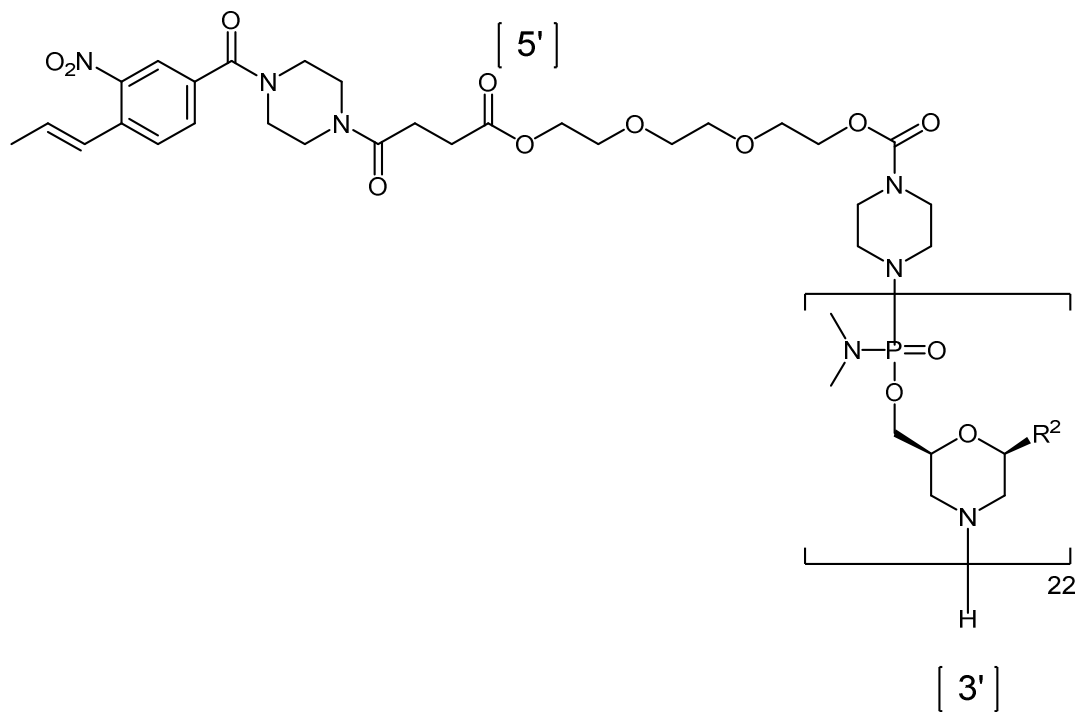
15

Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2
1	PC	11	PC	21	T
2	PA	12	T	22	DPG
3	PA	13	DPG		
4	T	14	DPG		
5	DPG	15	PA		
6	PC	16	DPG		
7	PC	17	T		
8	PA	18	T		
9	T	19	PC		
10	PC	20	PC		

20

En otra modalidad, el compuesto de Fórmula (XI) es

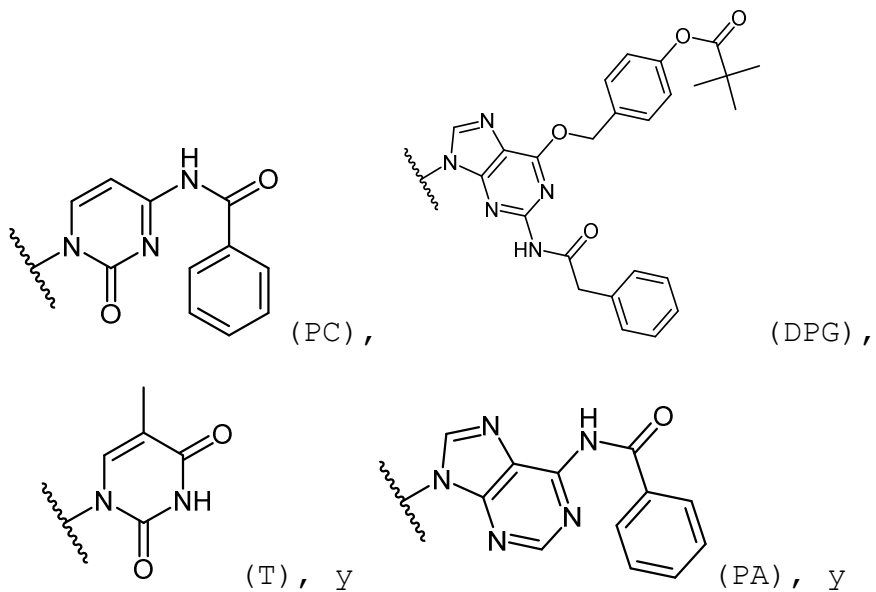
25 de Fórmula (XIa):



(XIa) ,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en
donde:

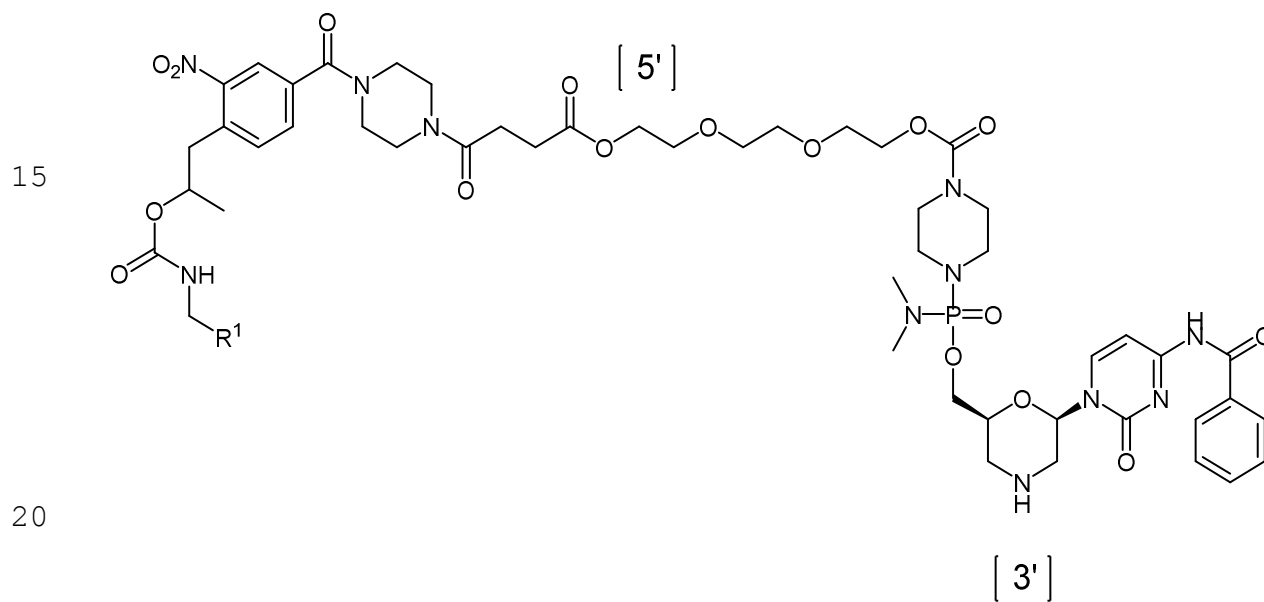
15 R^2 , independientemente en cada aparición, se
selecciona del grupo que consiste de:



en donde R^2 en cada posición es desde 1 a 22 y 5' a 3':

Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2
1	DPG	PC	11	PC	21
2	T	PA	12	T	22
3	T	PA	13	DPG	
4	DPG	T	14	DPG	
5	PC	DPG	15	PA	
6	PC	PC	16	DPG	
7	T	PC	17	T	
8	PC	PA	18	T	
9	PC	T	19	PC	
10	DPG	PC	20	PC	

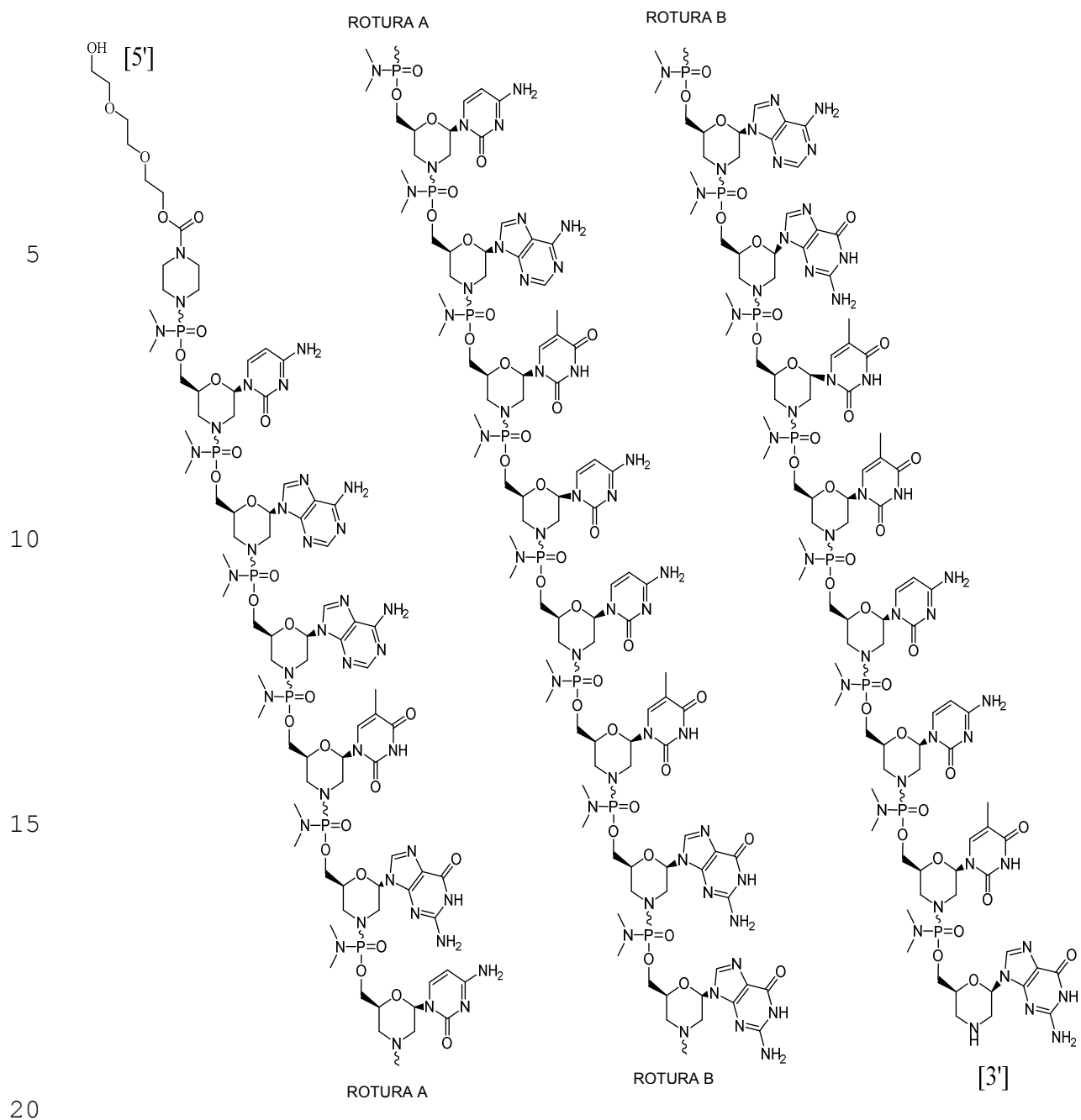
En otra modalidad, el compuesto de Fórmula (VI) es de Fórmula (VIa):



(VIa);

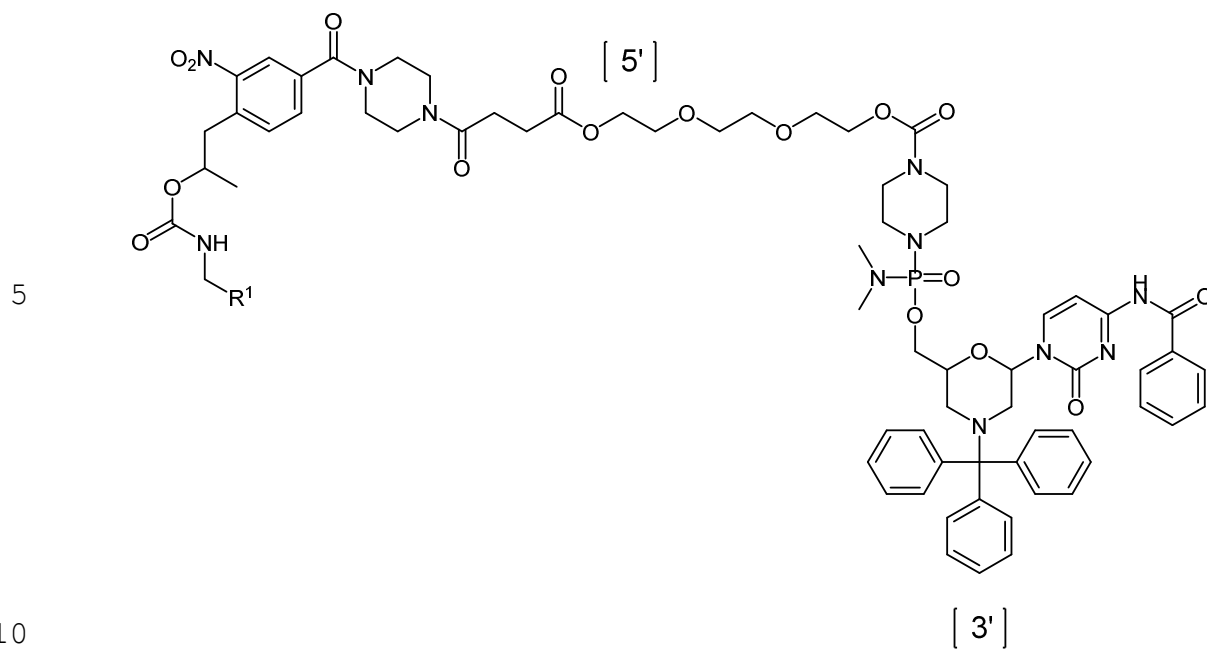
en donde R^1 es un medio de soporte.

En aún otra modalidad, el compuesto oligomérico de Fórmula (C) es un compuesto oligomérico de Fórmula (XII):



(XII).

En otro aspecto, en la presente se proporciona un compuesto de Fórmula (V):

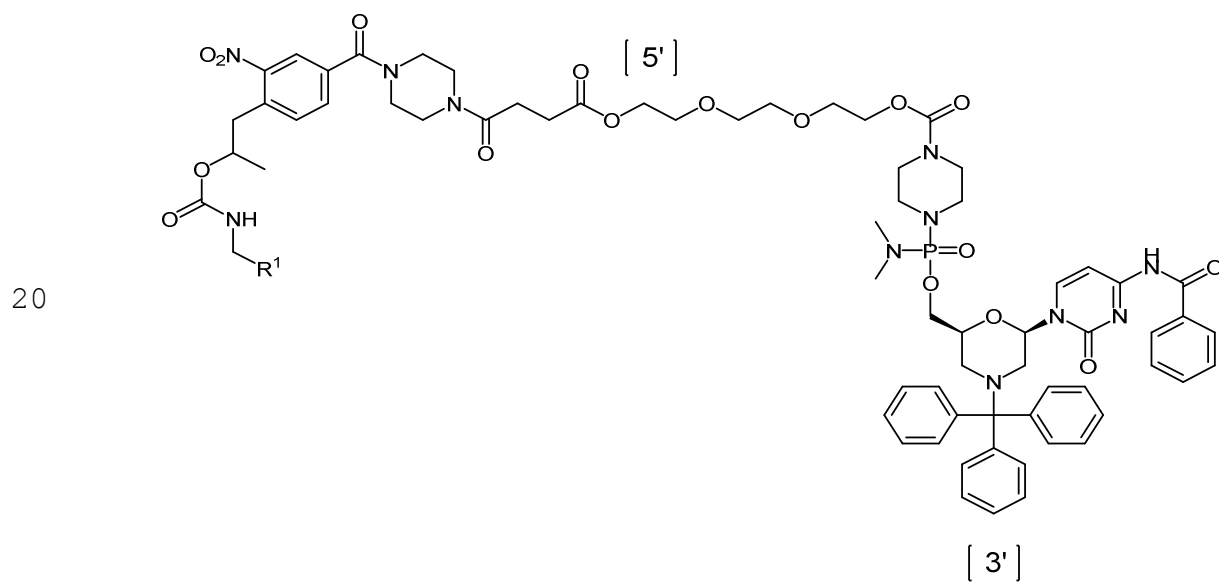


(V) ;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^1 es un medio de soporte.

En una modalidad, el compuesto de Fórmula (V) es de

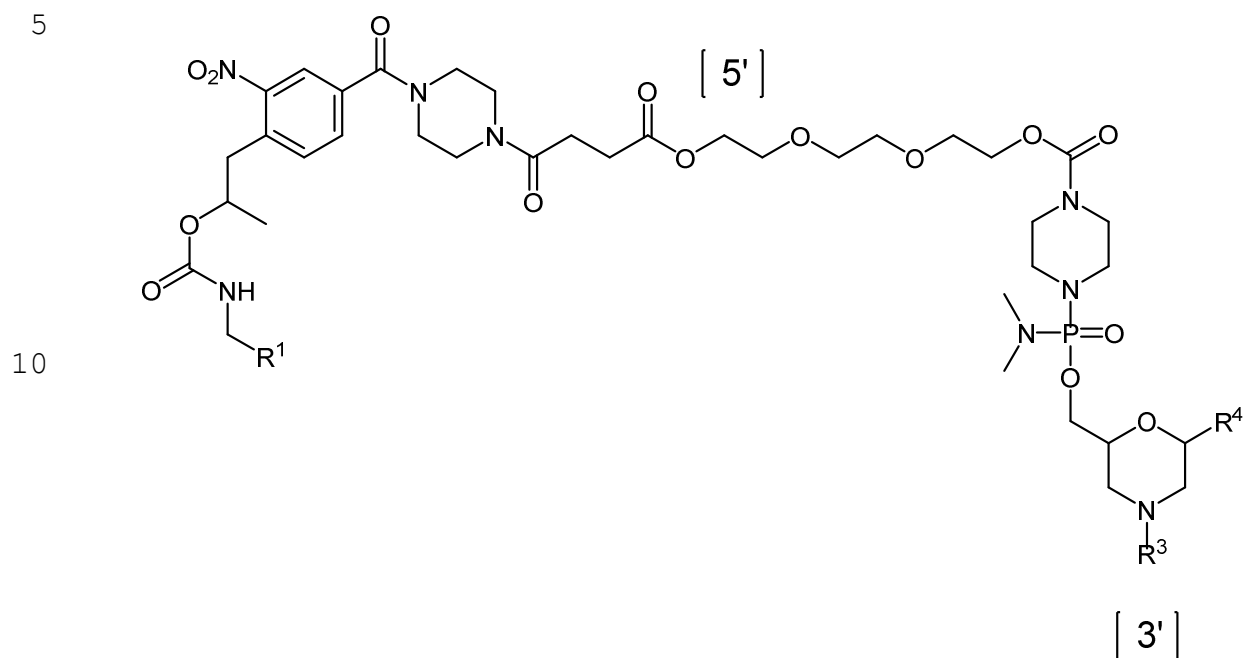
15 Fórmula (Va) :



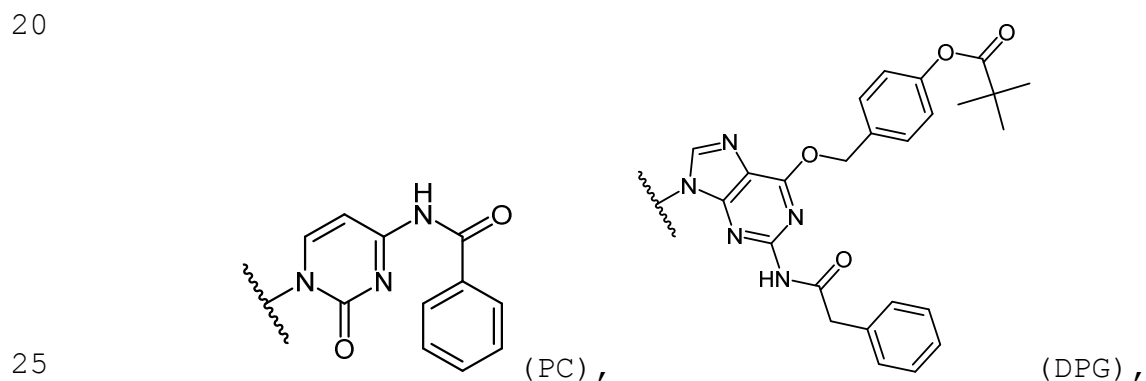
(Va) ,

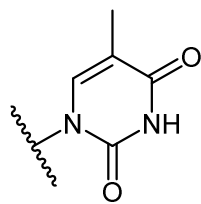
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^1 es un medio de soporte.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un compuesto de Fórmula (A5):

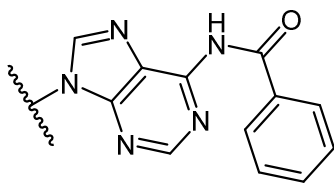


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^1 es un medio de soporte, R^3 se selecciona del grupo que consiste de tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo, y R^4 se selecciona de:

