



(21)申請案號：109116480

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 05 月 19 日

(51)Int. Cl. : A61K47/54 (2017.01)

C07H1/00 (2006.01)

C07H15/08 (2006.01)

C07H21/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/05/20 歐洲專利局

19175309.4

(71)申請人：瑞士商赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
瑞士(72)發明人：布萊特勒 賽門 亞多夫 BREITLER, SIMON ADOLF (CH)；普恩提納 柯特
PUENTENER, KURT (CH)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2017/084987A1

WO 2018/215391A1

審查人員：方冠岳

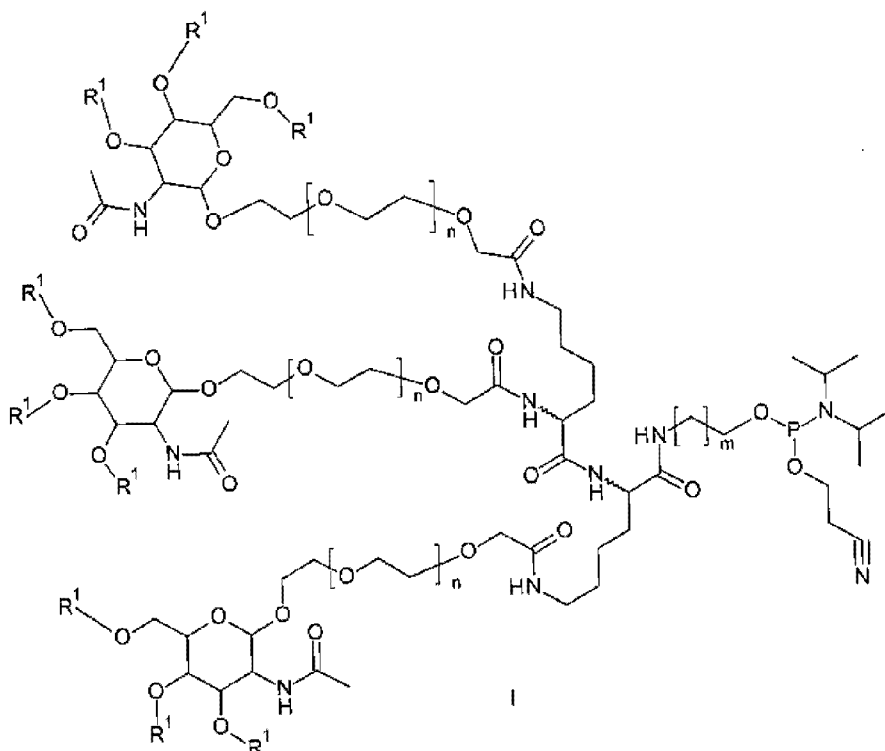
申請專利範圍項數：22 項 圖式數：0 共 48 頁

(54)名稱

GalNAc 亞磷醯胺表異構物