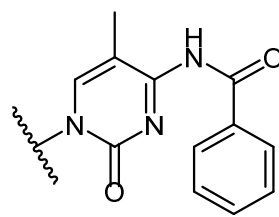




(T),

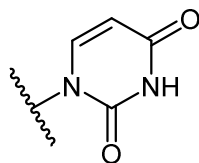
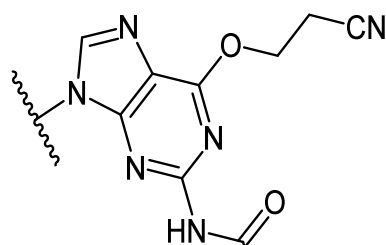


(PA),

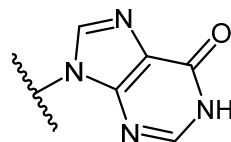


(P5mC),

5



(U),

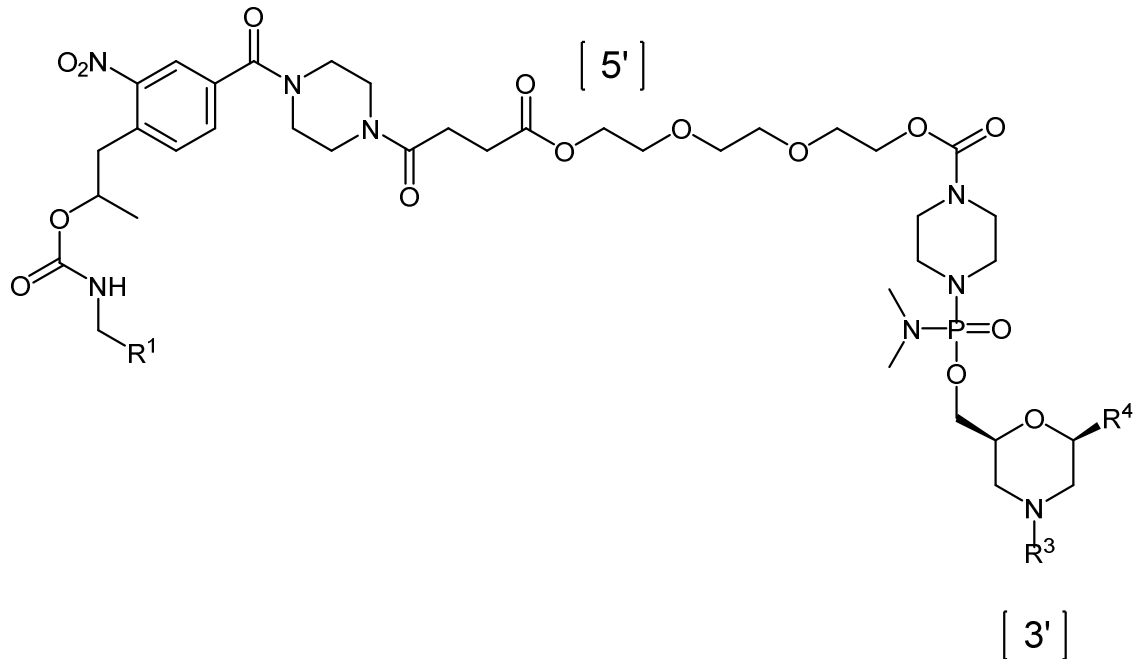


(I), y

10

(PG).

En una modalidad, el compuesto de Fórmula (A5) es de
Fórmula (A5a):



15

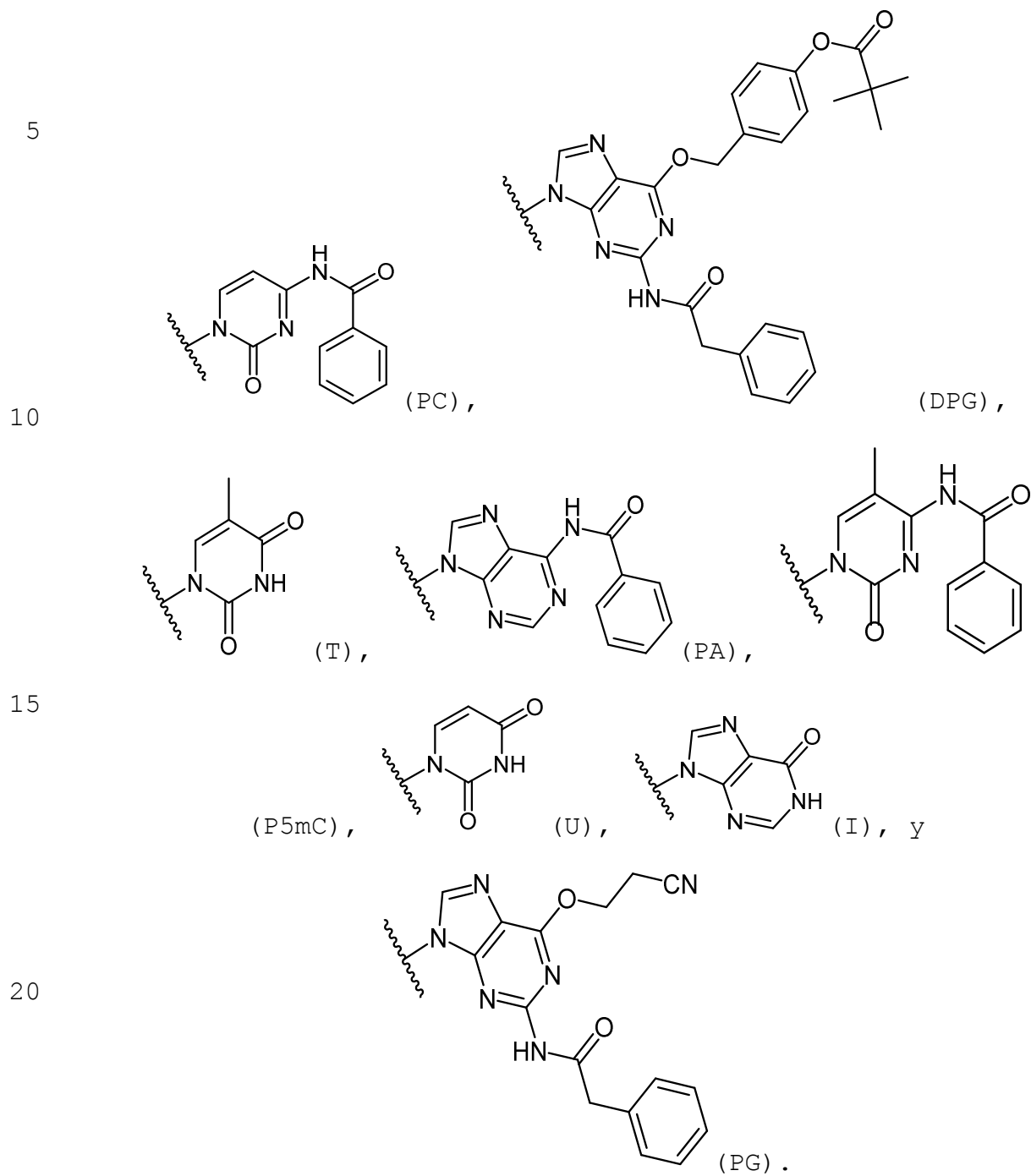
20

(A5a);

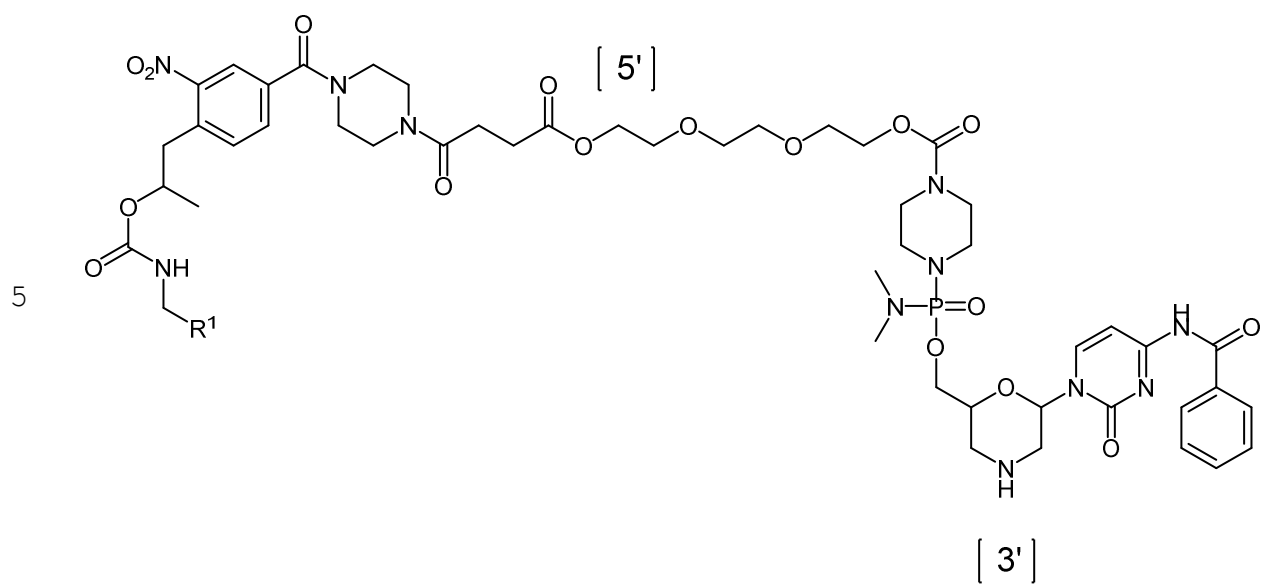
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en
donde R^1 es un medio de soporte, R^3 se selecciona del grupo que

25

consiste de tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo, y R^4 se selecciona de:



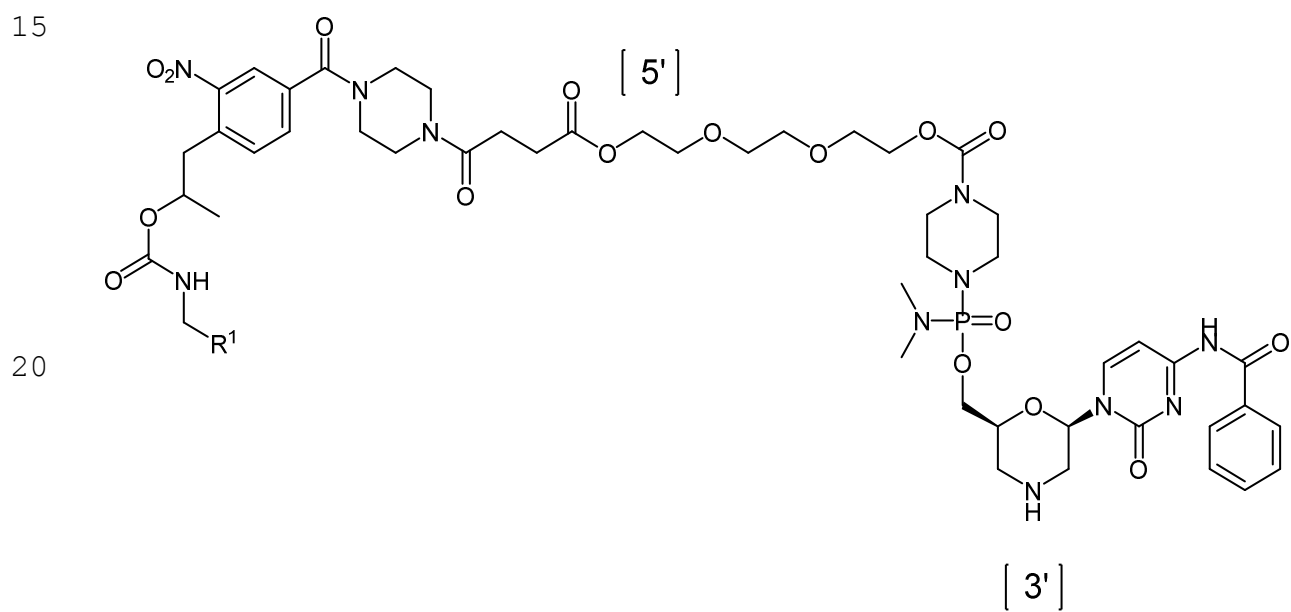
En otro aspecto, en la presente se proporciona un
 25 compuesto de Fórmula (VI):



10 (VI);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^1 es un medio de soporte.

En una modalidad, el compuesto de Fórmula (VI) es de Fórmula (VIa):

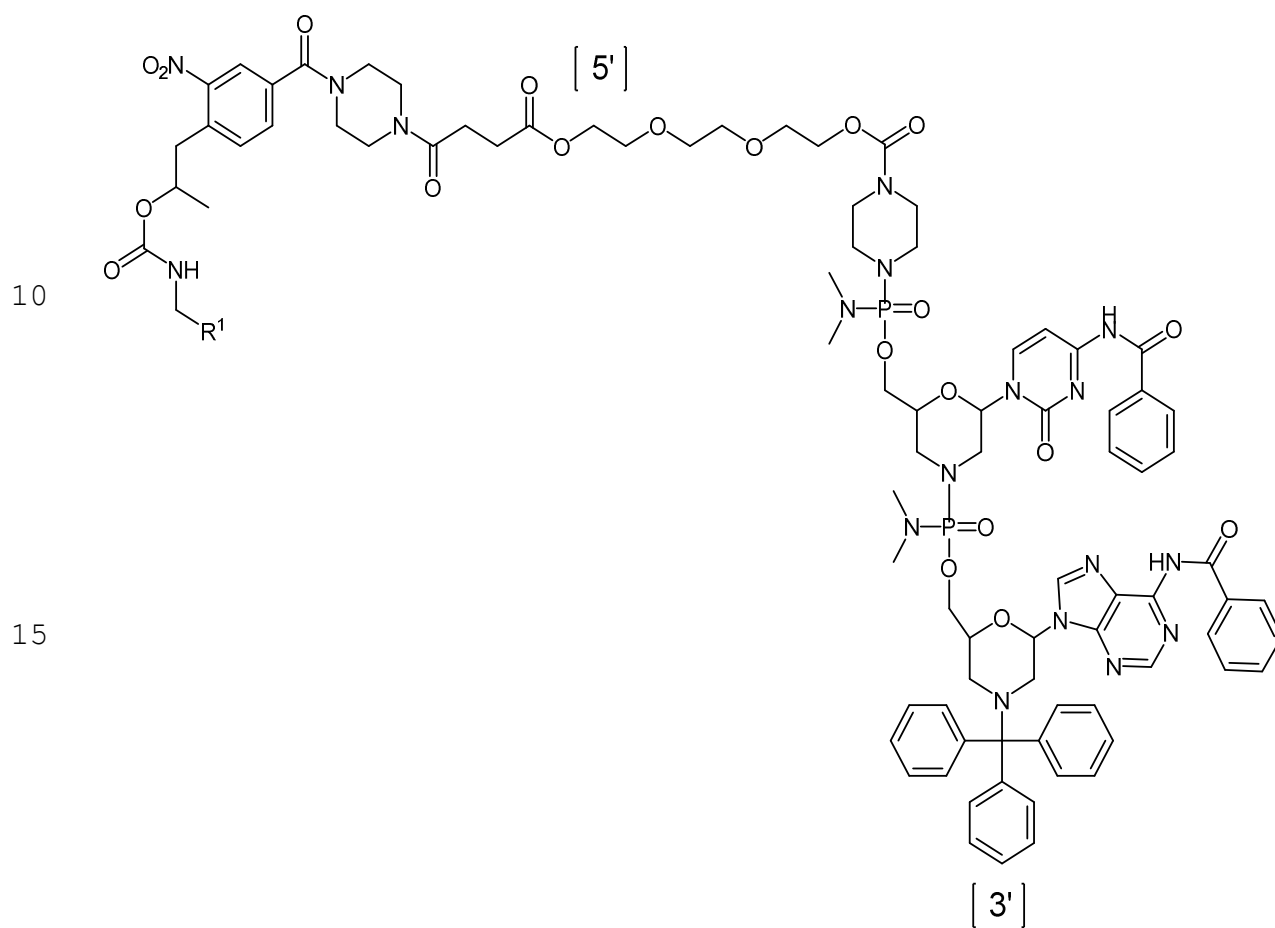


(VIa);

25

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^1 es un medio de soporte.

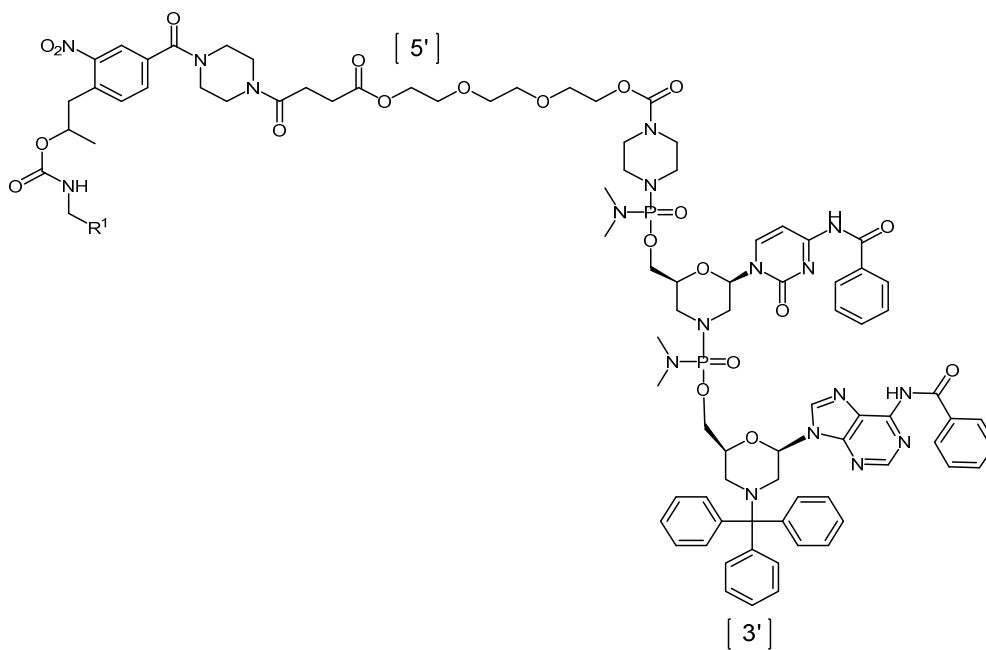
En otro aspecto, en la presente se proporciona un compuesto de Fórmula (VII):



(VII);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^1 es un medio de soporte.

En una modalidad, el compuesto de Fórmula (VII) es de Fórmula (VIIa):

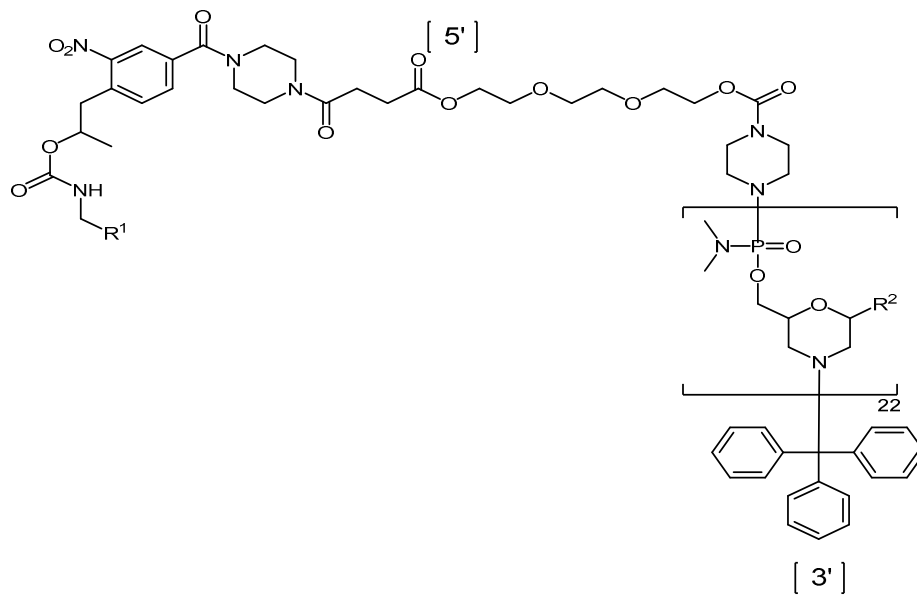


(VIIa),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^1 es un medio de soporte.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un compuesto de Fórmula (IX):

15

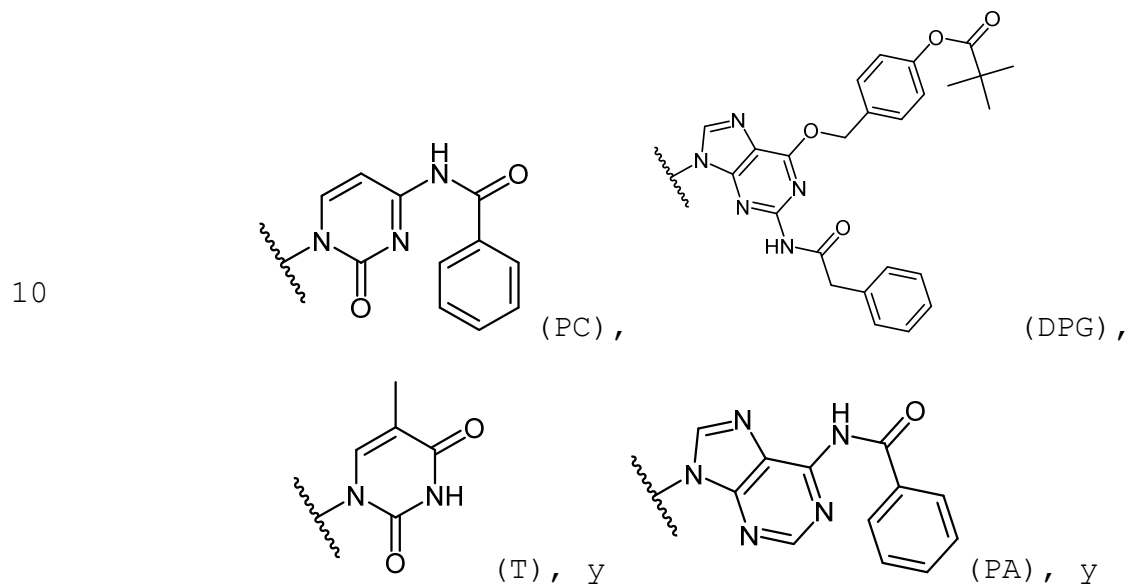


(IX),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 es un medio de soporte, y

R^2 , independientemente en cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:



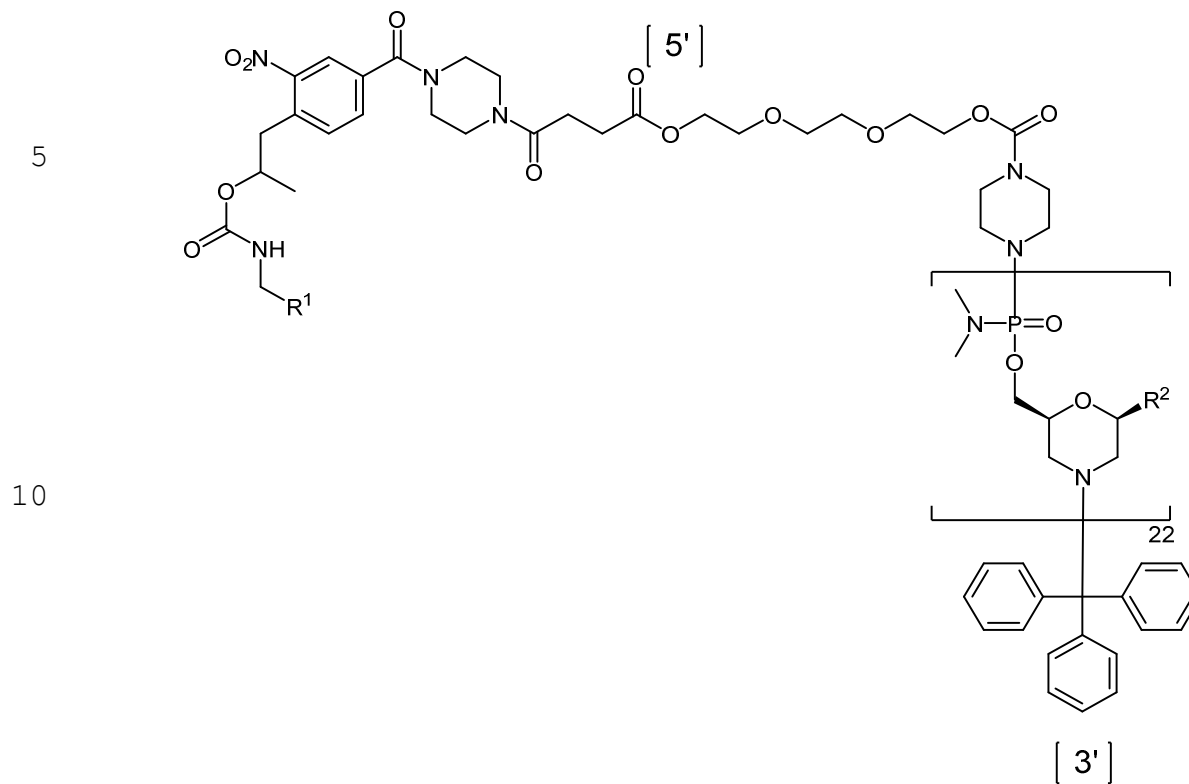
15 en donde R^2 en cada posición es desde 1 a 22 y 5' a 3' :

20

Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2
1	PC	11	PC	21	T
2	PA	12	T	22	DPG
3	PA	13	DPG		
4	T	14	DPG		
5	DPG	15	PA		
6	PC	16	DPG		
7	PC	17	T		
8	PA	18	T		
9	T	19	PC		
10	PC	20	PC		

25

En una modalidad, el compuesto de Fórmula (IX) es de
Fórmula (IXa):

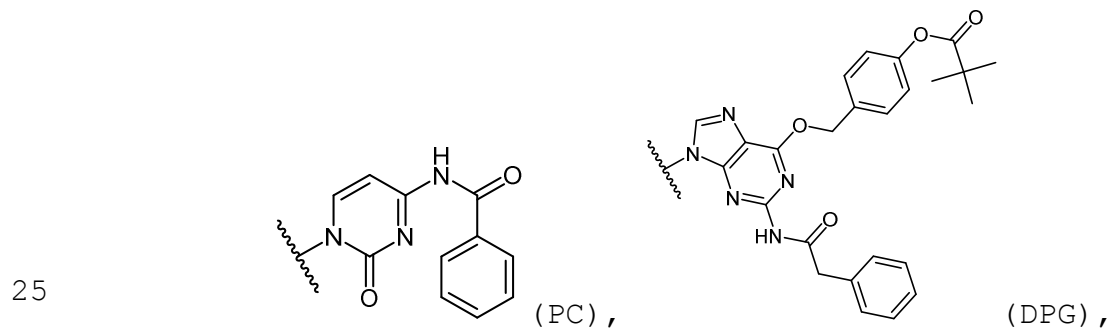


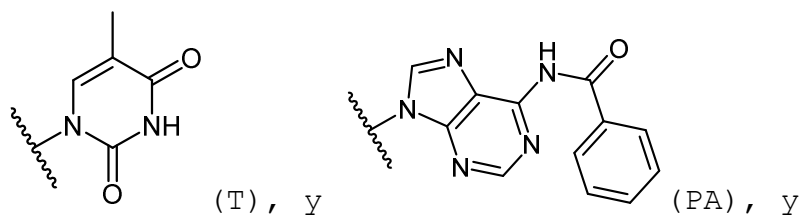
15 (IXa),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en
donde

R¹ es un medio de soporte, y

R², independientemente en cada aparición, se
20 selecciona del grupo que consiste de:

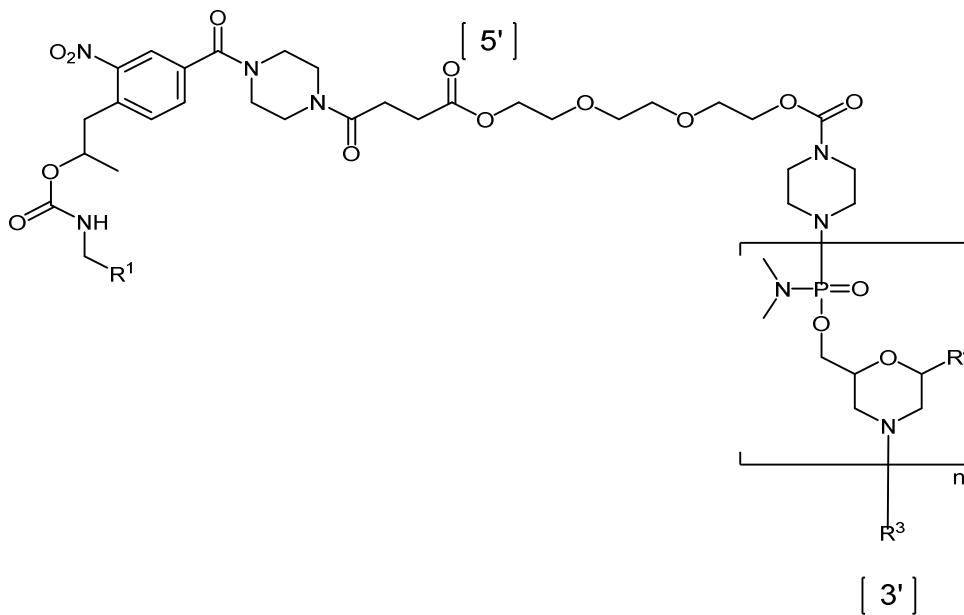




en donde R^2 en cada posición es desde 1 a 22 y 5' a 3':

Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2
1	PC	11	PC	21	T
2	PA	12	T	22	DPG
3	PA	13	DPG		
4	T	14	DPG		
5	DPG	15	PA		
6	PC	16	DPG		
7	PC	17	T		
8	PA	18	T		
9	T	19	PC		
10	PC	20	PC		

En otro aspecto, en la presente se proporciona un compuesto de Fórmula (A9):



(A9),

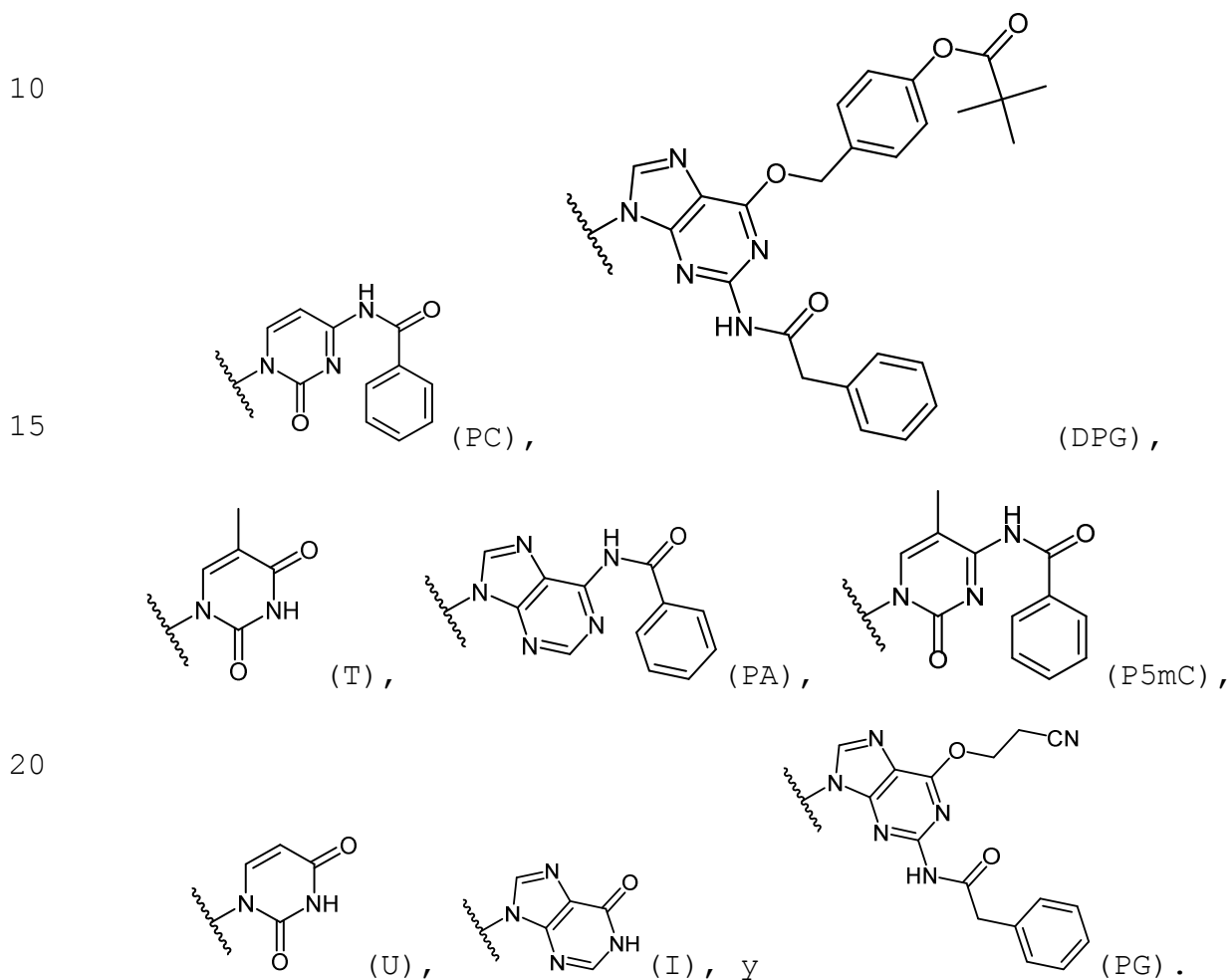
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

n es un número entero desde 10 a 40;

R¹ es un medio de soporte;

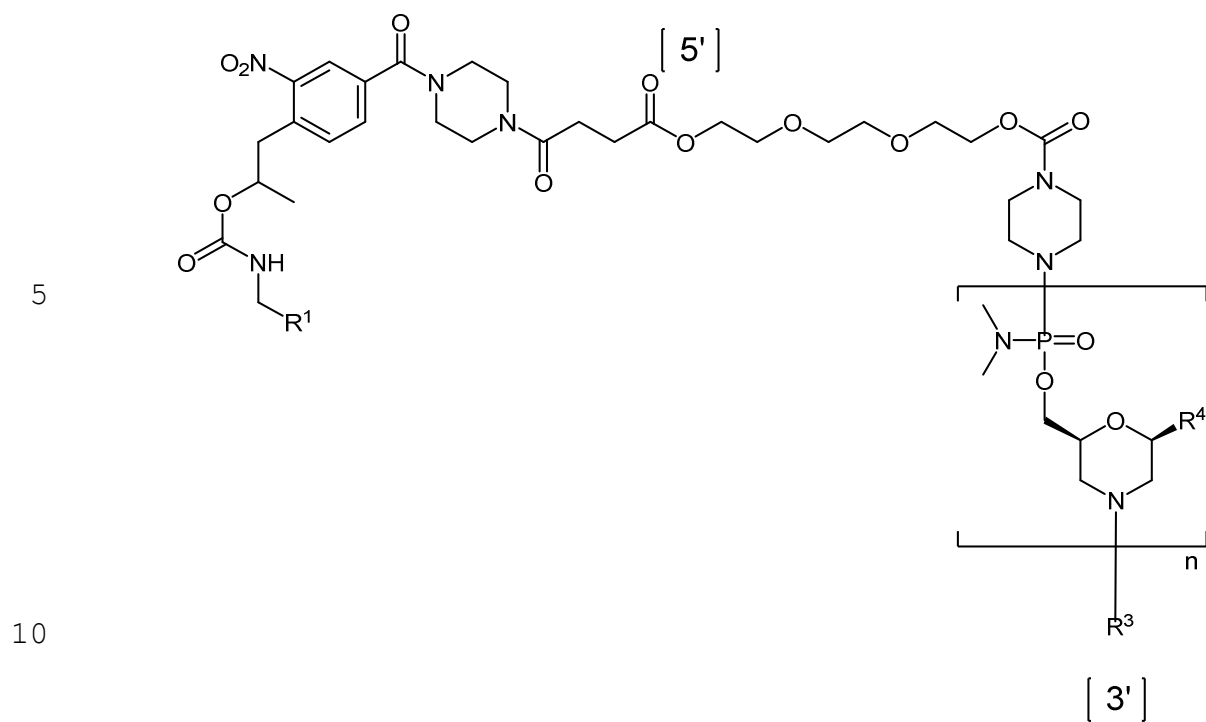
5 R³ se selecciona del grupo que consiste de tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y

R⁴, independientemente en cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:



En una modalidad, el compuesto de Fórmula (A9) es de

25 Fórmula (A9a):



(A9a) ,

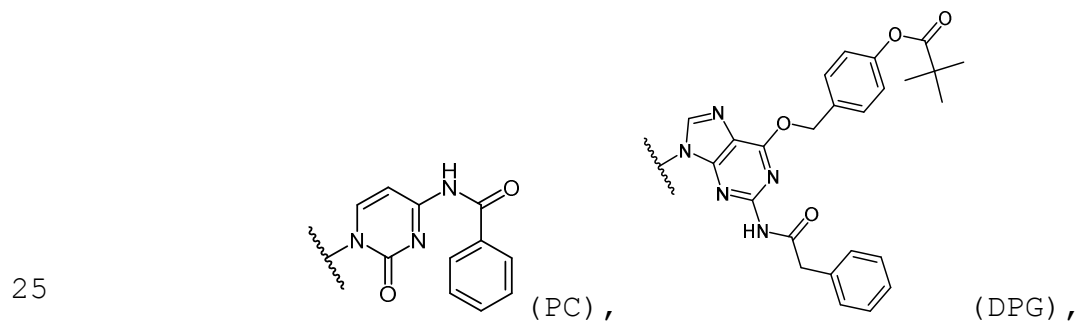
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en
donde:

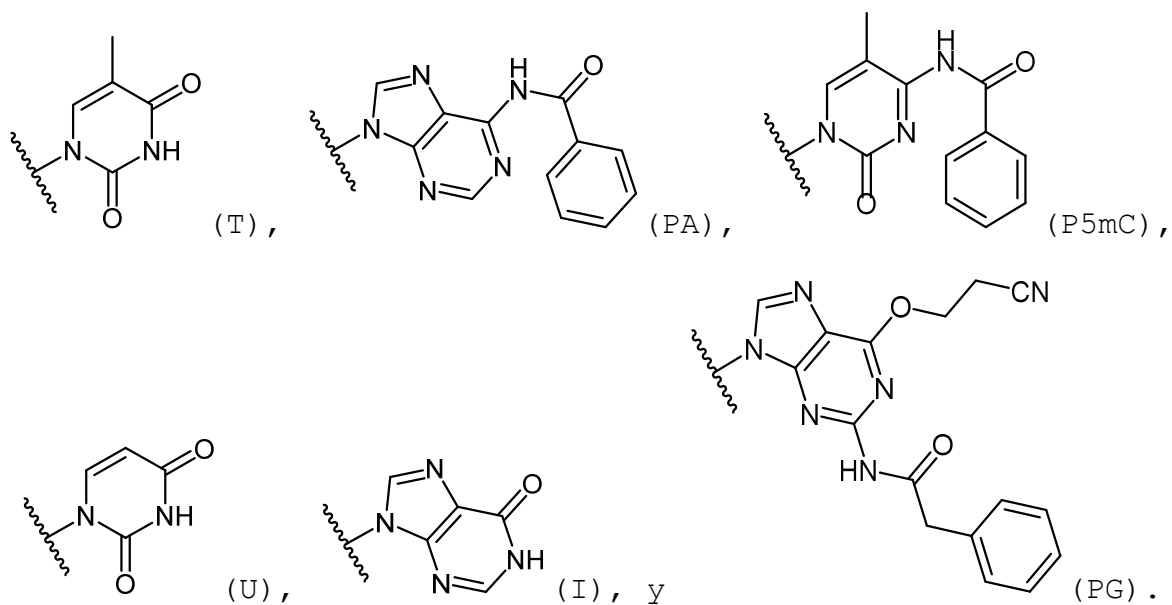
15 n es un número entero desde 10 a 40;

R¹ es un medio de soporte;

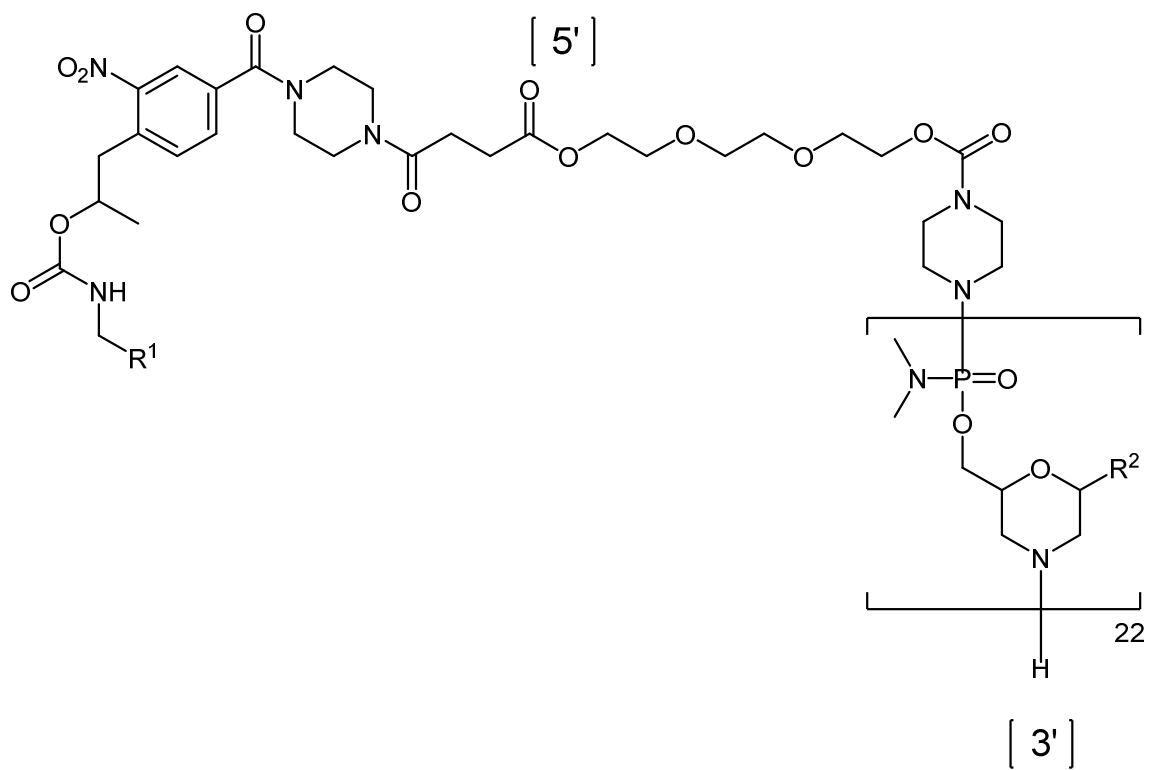
R³ se selecciona del grupo que consiste de tritilo,
monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y

20 R⁴, independientemente en cada aparición, se
selecciona del grupo que consiste de:





En otro aspecto, en la presente se proporciona un compuesto de Fórmula (X):



(X);

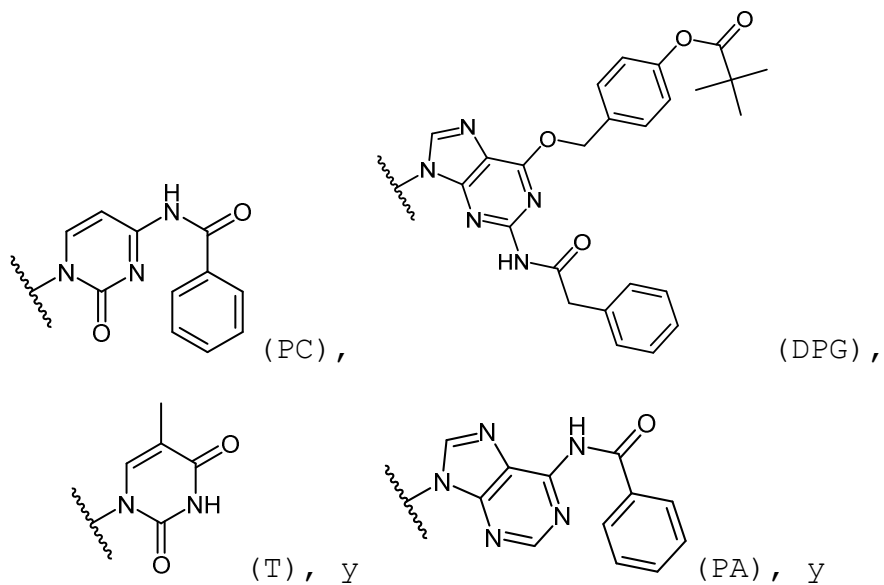
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en

donde

R^1 es un medio de soporte, y

R^2 , independientemente en cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:

5



10

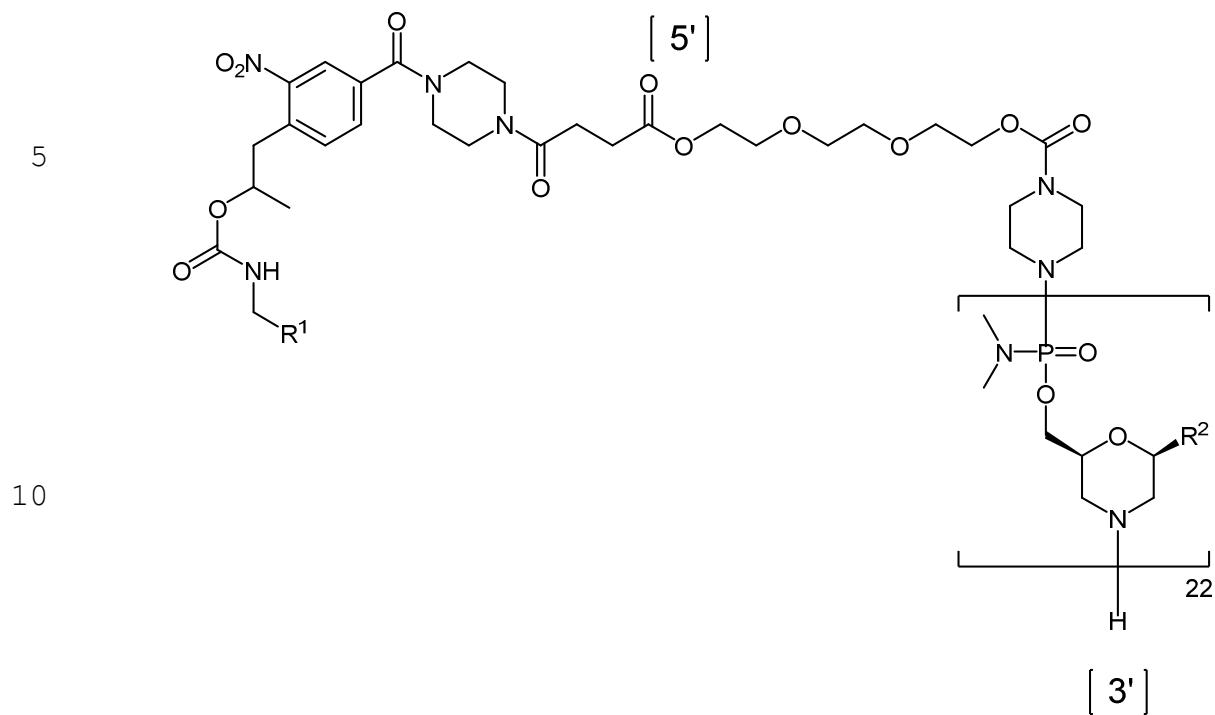
en donde R^2 en cada posición es desde 1 a 22 y 5' a

15 3' :

Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2
1	PC	11	PC	21	T
2	PA	12	T	22	DPG
3	PA	13	DPG		
4	T	14	DPG		
5	DPG	15	PA		
6	PC	16	DPG		
7	PC	17	T		
8	PA	18	T		
9	T	19	PC		
10	PC	20	PC		

25

En una modalidad, el compuesto de Fórmula (X) es de
Fórmula (Xa):



(Xa),

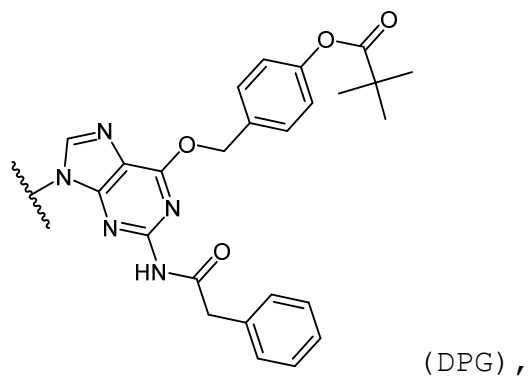
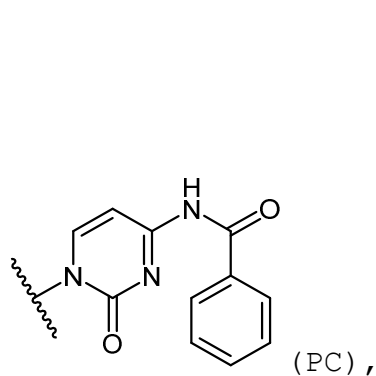
15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en
donde

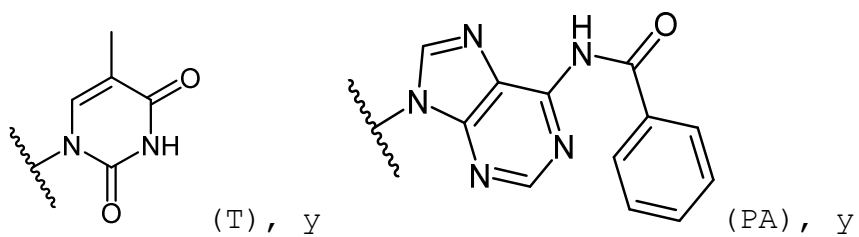
R^1 es un medio de soporte, y

R^2 , independientemente en cada aparición, se
selecciona del grupo que consiste de:

20

25





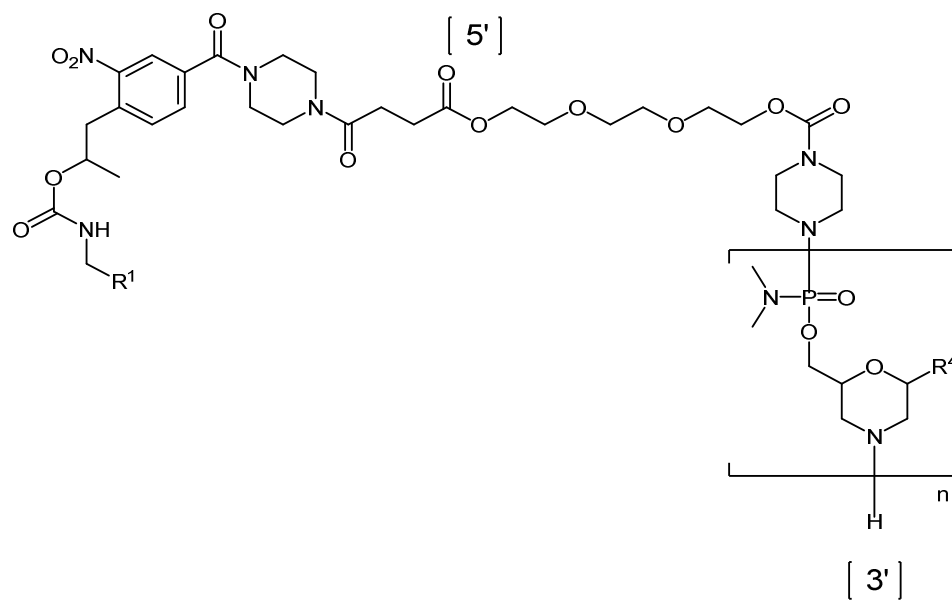
5 en donde R^2 en cada posición es desde 1 a 22 y 5' a 3':

10

Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2
1	PC	11	PC	21	T
2	PA	12	T	22	DPG
3	PA	13	DPG		
4	T	14	DPG		
5	DPG	15	PA		
6	PC	16	DPG		
7	PC	17	T		
8	PA	18	T		
9	T	19	PC		
10	PC	20	PC		

15 En otro aspecto, en la presente se proporciona un compuesto de Fórmula (A10):

20



25

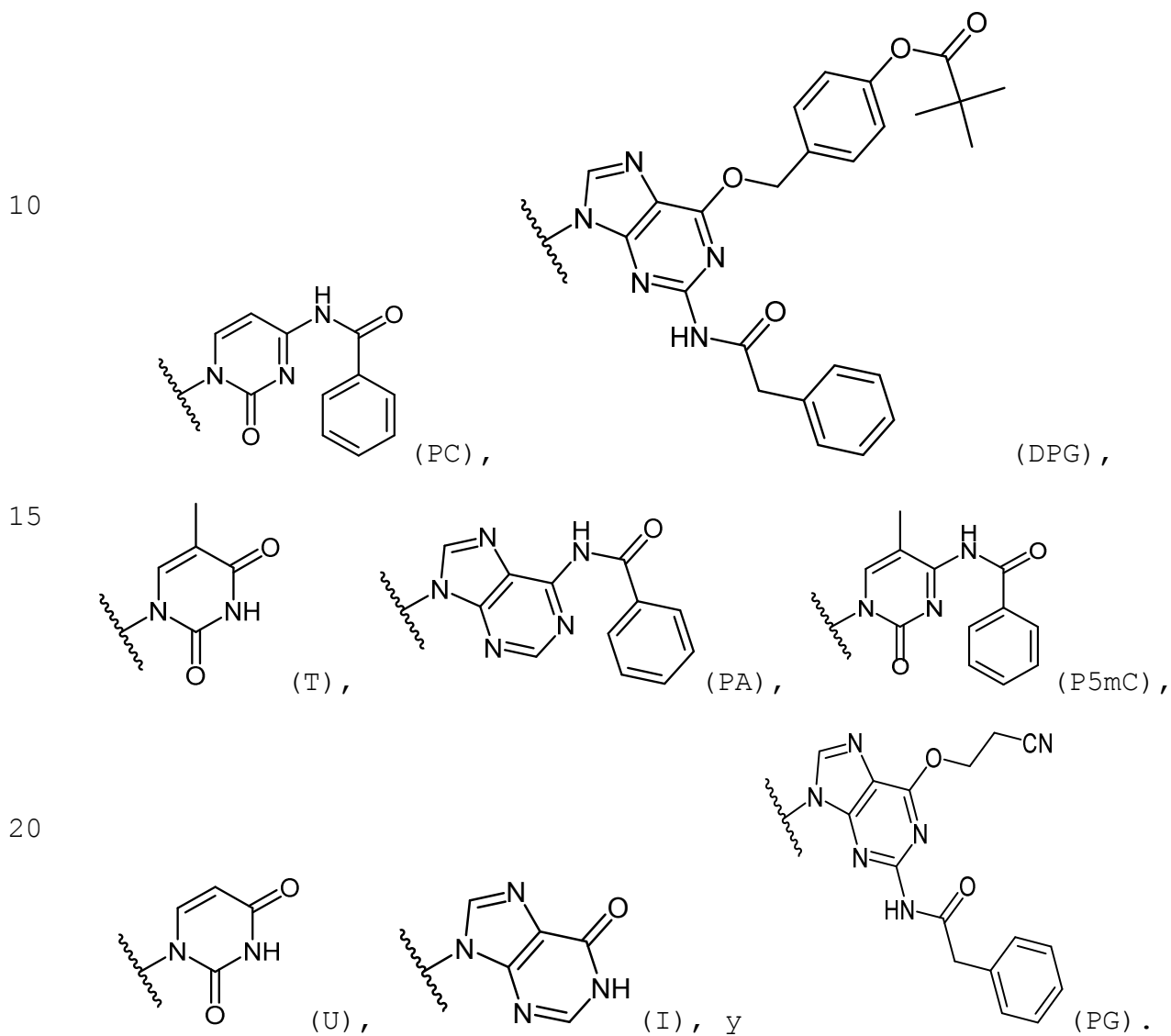
(A10),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

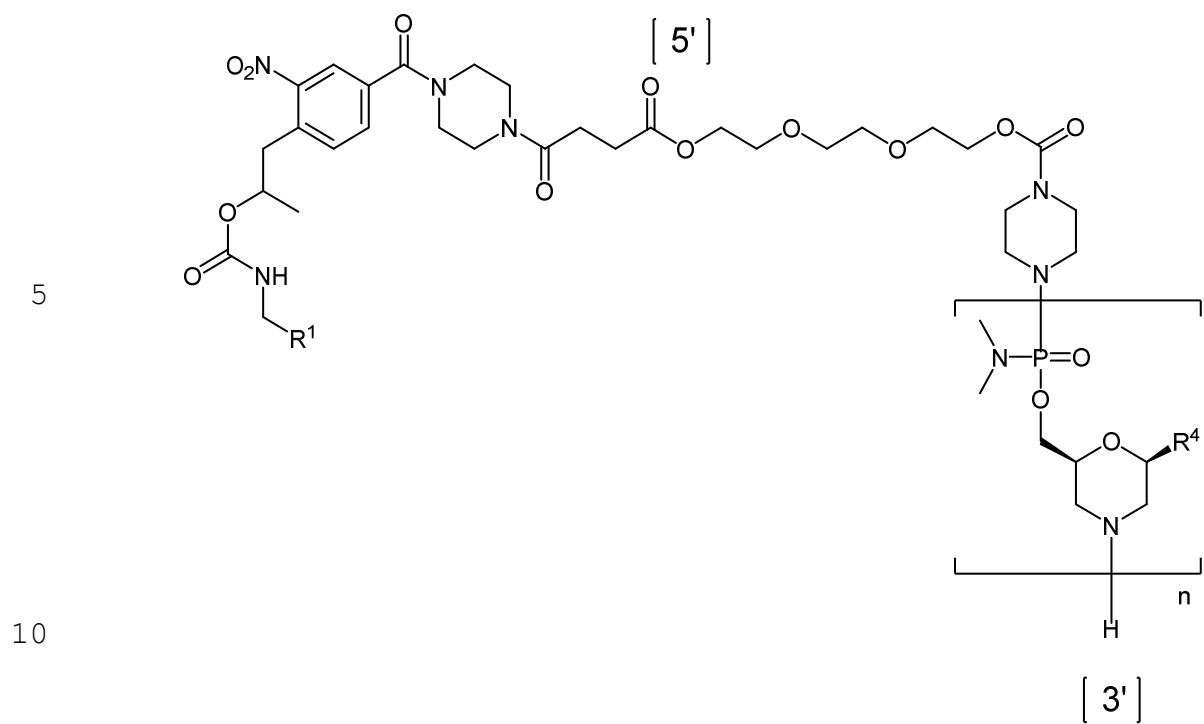
n es un número entero desde 10 a 40;

R¹ es un medio de soporte; y

5 R⁴, independientemente en cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:



En una modalidad, el compuesto de Fórmula (A10) es
25 de Fórmula (A10a):



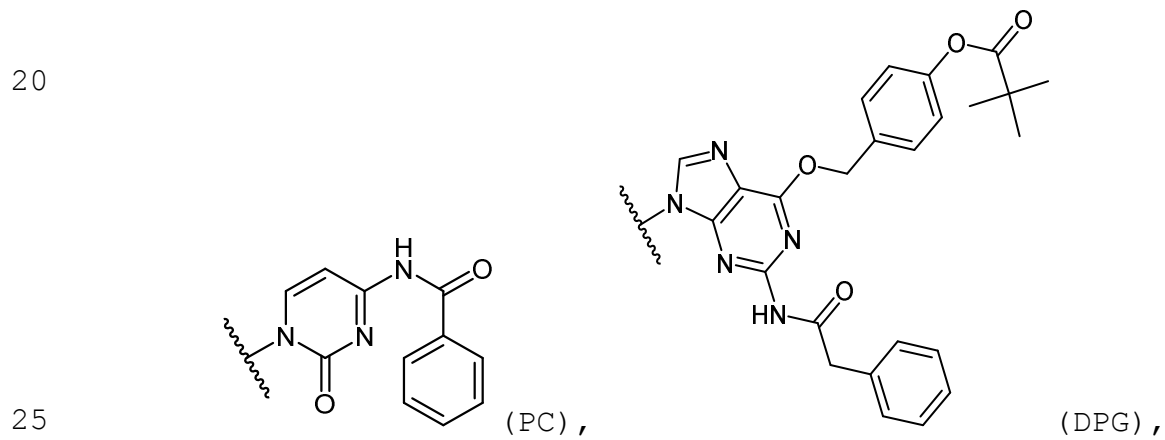
(A10a),

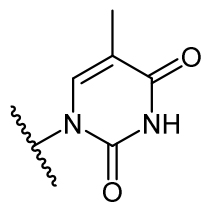
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en
donde:

15 n es un número entero desde 10 a 40;

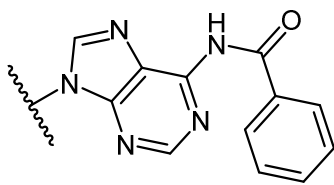
R¹ es un medio de soporte; y

R⁴, independientemente en cada aparición, se
selecciona del grupo que consiste de:

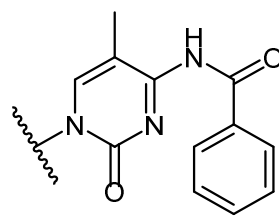




(T) ,

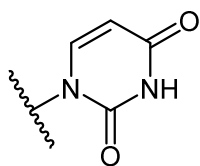


(PA) ,

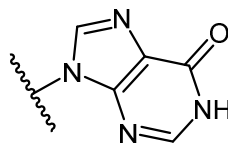


(P5mC) ,

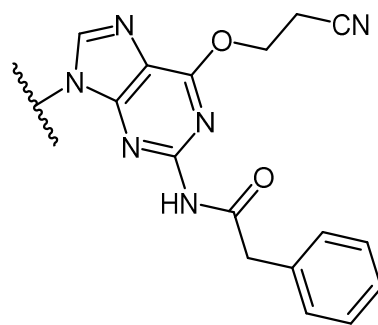
5



(U) ,



(I) , y



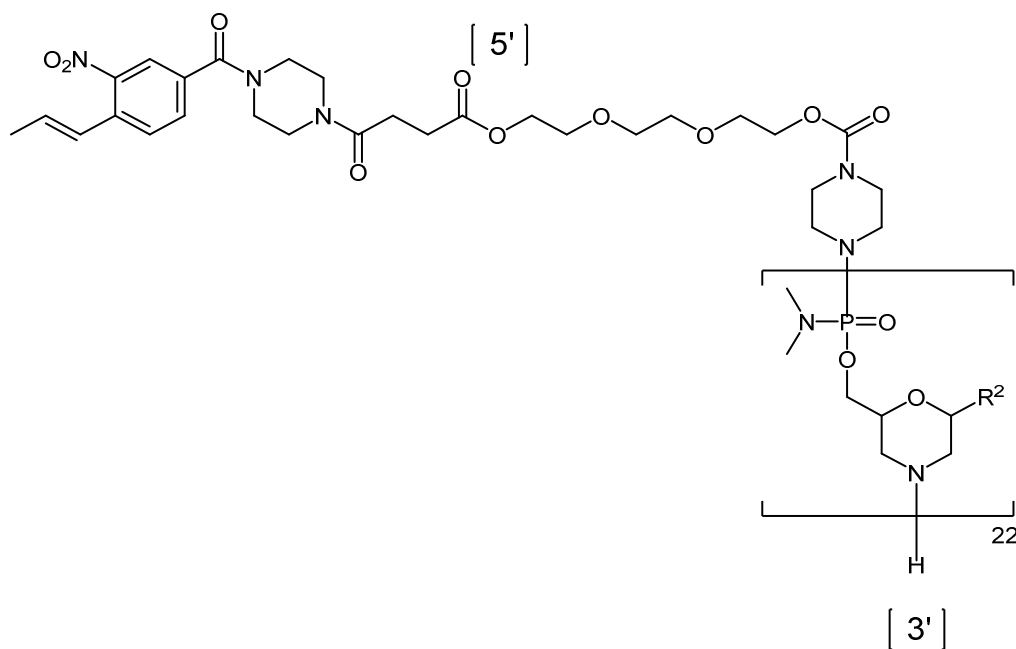
(PG) .

10

En otra modalidad de estos compuestos, el medio de soporte comprende poliestireno con 1% divinilbenceno reticulado.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un compuesto de Fórmula (XI):

15



20

25

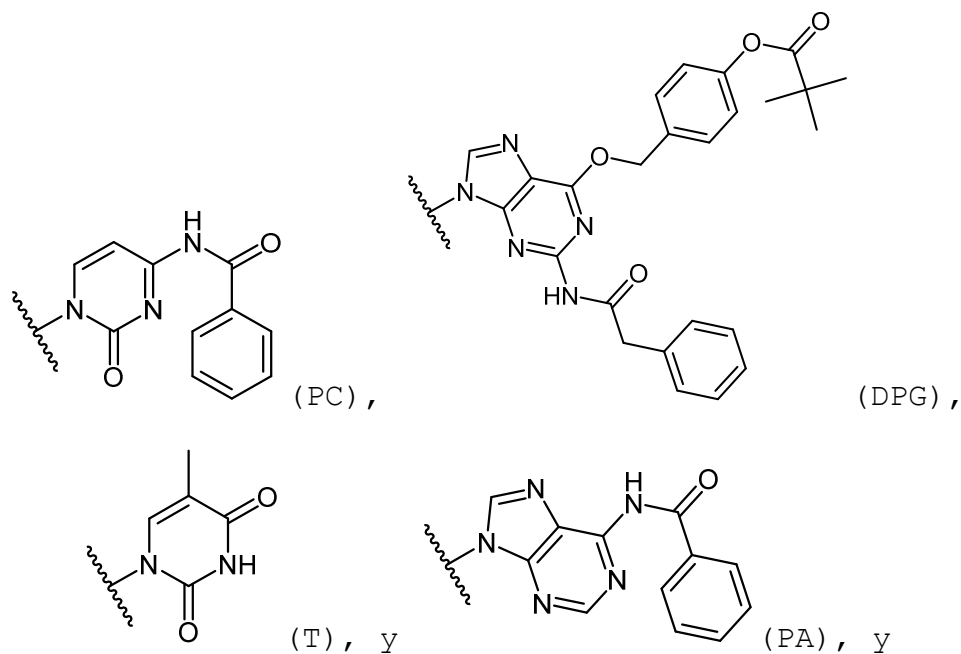
(XI) ,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^2 , independientemente en cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:

5

10



15

en donde R^2 en cada posición es desde 1 a 22 y 5' a

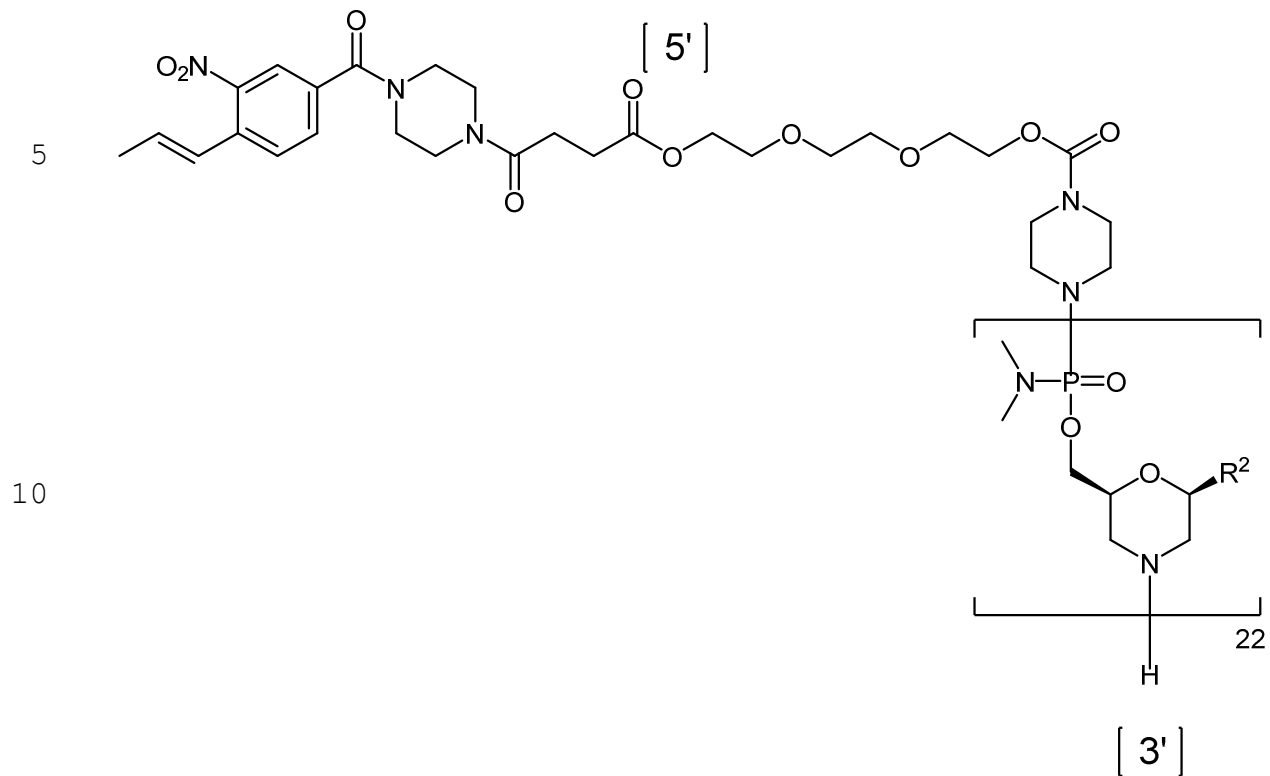
3' :

20

Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2
1	PC	11	PC	21	T
2	PA	12	T	22	DPG
3	PA	13	DPG		
4	T	14	DPG		
5	DPG	15	PA		
6	PC	16	DPG		
7	PC	17	T		
8	PA	18	T		
9	T	19	PC		
10	PC	20	PC		

25

En una modalidad, el compuesto de Fórmula (XI) es de
Fórmula (XIa):

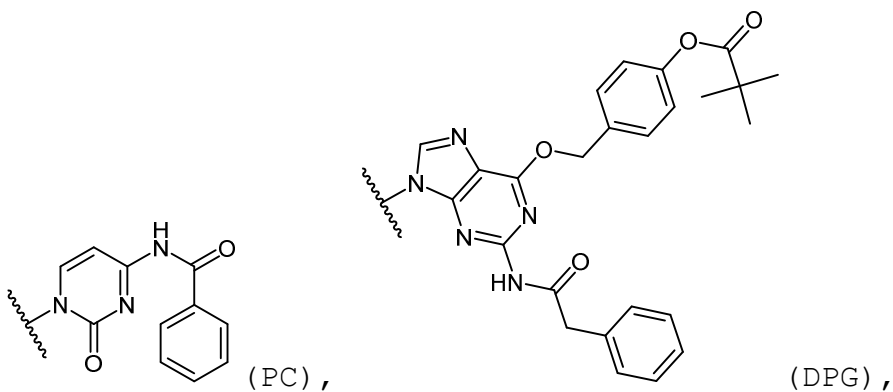


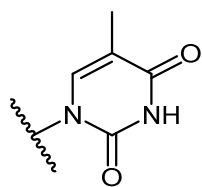
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en
donde

R^2 , independientemente en cada aparición, se
selecciona del grupo que consiste de:

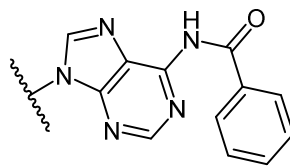
20

25





(T), y



(PA), y

en donde R^2 en cada posición es desde 1 a 22 y 5' a

5

3' :

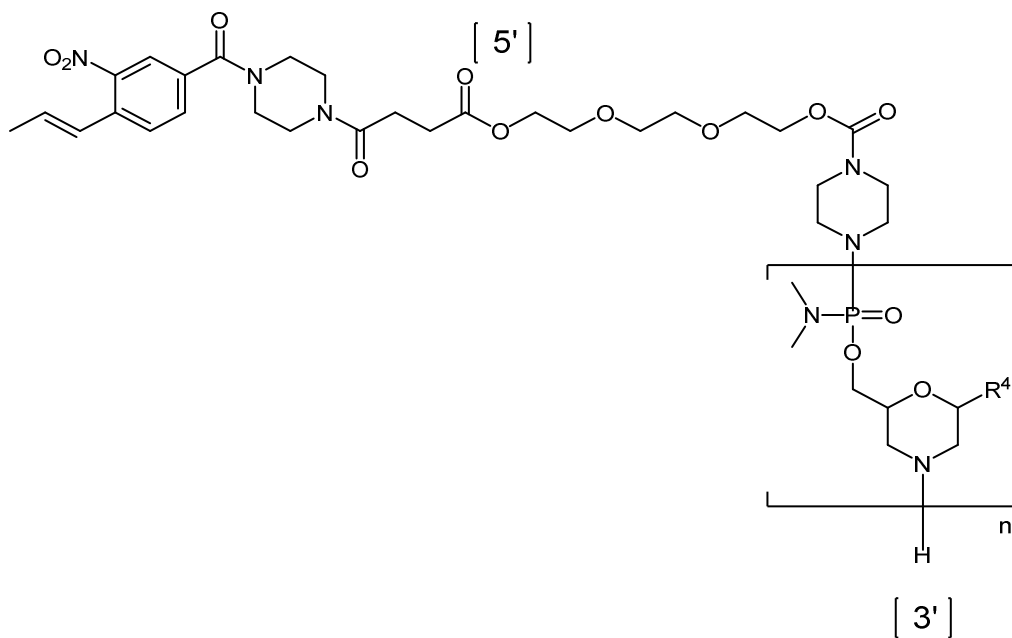
Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2	Posición No. 5' a 3'	R^2
1	PC	11	PC	21	T
2	PA	12	T	22	DPG
3	PA	13	DPG		
4	T	14	DPG		
5	DPG	15	PA		
6	PC	16	DPG		
7	PC	17	T		
8	PA	18	T		
9	T	19	PC		
10	PC	20	PC		

10

En otro aspecto, en la presente se proporciona un

compuesto de Fórmula (A11):

15



20

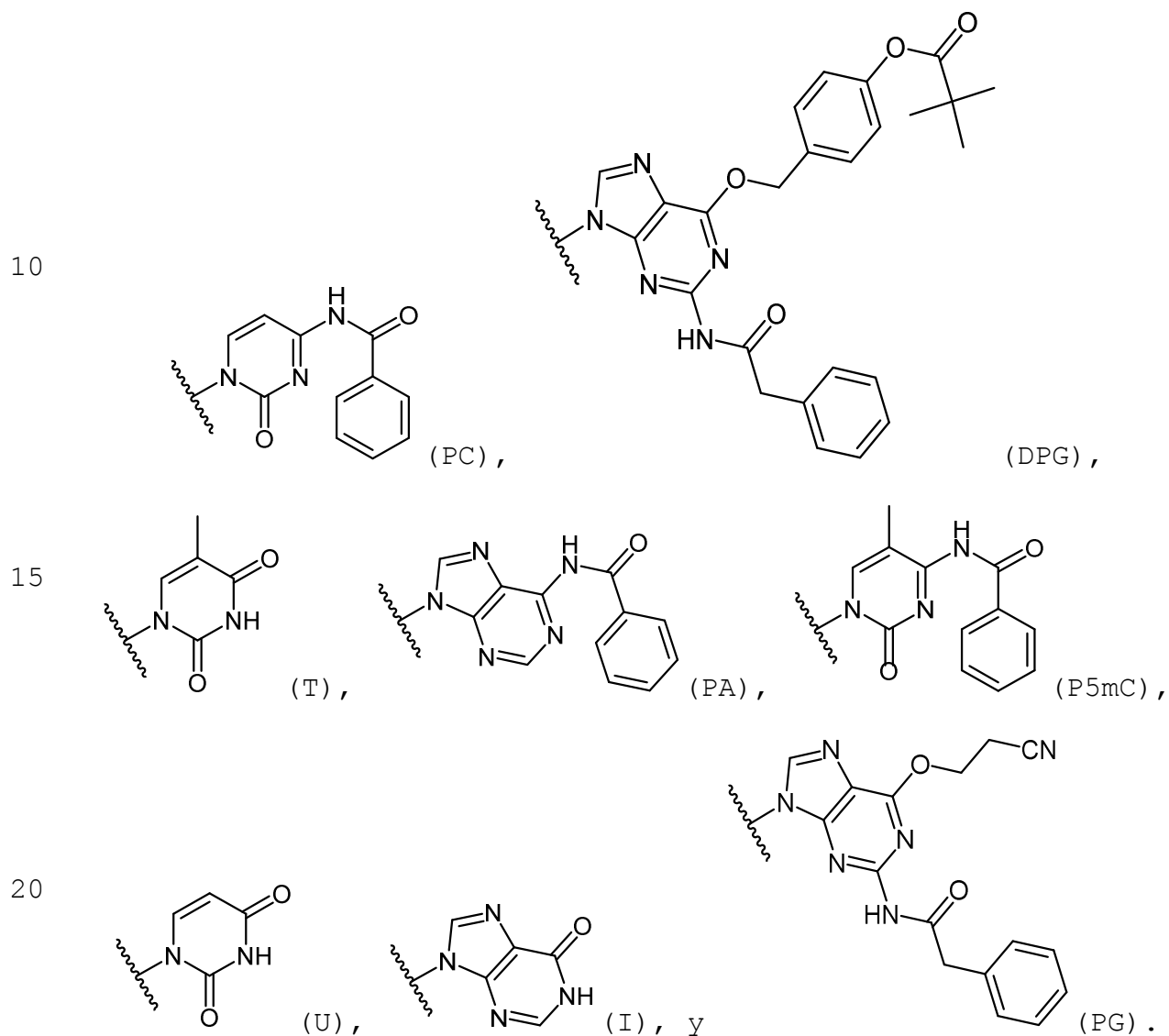
25

(A11),

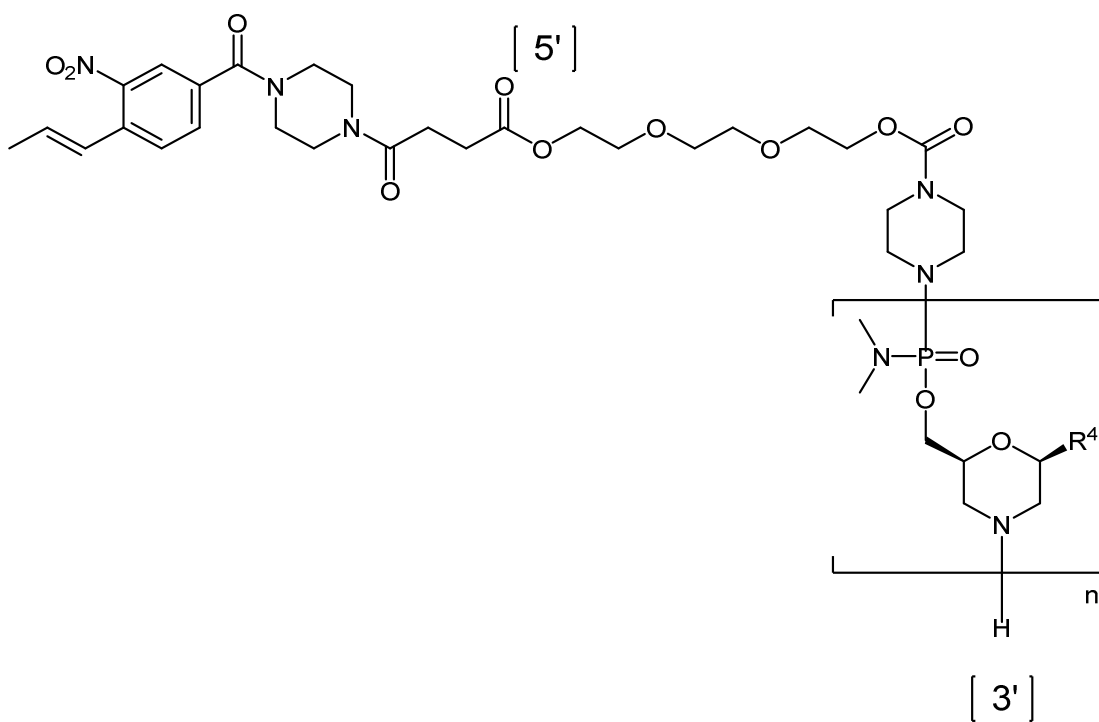
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

n es un número entero desde 10 a 40; y

R⁴, independientemente en cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:



En una modalidad, el compuesto de Fórmula (A11) es de Fórmula (A11a):



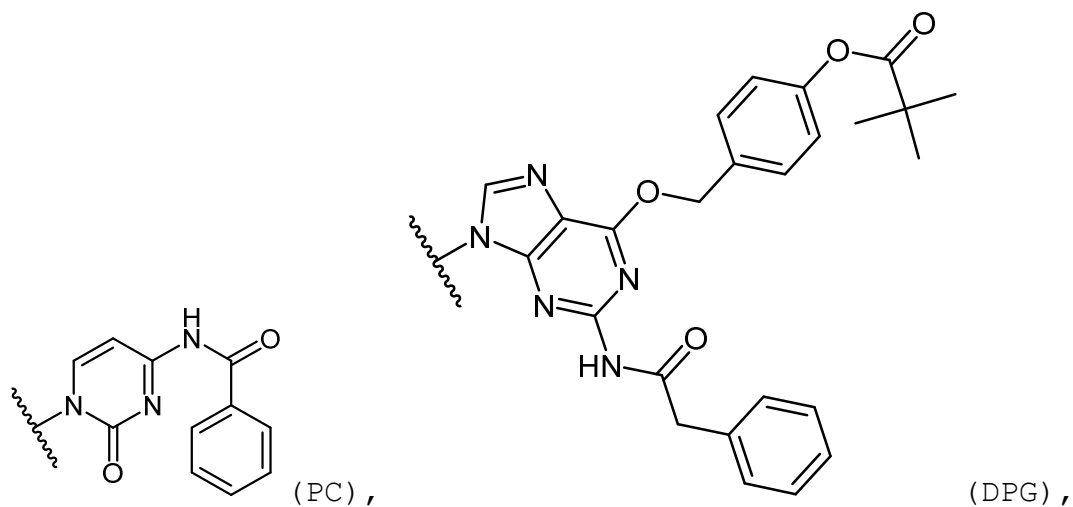
(A11a),

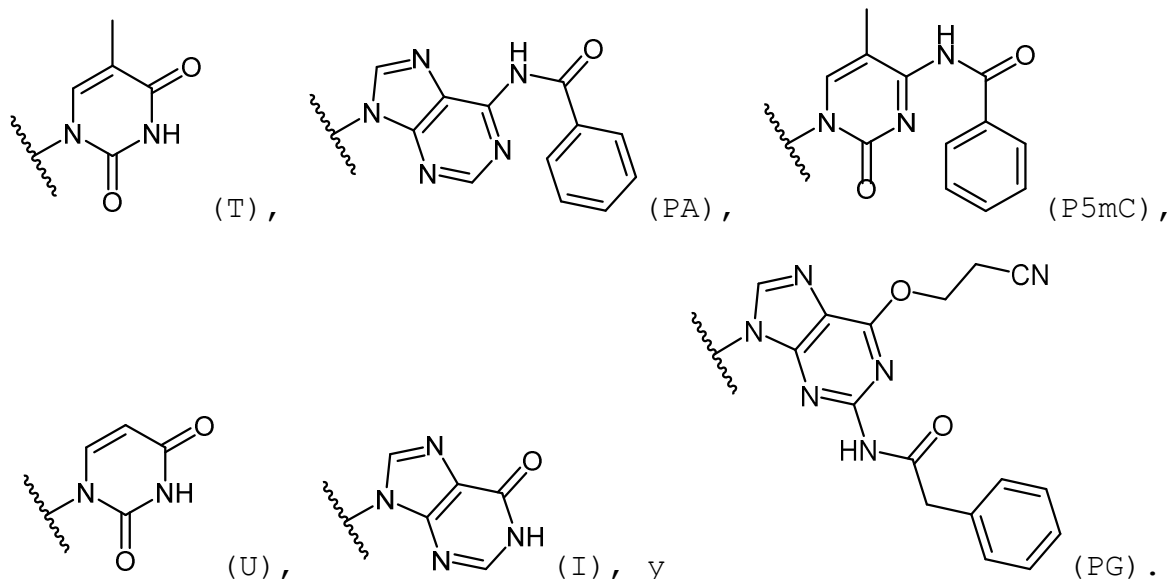
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en

donde:

n es un número entero desde 10 a 40; y

R⁴, independientemente en cada aparición, se selecciona del grupo que consiste de:





Oligómeros

Las propiedades importantes de subunidades a base de morfolino incluyen: 1) la capacidad de ser enlazadas en una forma oligomérica por enlaces de esqueleto estables, no cargados o positivamente cargados; 2) la capacidad de soportar una base de nucleótido (por ejemplo adenina, citosina, guanina, timidina, uracilo, 5-metil-citosina e hipoxantina) de modo que el polímero formado puede hibidarse con un ácido nucleico objetivo de base complementaria, incluyendo ARN objetivo; 3) la capacidad del oligómero para ser activa o pasivamente transportado en células de mamífero; y 4) la capacidad del oligómero y heterodúplex de oligómero:ARN para resistir la degradación de ARNsa y RNasa H, respectivamente.

En algunas modalidades, los oligómeros antisentido contienen modificaciones o sustituciones de base. Por ejemplo,

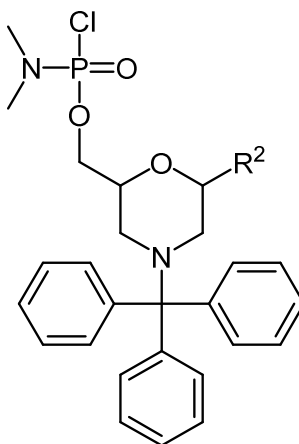
ciertas nucleobases se pueden seleccionar para aumentar la afinidad de unión de los oligómeros antisentido descritos en la presente. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad dúplex del ácido nucleico por 0.6-1.2°C, y se pueden incorporar en los oligómeros antisentido descritos en la presente. En una modalidad, al menos una base de pirimidina del oligómero comprende una base de pirimidina 5-sustituida, en donde la base de pirimidina se selecciona del grupo que consiste de citosina, timina y uracilo. En una modalidad, la base de pirimidina 5-sustituida es 5-metilcitosina. En otra modalidad, al menos una base de purina del oligómero comprende hipoxantina.

Los oligómeros a base de morfolino (incluyendo los oligómeros antisentido) se detallan, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,185,444, 5,521,063, 5,506,337, 8,299,206, y 8,076,476, Publicaciones de Solicitudes de Patentes Internacionales Nos. WO/2009/064471 y WO/2012/043730, y Summerton et al. (1997, Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 7, 187-195), cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

Los compuestos oligoméricos de la descripción pueden tener centros asimétricos, ejes quirales y planos quirales (como se describe, por ejemplo, en: E. L. Eliel and S. H. Wilen, Stereo-chemistry of Carbon Compounds, John Wiley & Sons, New

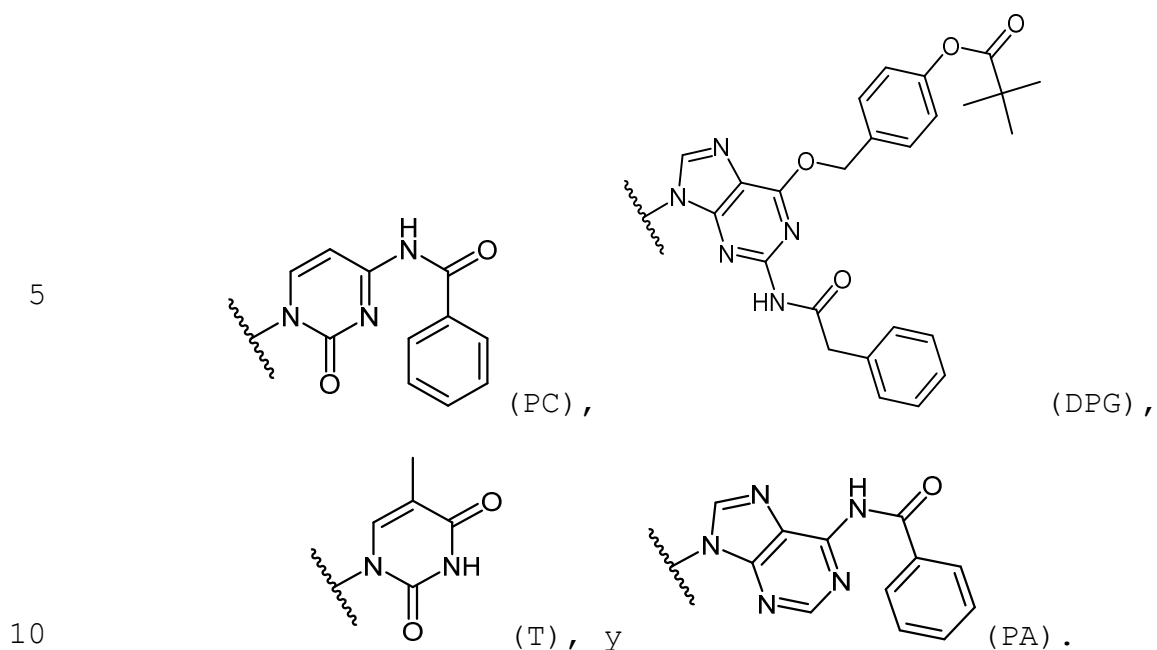
York, 1994, páginas 1119-1190, y March, J., Advanced Organic Chemistry, 3d. Ed., Chap. 4, John Wiley & Sons, New York (1985)), y pueden presentarse como racematos, mezclas racémicas y como diastereómeros individuales, con todos los posibles isómeros y mezclas de los mismos, incluyendo isómeros ópticos. Los compuestos oligoméricos de la descripción específicamente mencionados en la presente, sin alguna indicación de su estereoquímica, se destinan a representar todos los posibles isómeros y mezclas de los mismos.

Específicamente, sin desear estar limitado a cualquier teoría particular, los compuestos oligoméricos de la descripción se prepararon, como se discute en la presente, a partir de las subunidades de morfolino activadas incluyendo tales ejemplos no limitantes tal como un compuesto de Fórmula (VIII):

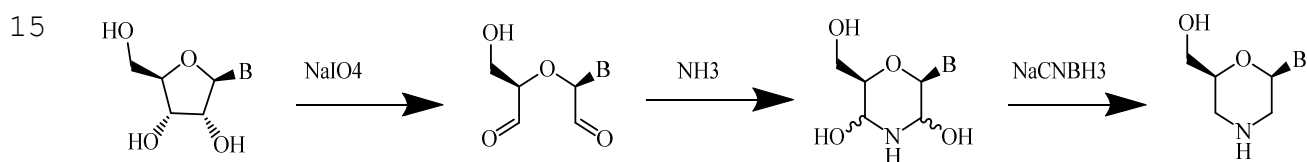


(VIII);

en donde R^2 , independientemente de cada compuesto de Fórmula (VIII), se selecciona del grupo que consiste de:



Cada uno de los compuestos mencionados anteriormente de Fórmula (VIII), se pueden preparar, por ejemplo, a partir del correspondiente beta-D-ribofuranosilo como se representa a continuación:



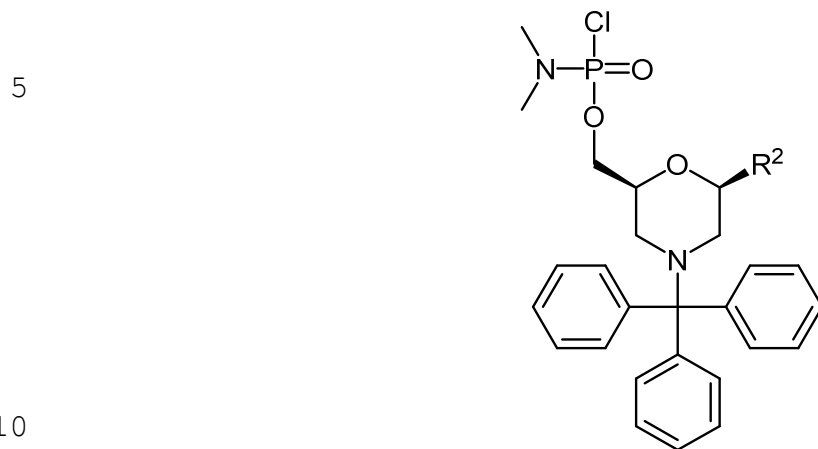
Ver Summerton et al., Antisense & Nucleic Acid Drug Dev. 7:187-195 (1997). Sin desear estar vinculado a cualquier

20 teoría particular, la estereoquímica de los dos carbonos quirales es retenida bajo las condiciones de síntesis de manera que un número de posibles estereoisómeros de cada subunidad de morfolino se puede producir con base en la selección de, por ejemplo, un material de partida alfa-L-ribofuranosilo, alfa-D-ribofuranosilo,

25 ribofuranosilo, beta-L-ribofuranosilo, o beta-D-

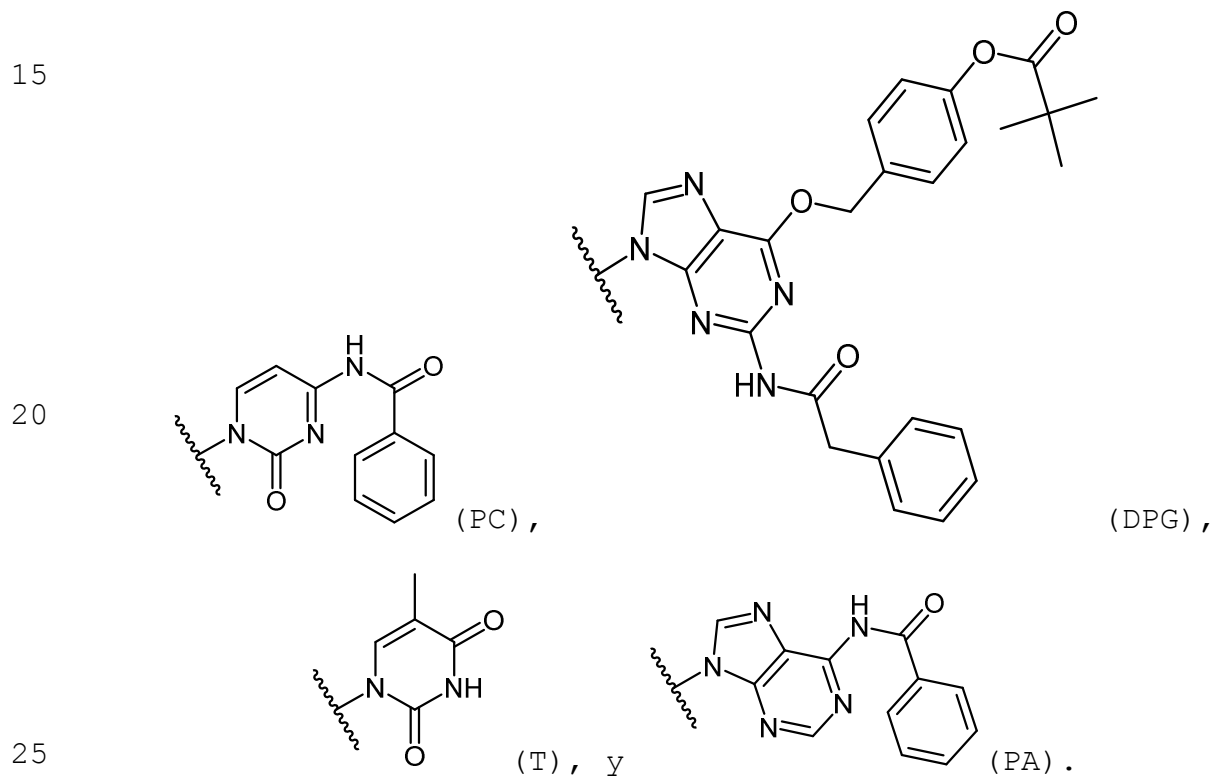
ribofuranosilo.

Por ejemplo, en algunas modalidades, un compuesto de
Fórmula (VIII) de la descripción puede ser de Fórmula (VIIIa):



(VIIIa);

en donde R^2 , independientemente de cada compuesto de
Fórmula (VIIIa), se selecciona del grupo que consiste de:



Sin desear estar vinculado a cualquier teoría particular, la incorporación de 10 a 40 compuestos de Fórmula (VIII), por ejemplo, en un compuesto oligomérico de la descripción puede resultar en numerosos posibles
5 estereoisómeros.

Sin desear estar vinculado a cualquier teoría particular, los compuestos oligoméricos de la descripción comprenden una o más intersubunidades que contienen fosforo, las cuales crean un centro quiral en cada fosforo, cada uno de
10 los cuales se designa ya sea como una configuración "Sp" o "Rp" como se entiende en la técnica. Sin desear estar vinculado a cualquier teoría particular, esta quiralidad crea estereoisómeros, los cuales tienen una composición química idéntica pero diferente arreglo tridimensional de sus átomos.

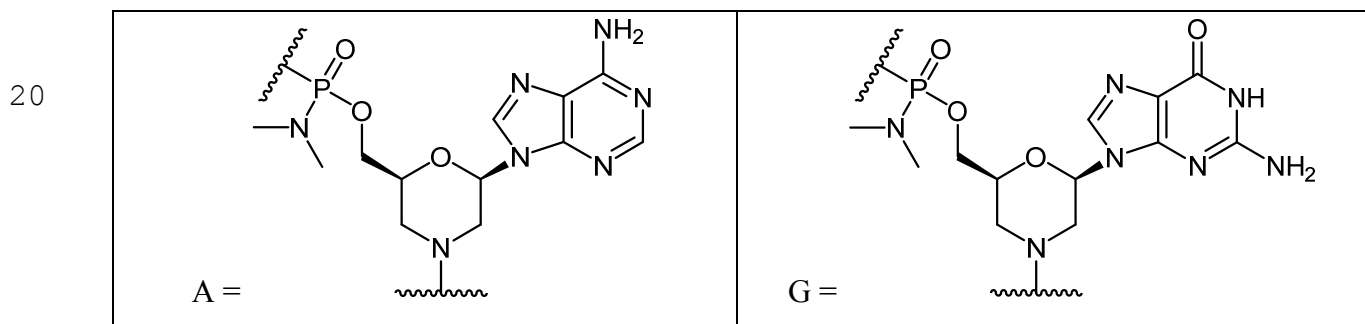
15 Sin desear estar vinculado a cualquier teoría particular, la configuración de cada enlace de intersubunidad de fosforo se presenta aleatoriamente durante la síntesis de, por ejemplo, compuestos oligoméricos de la descripción. Sin desear estar vinculado a cualquier teoría particular, el
20 proceso de síntesis genera un número exponencialmente grande de estereoisómeros de un compuesto oligomérico de la descripción debido a que los compuestos oligoméricos de la descripción están comprendidos de numerosos enlaces de intersubunidad de fosforo - con cada enlace de intersubunidad
25 de fosforo teniendo una configuración quiral aleatoria.

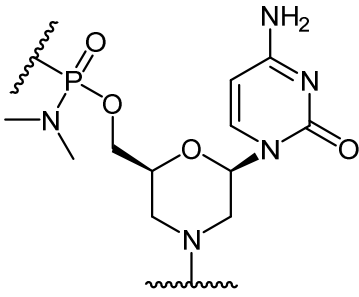
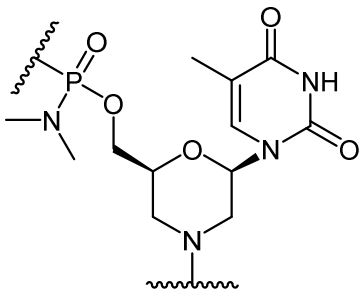
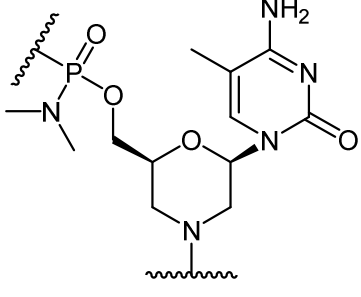
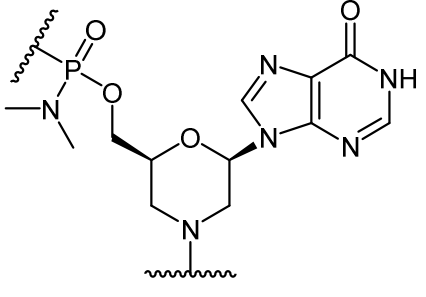
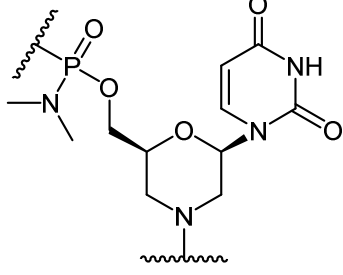
Específicamente, sin desear estar vinculado a cualquier teoría particular, cada enlace de intersubunidad de una subunidad de morfolino adicional duplica el número de estereoisómeros del producto, de modo que una preparación convencional de un
 5 compuesto oligomérico de la descripción es de hecho una mezcla altamente heterogénea de 2^N estereoisómeros, donde N representa el número de enlaces de intersubunidad de fosforo.

Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario, tales isómeros, incluyendo mezclas diastereoméricas y
 10 enantioméricas y enantiómeros y diastereómeros puros se incluyen tal como, por ejemplo, cuando uno o más enlaces de uno o más estereocentros se indica por "-" o "~" o un equivalente como se entendería en la técnica.

La Tabla 1 representa varias modalidades de subunidades de morfolino proporcionas en los procesos descritos
 15 en la presente.

Tabla 1: Diversas modalidades de subunidades de morfolino.



5	 C =	 T =
10	 5-Me-C =	 I =
15	 U =	

EJEMPLOS

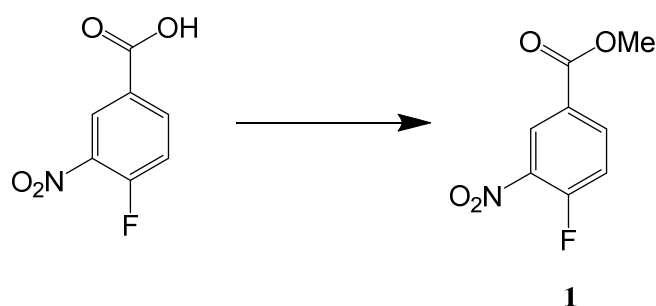
Los ejemplos se han descrito a continuación para el propósito de ilustración y para describir ciertas modalidades específicas de la descripción. Sin embargo, el alcance de las reivindicaciones de ninguna manera será limitado por los ejemplos descritos en la presente. Varios cambios y modificaciones a las modalidades descritas serán evidentes para los expertos en la técnica y tales cambios y modificaciones incluyendo, sin limitación, los relacionados con las estructuras, sustituyentes, derivados, formulaciones o métodos

químicos de la descripción se pueden realizar sin apartarse del espíritu de la descripción y el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Las definiciones de las variables en las estructuras en los esquemas de reacción son acordes con las de las
5 posiciones correspondientes en las fórmulas presentadas en la presente.

Ejemplo 1: Síntesis de Anclaje de NCP2

1. Preparación de 4-Fluoro-3-Nitrobenzoato de metilo (1)

10



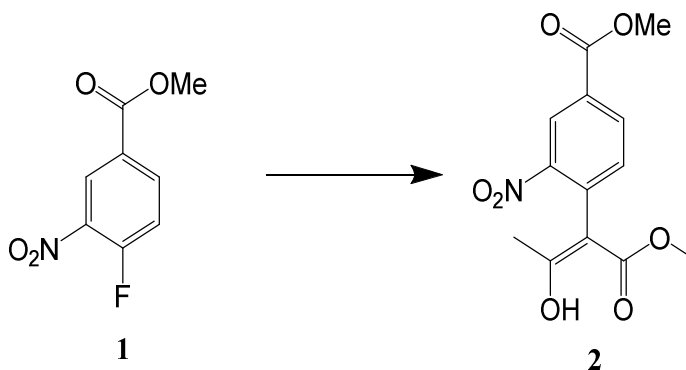
15

A un matraz de 100 L se cargaron 12.7 kg de ácido 4-fluoro-3-nitrobenzoico, se añadieron 40 kg de metanol y 2.82 kg de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se agitó a reflujo (65° C) durante 36 horas. La mezcla de reacción se enfrió a 0° C. Se formaron cristales a 38° C. La mezcla se mantuvo a 0° C
20 durante 4 hrs, luego se filtró bajo nitrógeno. El matraz de 100 L se lavó y la torta de filtro se lavó con 10 kg de metanol que se había enfriado a 0° C. La torta de filtro sólida se secó en el embudo durante 1 hora, se transfirió a bandejas y se secó en un horno de vacío a temperatura ambiente a un peso constante
25 de 13.695 kg de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo (100% de

rendimiento; HPLC 99%).

2. Preparación de Ácido 3-Nitro-4-(2-oxopropil)benzoico

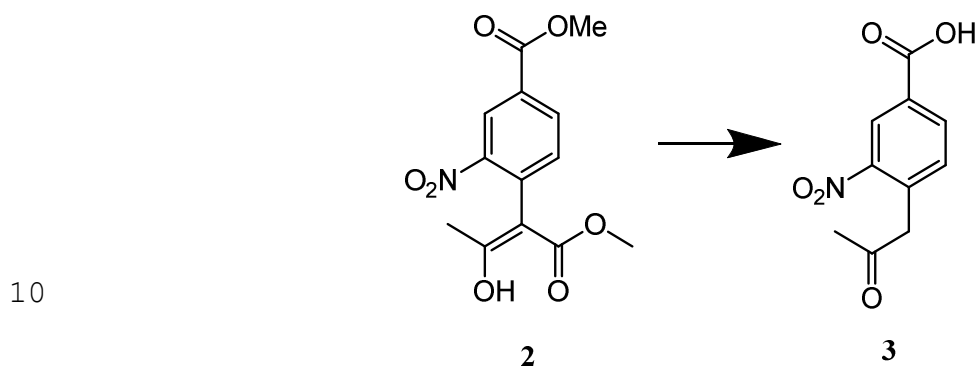
A. (Z)-4-(3-Hidroxi-1-Metoxi-1-Oxobut-2-en-2-il)-3-Nitrobenzoato de Metilo (**2**)



A un matraz de 100 L se cargaron 3.98 kg de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo (**1**) de la etapa previa, 9.8 kg de DMF, 2.81 kg de acetoacetato de metilo. La mezcla se agitó y se enfrió a 0° C. A esto se añadieron 3.66 kg de DBU durante aproximadamente 4 horas mientras la temperatura se mantuvo a o por debajo de 5° C. La mezcla se agitó 1 hora adicional. Al matraz de reacción se añadió una solución de 8.15 kg de ácido cítrico en 37.5 kg de agua purificada mientras la temperatura de reacción se mantuvo a o por debajo de 15° C. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó unos 30 minutos adicionales, luego se filtró bajo nitrógeno. La torta de filtro húmeda se regresó al matraz de 100 L junto con 14.8 kg de agua purificada. La lechada se agitó durante 10 minutos, luego se filtró. La torta húmeda de nuevo se regresó al matraz de 100

L, se formó en lechada con 14.8 kg de agua purificada durante 10 minutos, y se filtró a (Z)-4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoato de metilo crudo.

5 B. Ácido 3-Nitro-4-(2-oxopropil)benzoico



El (Z)-4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoato de metilo crudo se cargó a un matraz de reacción de 100 L bajo nitrógeno. A esto se añadieron 14.2 kg de 1,4-dioxano y luego se agitó. A la mezcla se añadió una solución de 16.655 kg de HCl concentrado y 13.33 kg de agua purificada (HCl 6M) durante 2 horas mientras la temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo por debajo de 15° C. Cuando la adición se completó, la mezcla de reacción se calentó a reflujo (80° C) durante 24 horas, se enfrió a temperatura ambiente, y se filtró bajo nitrógeno. La torta de filtro sólida se trituró con 14.8 kg de agua purificada, se filtró, se trituró de nuevo con 14.8 kg de agua purificada, y se filtró. El sólido se regresó al matraz de 100 L con 39.9 kg de DCM y se sometió a reflujo con agitación durante 1 hora. Se añadieron 1.5 kg de agua

15

20

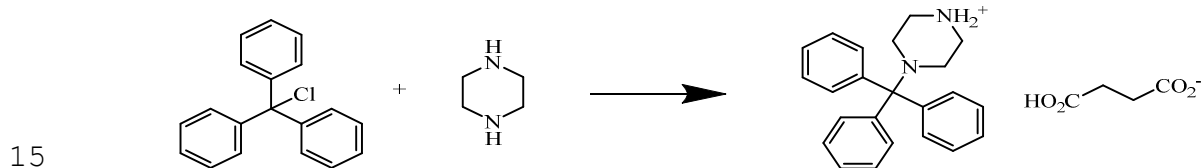
25

purificada para disolver los sólidos remanentes. La capa orgánica inferior se dividió a un matraz precalentado de 72 L, luego se regresó a un matraz limpio y seco de 100 L. La solución se enfrió a 0° C, se mantuvo durante 1 hora, luego se filtró.

5 La torta de filtro sólida se lavó dos veces cada una con una solución de 9.8 kg de DCM y 5 kg de heptano, luego se secó en el embudo. El sólido se transfirió a bandejas y se secó a un peso constante de 1.855 kg de Ácido 3-Nitro-4-(2-oxopropil)benzoico. Rendimiento general de 42% del compuesto

10 **1.** HPLC 99.45%.

3. Preparación de Succinato de N-Tritilpiperazina (NTP)



A un matraz encamisado de 72 L se cargaron bajo nitrógeno 1.805 kg de cloruro de trifenilmetilo y 8.3 kg de tolueno (Solución de TPC). La mezcla se agitó hasta que los sólidos se disolvieron. A un matraz de reacción encamisado de

20 100 L se añadieron bajo nitrógeno 5.61 kg de piperazina, 19.9 kg de tolueno, y 3.72 kg de metanol. La mezcla se agitó y se enfrió a 0° C. A esto se añadió lentamente en porciones la solución de TPC durante 4 horas mientras la temperatura de reacción se mantuvo a o por debajo de 10° C. La mezcla se agitó

25 durante 1.5 horas a 10° C, luego se dejó calentar a 14° C. Se

cargaron 32.6 kg de agua purificada al matraz de 72 L, luego se transfirió al matraz de 100 L mientras la temperatura interna del lote se mantuvo a $20 \pm 5^\circ \text{C}$. Las capas se dejaron dividir y la capa acuosa inferior se separó y se almacenó. La capa orgánica se extrajo tres veces con 32 kg de agua purificada cada una, y las capas acuosas se separaron y combinaron con la solución acuosa almacenada.

La capa orgánica restante se enfrió a 18°C y una solución de 847 g de ácido succínico en 10.87 kg de agua purificada se añadió lentamente en porciones a la capa orgánica. La mezcla se agitó durante 1.75 horas a $20 \pm 5^\circ \text{C}$. La mezcla se filtró, y los sólidos se lavaron con 2 kg de TBME y 2 kg de acetona, luego se secaron en el embudo. La torta de filtro se trituro dos veces con 5.7 kg cada una de acetona y se filtró y se lavó con 1 kg de acetona entre las trituraciones. El sólido se secó en el embudo, luego se transfirió a bandejas y se secó en un horno de vacío a temperatura ambiente a un peso constante de 2.32 kg de NTP. Rendimiento de 80%.

4. Preparación de (4-(2-Hidroxipropil)-3-Nitrofenil) (4-Tritilpiperazin-1-il)Metanona

A. Preparación de 1-(2-Nitro-4(4-Tritilpiperazin-1-Carbonil)Fenil)Propan-2-ona



15

20

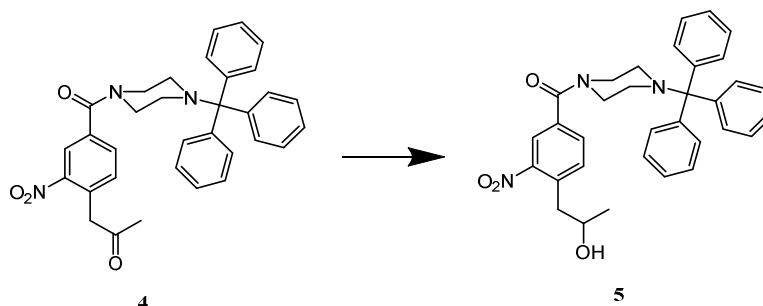
25

evaporaron en un evaporador rotatorio. Se añadieron 4.8 kg de THF al residuo y luego se evaporó en el evaporador rotatorio hasta que se lograron 2.5 volúmenes de la 1-(2-nitro-4(4-tritilpiperazin-1-carbonil)fenil)propan-2-ona cruda en THF.

5

B. Preparación de (4-(2-Hidroxipropil)-3-Nitrofenil) (4-Tritilpiperazin-1-il)Metanona (**5**)

10



15

20

25

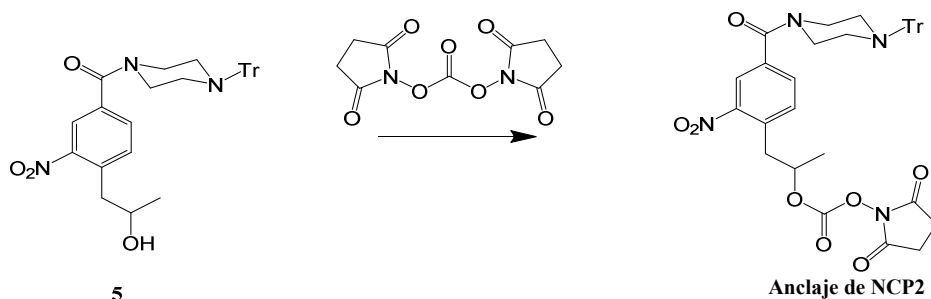
A un matraz encamisado de 100 L se cargaron bajo nitrógeno 3600 g de **4** de la etapa previa y 9800 g de THF. La solución agitada se enfrió to $\leq 5^{\circ}\text{C}$. La solución se diluyó con 11525 g de etanol y se añadieron 194 g de borohidruro de sodio durante aproximadamente 2 horas a $\leq 5^{\circ}\text{C}$. La mezcla de reacción se agitó unas 2 horas adicionales a $\leq 5^{\circ}\text{C}$. La reacción se apagó con una solución de aproximadamente 1.1 kg de cloruro de amonio en aproximadamente 3 kg de agua por adición lenta para mantener la temperatura a $\leq 10^{\circ}\text{C}$. La mezcla de reacción se agitó unos 30 minutos adicionales, se filtró para remover los inorgánicos, y se recargó a un matraz encamisado de 100 L y se extrajo con 23 kg de DCM. La capa orgánica se separó y lo acuoso se extrajo dos veces más con 4.7 kg de DCM cada una. Las capas orgánicas

combinadas se lavaron con una solución de aproximadamente 800 g de cloruro de sodio en aproximadamente 3 kg de agua, luego se secaron sobre 2.7 kg de sulfato de sodio. La suspensión se filtró y la torta de filtro se lavó con 2 kg de DCM. Los
 5 filtrados combinados se concentraron a 2.0 volúmenes, se diluyeron con aproximadamente 360 g de acetato de etilo, y se evaporaron. El producto crudo se cargó sobre una columna de gel de sílice de 4 kg de sílice empacada con DCM bajo nitrógeno y se eluyó con 2.3 kg acetato de etilo en 7.2 kg de DCM. Las
 10 fracciones combinadas se evaporaron y el residuo se recuperó en 11.7 kg de tolueno. La solución de tolueno se filtró y la torta de filtro se lavó dos veces con 2 kg de tolueno cada una. La torta de filtro se secó a un peso constante de 2.275 kg de compuesto **5** (46% de rendimiento del compuesto **3**) HPLC 96.99%.

15

5. Preparación de 2,5-Dioxopirrolidin-1-il(1-(2-Nitro-4-(4-trifenilmetilpiperazin-1 Carbonil)Fenil)Propan-2-il)Carbonato
(Anclaje de NCP2)

20



A un matraz encamisado de 100 L se cargaron bajo
 25 nitrógeno 4.3 kg de compuesto **5** (el peso se ajustó con base en

el tolueno residual por ^1H NMR; todos los reactivos aquí después se escalaron por consiguiente) y 12.7 kg de piridina. A esto se cargaron 3.160 kg de DSC (78.91% en peso por ^1H NMR) mientras que la temperatura interna se mantuvo a $\leq 35^\circ\text{C}$. La mezcla de
5 reacción se envejeció durante aproximadamente 22 horas a ambiente, luego se filtró. La torta de filtro se lavó con 200 g de piridina. En dos lotes, cada uno comprendiendo $\frac{1}{2}$ del volumen filtrado, el lavado de filtrado se cargó lentamente a un matraz encamisado de 100 L que contenía una solución de
10 aproximadamente 11 kg de ácido cítrico en aproximadamente 50 kg de agua y se agitó durante 30 minutos para permitir la precipitación de sólido. El sólido se recolectó con un embudo de filtro, se lavó dos veces con 4.3 kg de agua por lavado y se secó en el embudo de filtro bajo vacío.

15 Los sólidos combinados se cargaron a un matraz encamisado de 100 L y se disolvieron en 28 kg de DCM y se lavaron con una solución de 900 g de carbonato de potasio en 4.3 kg de agua. Después de 1 hora, las capas se dejaron separar y la capa acuosa se removi6. La capa orgánica se lavó con 10
20 kg de agua, se separó y se secó durante 3.5 kg de sulfato de sodio. El DCM se filtró, se evaporó y se secó bajo vacío a 6.16 kg de **anclaje de NCP2** (114% de rendimiento).

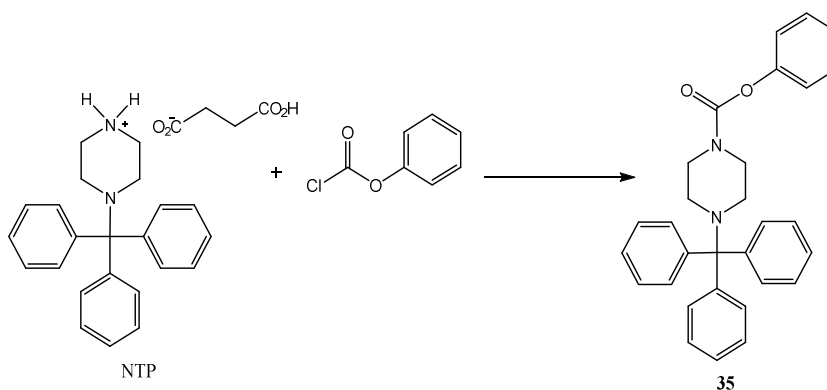
Ejemplo 2: Síntesis de Resina Cargada con Anclaje

25 A un reactor de síntesis de fase sólida de 75 L se

cargaron aproximadamente 52 L de NMP y 2600 g de resina de aminometil poliestireno. La resina se agitó en el NMP para hincharse durante aproximadamente 2 horas, luego se drenó. La resina se lavó dos veces con aproximadamente 39 L de DCM por lavado, luego dos veces con 39 L de Solución de Neutralización por lavado, luego dos veces con 39 L de DCM por lavado. La Solución de Anclaje de NCP2 se añadió lentamente a la solución de resina agitada, se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente, y se drenó. La resina se lavó cuatro veces con 39 L de NMP por lavado, y seis veces con 39 L de DCM por lavado. La resina se trató y se agitó con $\frac{1}{2}$ de la Solución de Terminación de Cadena DEDC durante 30 minutos, se drenó y se trató y se agitó con la 2ª $\frac{1}{2}$ de la Solución de Terminación de Cadena DEDC durante 30 minutos y se drenó. La resina se lavó seis veces con 39 L de DCM por lavado, luego se secó en un horno a peso constante de 3573.71 g de Resina Cargada con Anclaje.

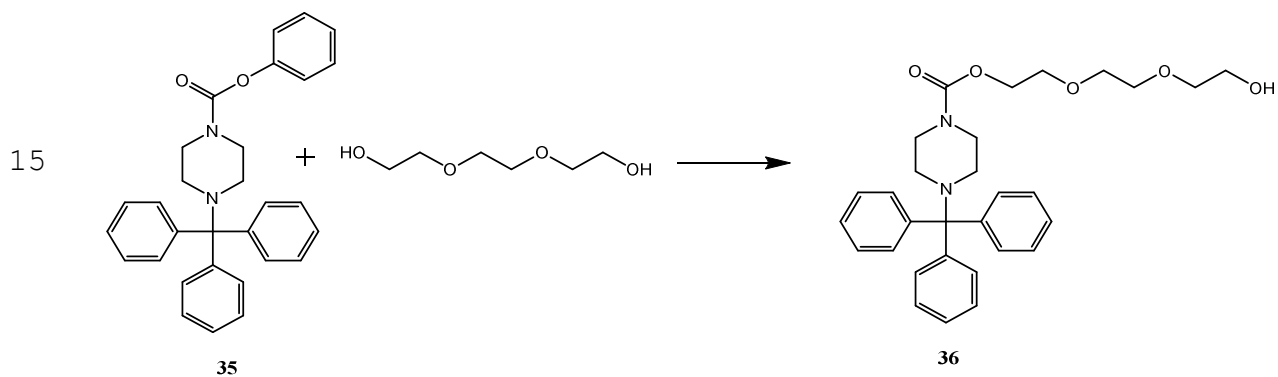
Ejemplo 3: Preparación de Cola de EG3 Activada

1. Preparación de Tritil Piperazin Fenil Carbamato (35)



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 cloroformiato de fenilo (1.03 eq) en diclorometano (2 g/g de cloroformiato de fenilo). La mezcla de reacción se calentó a 20°C. Tras la terminación de la reacción (1-2 hr), las capas se separaron. La capa orgánica se lavó con agua, y se secó sobre carbonato de potasio anhidro. El producto 35 se aisló por cristalización a partir de acetonitrilo. Rendimiento = 80%

2. Preparación de Alcohol Alcohol de Carbamato 36

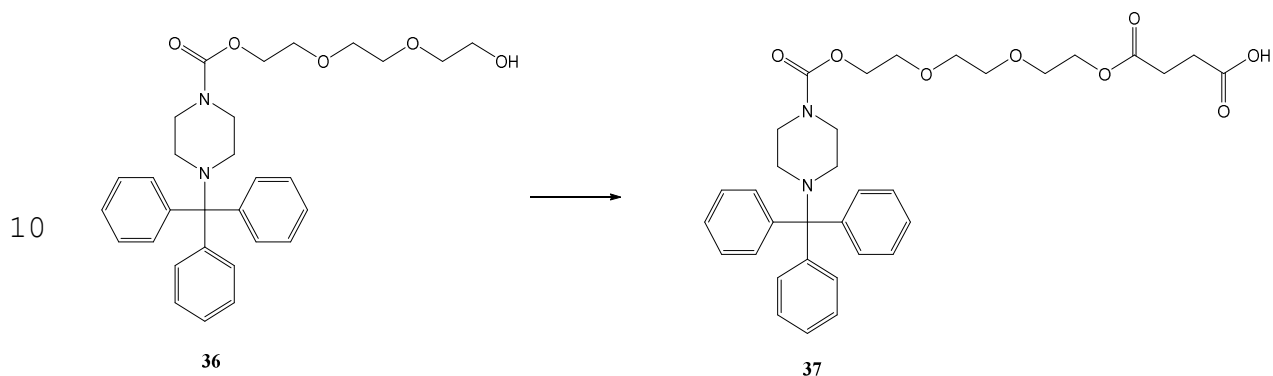


Anhídrido de sodio (1.2 eq) se suspendió en 1-metil-2-pirrolidinona (32 mL/g de hidruro de sodio). A esta suspensión se añadieron trietilenglicol (10.0 eq) y compuesto 35 (1.0 eq). La lechada resultante se calentó a 95° C. Tras la terminación de la reacción (1-2 hr), la mezcla se enfrió a 20° C. A esta mezcla, se añadió 30% diclorometano/metil terc-butil éter (v:v) y agua. La capa orgánica que contenía el producto se lavó

sucesivamente con NaOH acuoso, ácido succínico acuoso y cloruro de sodio acuoso saturado. El producto 36 se aisló por cristalización a partir de diclorometano/metil terc-butil éter/heptano. Rendimiento = 90%.

5

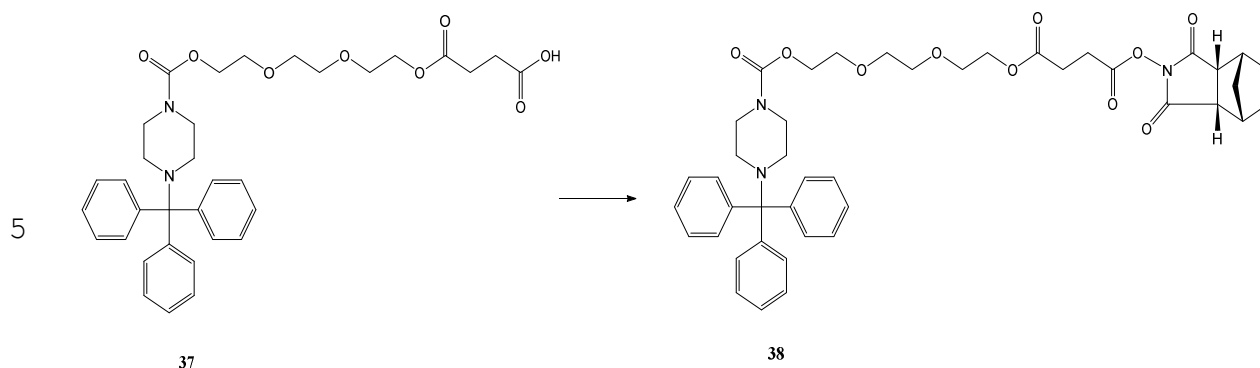
3. Preparación de Ácido de Cola de EG3 (37)



A una solución del compuesto 36 en tetrahidrofurano (7 mL/g 36) se añadió anhídrido succínico (2.0 eq) y DMAP (0.5
 15 eq). La mezcla se calentó a 50° C. Tras la terminación de la reacción (5 hr), la mezcla se enfrió a 20° C y se ajustó a pH 8.5 con NaHCO₃ acuoso. Se añadió metil terc-butil éter, 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
 20 orgánica que contenía el producto se lavó con una mezcla de amortiguador de citrato pH = 3 y cloruro de sodio acuoso saturado. Esta solución de diclorometano de 37 se utilizó sin aislamiento en la preparación del compuesto 38.

25

4. Preparación de Cola de EG3 Activada (38)



A la solución del compuesto 37 se añadió imida del ácido N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxílico (HONB) (1.02 eq), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (0.34 eq), y luego clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (1.1 eq). La mezcla se calentó a 55° C. Tras la terminación de la reacción (4-5 hr), 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 solvente con acetona y luego con N,N-dimetilformamida y el producto se aisló por precipitación a partir de acetona/N,N-dimetilformamida en cloruro de sodio acuoso saturado. El producto crudo se reformó en lechada varias veces en agua para remover la N,N-dimetilformamida residual y sales. Rendimiento = 70% de Cola de EG3 Activada 38 del compuesto 36.

10

15

20

**Ejemplo 4: Síntesis en Fase Sólida de 50 L de Sustancia
Farmacológica Cruda Casimersen [Compuesto Oligomérico (XII)]**

1. Materiales

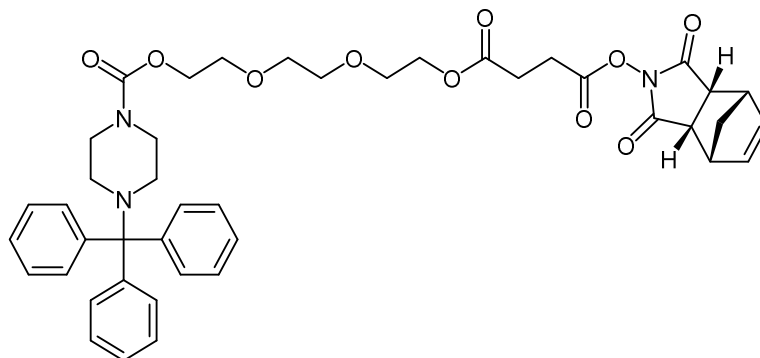
Tabla 2: Materiales de Partida

5	Nombre del Material	Nombre Químico	Número CAS	Fórmula Química	Peso Molecular
	Subunidad A Activada	Éster <i>N,N</i> -dimetil-, [6-[6-(benzoilamino)-9H-purin-9-il]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metílico del ácido fosforamidoclorídico	1155373-30-0	C ₃₈ H ₃₇ ClN ₇ O ₄ P	722.2
10	Subunidad C Activada	Éster <i>N,N</i> -dimetil-, [6-[4-(benzoilamino)-2-oxo-1(2H)-pirimidinil]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metílico del ácido fosforamidoclorídico	1155373-31-1	C ₃₇ H ₃₇ ClN ₅ O ₅ P	698.2
15	Subunidad DPG Activada	Éster 2,2-dimetil-, 4-[[[9-[6-[[[cloro(dimetilamino) fosfinil]oxi]metil]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]-2-[(2-fenilacetil)amino]-9H-purin-6-il]oxi]metil]fenílico del ácido propanoico	1155309-89-9	C ₅₁ H ₅₃ ClN ₇ O ₇ P	942.2
20	Subunidad T Activada	Fosforamidocloridic acid, Éster <i>N,N</i> -dimetil-, [6-(3,4-dihidro-5-metil-2,4-dioxo-1(2H)-pirimidinil)]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metílico del ácido fosforamidoclorídico	1155373-34-4	C ₃₁ H ₃₄ ClN ₄ O ₅ P	609.1
25	Cola de EG3 Activada	Éster 1-[3aR,4S,7R,7aS)-1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-1,3-dioxo-4,7-metano-2H-isoindol-2-il] 4-[2-[2-[2-[[[4-(trifenilmetil)-1-piperazinil]carbonil]oxi]etoxi]etoxi]etil] del ácido butanodioico	1380600-06-5	C ₄₃ H ₄₇ N ₃ O ₁₀	765.9

Estructuras Químicas de los Materiales de Partida:

A. Cola de EG3 Activada

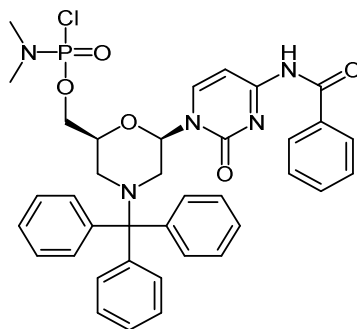
5



Compuesto (B)

- 10 B. Subunidad C Activada (Para la preparación, ver Patente de Estados Unidos No. 8,067,571)

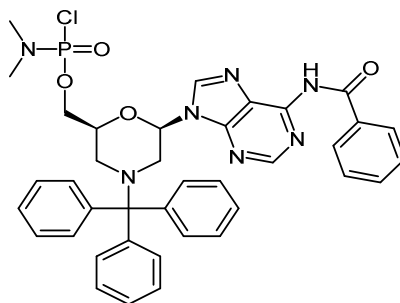
15



Compuesto de Fórmula (D1)

- C. Subunidad A Activada (Para la preparación, ver Patente de Estados Unidos No. 8,067,571)

20

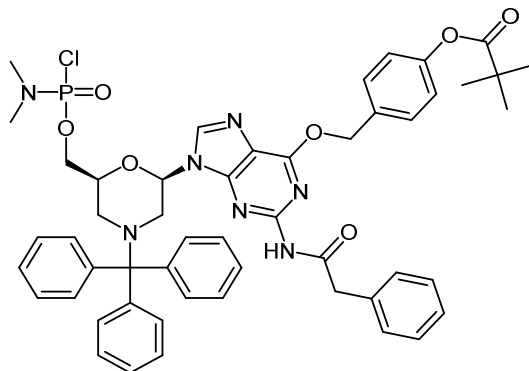


25

Compuesto de Fórmula (F1)

D. Subunidad DPG Activada (Para la preparación, ver WO 2009/064471)

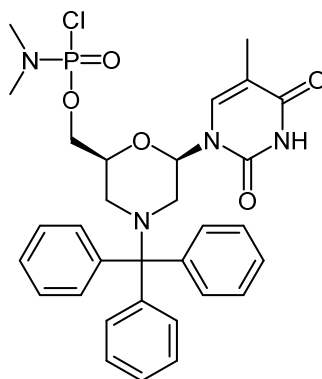
5



Compuesto (E1)

10 E. Subunidad T Activada (Para la preparación, ver WO 2013/082551)

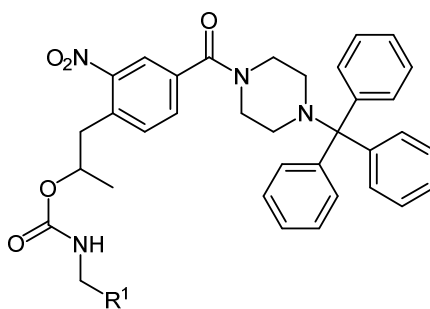
15



Compuesto (G1)

F. Resina Cargada con Anclaje

20



25

Formula (I)

en donde

R¹ es un medio de soporte.

Tabla 3: Descripción de Soluciones para la Síntesis de Oligómero
5 en Fase Sólida de la Sustancia Farmacológica Cruda Casimersen

	Nombre de la Solución	Composición de la Solución
	Solución de Anclaje de NCP2	37.5 L de NMP y 1292 g de Anclaje de NCP2
10	Solución de Terminación de Cadena DEDC	4.16 L de Dicarbonato de Dietilo (DEDC), 3.64 L de NEM, y 33.8 L de DCM
	Solución CYTFA	2.02 kg de 4-cianopiridina, 158 L de DCM, 1.42 L de TFA, 39 L de TFE, y 2 L de agua purificada
	Solución de Neutralización	35.3 L de IPA, 7.5 L de DIPEA, y 106.5 L de DCM
15	Solución de Escisión	1,530.04 g de DTT, 6.96 L de NMP, y 2.98 L de DBU

2. Síntesis de la Sustancia Farmacológica Cruda Casimersen

A. Hinchamiento de la resina

Se cargaron 750 g de Resina Cargada con Anclaje y
20 10.5 L de NMP a un reactor silanizado de 50 L y se agitó durante
3 horas. El NMP se drenó y la Resina Cargada con Anclaje se
lavó dos veces con 5.5 L cada una de DCM y dos veces con 5.5 L
cada una de 30% TFE/DCM.

B. Ciclo 0: Acoplamiento de Cola de EG3

La Resina Cargada con Anclaje se lavó tres veces con 5.5 L cada una de 30% TFE/DCM y se drenó, se lavó con 5.5 L de solución de CYFTA durante 15 minutos y se drenó y de nuevo se lavó con 5.5 L de Solución de CYTFA durante 15 minutos sin drenado a la cual se cargaron 122 mL de 1:1 NEM/DCM y la suspensión se agitó durante 2 minutos y se drenó. La resina se lavó una vez con 5.5 L de Solución de Neutralización durante 10 minutos y se drenó, dos veces con 5.5 L de Solución de Neutralización durante 5 minutos y se drenó, luego dos veces con 5.5 L cada una de DCM y se drenó. Una solución de 706.2 g de cola de EG3 activada (MW 765.85) y 234 mL de NEM en 3 L de DMI se cargaron a la resina y se agitó durante 3 horas a RT y se drenó. La resina se lavó una vez con 5.5 L de Solución de Neutralización durante 10 minutos y se drenó, una vez con 5.5 L de Solución de Neutralización durante 10 minutos y se drenó, una vez con 5.5 L de Solución de Neutralización durante 5 minutos y se drenó, y una vez con 5.5 L de DCM y se drenó. Una solución de 374.8 g de anhídrido benzoico y 195 mL de NEM en 2680 mL de NMP se cargaron y se agitó durante 15 minutos y se drenó. La resina se lavó una vez con 5.5 L de Solución de Neutralización durante 10 minutos y se drenó, una vez con 5.5 L de Solución de Neutralización durante 5 minutos y se drenó y una vez con 5.5 L de DCM y se drenó y dos veces con 5.5 L cada una de 30% TFE/DCM. La resina se suspendió en 5.5 L de 30%

TFE/DCM y se mantuvo durante 14 horas.

C. Ciclos 1-22 de Acoplamiento de Subunidad

i. Tratamientos de pre-acoplamiento

5 Antes de cada ciclo de acoplamiento como se describe
en la Tabla 4, la resina: 1) se lavó con 30% TFE/DCM; 2) a) se
trató con Solución de CYTFA 15 minutos y se drenó, y b) se
trató con Solución de CYTFA durante 15 minutos a la cual se
añadió 1:1 NEM/DCM, se agitó, y se drenó; 3) se agitó tres
10 veces con Solución de Neutralización; y 4) se lavó dos veces
con DCM. Ver Tabla 4.

ii. Tratamientos Post-Acoplamiento

Después que cada solución de subunidad se drenó como
15 se describe en la Tabla 4, la resina: 1) se lavó con DCM; y 2)
se lavó tres veces con 30% TFE/DCM. Si la resina se mantuvo
durante un periodo de tiempo antes del siguiente ciclo de
acoplamiento, el primer lavado con TFE/DCM no se drenó y la
resina se retuvo en la solución de lavado con TFE/DCM. Ver
20 Tabla 4.

iii. Ciclos de Acoplamiento de Subunidad Activada

Los ciclos de acoplamiento se realizaron como se
describe en la Tabla 4.

iv. Lavado con IPA Final

Después que la etapa de acoplamiento final se realizó como se describe en la Tabla 4, la resina se lavó 8 veces con 19.5 L cada una de IPA, y se secó bajo vacío a temperatura ambiente durante aproximadamente 63.5 horas a un peso seco de 4857.9 g.

D. Escisión

La Sustancia Farmacológica Cruda Casimersen unida a la resina anterior se dividió en dos lotes, cada lote se trató como sigue. Dos lotes de 2261.5 g de resina cada uno: 1) se agitó con 10 L de NMP durante 2 hrs, luego el NMP se drenó; 2) se lavó tres veces con 10 L cada una de 30% TFE/DCM; 3) se trató con 10 L de Solución de CYTFA durante 15 minutos; y 4) 10 L de Solución de CYTFA durante 15 minutos a la cual luego se añadieron 130 ml de 1:1 NEM/DCM y se agitó durante 2 minutos y se drenó. La resina se trató tres veces con 10 L cada una de Solución de Neutralización, se lavó seis veces con 10 L de DCM, y ocho veces con 10 L cada una de NMP. La resina se trató con una Solución de Escisión de 1530.4 g de DTT y 2980 DBU en 6.96 L de NMP durante 2 horas para separar la Sustancia Farmacológica Cruda Casimersen de la resina. La Solución de Escisión se drenó y se retuvo en un recipiente separado. El reactor y la resina se lavaron con 4.97 L de NMP la cual se combinó con la Solución de Escisión.

Tabla 4:

Ciclo No.: Subunidad (SU)	Tratamiento de Pre-Acoplamiento				Ciclo de Acoplamiento		Tratamiento de Post-Acoplamiento		
	1	2	3	4			1	2	
	Lavado con 30% TFE/DCM	Solución de CYTFA ¹	Solución de Neutralización	Lavado con DCM	Cantidad de SU (g) NEM (L) DMI (L)	Tiempo de Acoplamiento RT (Hrs.)	Lavado con DCM	Lavado con 30% TFE/DCM	
5	1:C	5.5L	a) 5,5L b) 5.5L, 122ml	3x5.5L	5.5L	584g; 195 ml de NEM; 3.2L de DMI	5	5.5L	3x5.5L
10	2:A	7.0L	a) 7L b) 7L, 158ml	3x7L	2x7L	592.2g y 195ml de NEM 3.2L de DMI	4.25	7L	3x7L
	3:A	8L	a) 8L b) 8L, 182ml	3x8L	2x8L	592.2g; 195ml de NEM; 3.4L de DMI	4.25	8L	3x8L
	4:T	9L	a) 9L b) 9L, 206ml	3x9L	2x9L	514.2g; 195ml de NEM; 3.6L de DMI	4.25	9L	3x9L
15	5:G	9.5L	a) 9.5L b) 9.5L, 220ml	3x9.5L	2x9.5L	755.5g; 195ml de NEM; 3.4L de DMI	4.25	9.5L	3x9.5L
	6:C	10L	a) 10L b) 10L, 232ml	3x10L	2x10L	584.4g; 195ml de NEM; 3.45L de DMI	4.25	10L	3x10L
	7:C	11L	a) 11L b) 11L, 256ml	3x11L	2x11L	584.5g; 195ml de NEM; 3.57L de DMI	4.25	11L	3x11L
20	8:A	11L	a) 11L b) 11L, 256ml	3x11L	2x11L	592.5g; 195ml de NEM; 3.64L de DMI	4.25	11L	3x11L
	9:T	11.5L	a) 11.5L b) 11.5L 268ml	3x11.5L	2x 11.5L	514.5g; 195ml de NEM; 3.72L de DMI	4.25	11.5L	3x11.5L
25	10:C	12L	a) 12L b) 12L, 280ml	3x12L	2x12L	338.5g; 195ml de NEM;	4.25	12L	3x12L

	Ciclo No.: Subunidad (SU)	Tratamiento de Pre-Acoplamiento				Ciclo de Acoplamiento		Tratamiento de Post-Acoplamiento	
		1	2	3	4			1	2
		Lavado con 30% TFE/DCM	Solución de CYTFA ¹	Solución de Neutralización	Lavado con DCM	Cantidad de SU (g) NEM (L) DMI (L)	Tiempo de Acoplamiento RT (Hrs.)	Lavado con DCM	Lavado con 30% TFE/DCM
5						3.96L de DMI			
	11:C	13.5L	a) 13.5L b) 13.5L, 204ml	3x13.5L	2x 13.5L	770.4g; 253ml de NEM; 4.02L de DMI	4.25	13.5L	3x13.5L
	12:T	13.5L	a) 13.5L b) 13.5L, 204ml	3x13.5L	2x 13.5L	668.7g; 253ml de NEM; 4.02L de DMI	4.25	13.5L	3x13.5L
10	13:DP G	14L	a) 14L b) 14L, 216ml	3x14L	2x14L	982.3g; 253ml de NEM; 4.02L de DMI	4.25	14L	3x14L
	14:DP G	14.5L	a) 14.5L b) 14.5L, 228ml	3x14.5L	2x 14.5L	982.3g; 253ml de NEM; 4.1L de DMI	4.25	14.5L	3x14.5L
15	15:A	15.5L	a) 15.5L b) 15.5L, 254ml	3x15.5L	2x 15.5L	770.1g; 253ml de NEM; 4.26L de DMI	4.25	15.5L	3x15.5L
	16:DP G	15.5L	a) 15.5L b) 15.5L, 254ml	3x15.5L	2x 15.5L	982.4g; 253ml de NEM; 4.26L de DMI	4.25	15.5L	3x15.5L
	17:T	16L	a) 16L b) 16L, 366ml	3x16L	2x16L	549.6g; 253ml de NEM; 4.4L de DMI	4.75	16L	3x16L
20	18:T	16.5L	a) 16.5L b) 16.5L, 378ml	3x16.5L	2x 16.5L	630.7g; 253ml de NEM; 4.4L de DMI	4.25	16.5L	3x16.5L
	19:C	16.5L	a) 16.5L b) 16.5L, 378ml	3x16.5L	2x 16.5L	770.4g; 253ml de NEM; 4.57L de DMI	4.25	16.5L	3x16.5L
25	20:C	17L	a) 17L b) 17L, 390ml	3x17L	2x17L	770.4g; 253ml de de NEM;	4.75	17L	3x17L

5

10

Ciclo No.: Subunidad (SU)	Tratamiento de Pre-Acoplamiento				Ciclo de Acoplamiento		Tratamiento de Post-Acoplamiento	
	1	2	3	4			1	2
	Lavado con 30% TFE/DCM	Solución de CYTFA ¹	Solución de Neutralización	Lavado con DCM	Cantidad de SU (g) NEM (L) DMI (L)	Tiempo de Acoplamiento RT (Hrs.)	Lavado con DCM	Lavado con 30% TFE/DCM
					4.57L de DMI			
21:T	17L	a) 17L b) 17L, 390ml	3x17L	2x17L	776.4g; 311ml de NEM; 4.72L de DMI	4.25	17L	3x17L
22:DP G	17.5L	a) 17.5L b) 17.5L, 402ml	3x17.5L	2x 17.5L	1208.7g; 311ml de NEM; 4.72L de DMI	4.75	17.5L	3x17.5L

¹ ml indica la cantidad de 1:1 NEM/DCM

E. Desprotección

La Solución de Escisión combinada y lavado con NMP se transfirieron a un recipiente de presión al cual se añadieron 39.8L de NH_4OH ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) que se había enfriado a una temperatura de -10° a -25°C en un congelador. El recipiente de presión se selló y se calentó a 45°C durante 16hrs, luego se dejó enfriar a 25°C . Esta solución de desprotección que contenía la sustancia farmacológica cruda Casimersen se diluyó 3:1 con agua purificada antes de la remoción del solvente. Durante la remoción del solvente, la solución de desprotección se ajustó de pH a 3.0 con ácido fosfórico 2M, luego a pH 8.03 con NH_4OH . HPLC: C18 80.93% (**Fig. 1**) y SCX-10 84.4% (**Fig. 2**).

25

Ejemplo 5: Purificación de la Sustancia Farmacológica Cruda

Casimersen

La solución de desprotección del Ejemplo 4, parte E, que contenía la sustancia farmacológica cruda Casimersen se cargó en una columna de resina de intercambio aniónico ToyoPearl Super-Q 650S (Tosoh Bioscience) y se eluyó con una gradiente de 0-35% B sobre 17 volúmenes de columna (Amortiguador A: hidróxido de sodio 10 mM; Amortiguador B: cloruro de sodio 1 M en hidróxido de sodio 10 mM) y fracciones de pureza aceptable (C18 y SCX HPLC) se agruparon a una solución de producto farmacéutico purificada. HPLC: 97.74% (**C18; Fig. 3**) 94.58% (SCX; **Fig. 4**).

La solución de sustancia farmacológica purificada se desaló y se liofilizó a 1959 g de sustancia farmacológica Casimersen purificada. Rendimiento de 63.37%; HPLC: 96.045% (**Fig. 5; C18**) 96.436% (**Fig. 6; SCX**).

Tabla 5. Acrónimos

Acrónimo	Nombre
DBU	1,8-Diazabicycloundec-7-eno
DCM	Diclorometano
DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina
DMI	1,3-Dimetil-2-imidazolidinona
DTT	Ditiotreitol
IPA	Alcohol Isopropílico
MW	Peso molecular

NEM	N-Etilmorfolina
NMP	N-Metil-2-pirrolidona
RT	Temperatura ambiente
TFA	Ácido 2,2,2-Trifluoroacético
TFE	2,2,2-Trifluoroetanol

5

INCORPORACIÓN COMO REFERENCIA

El contenido de todas las referencias (incluyendo referencias de literatura, patentes emitidas, solicitudes de patente publicadas y solicitudes de patente copendientes) citadas en toda esta solicitud se incorporan expresamente en la presente en sus totalidades. A menos que se define de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente son de acuerdo con el significado comúnmente conocido por un experto ordinario en la técnica.

15

EQUIVALENTES

Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las modalidades específicas de la descripción descrita en la presente. Tales equivalentes están destinados a ser incluidos por las siguientes reivindicaciones.

25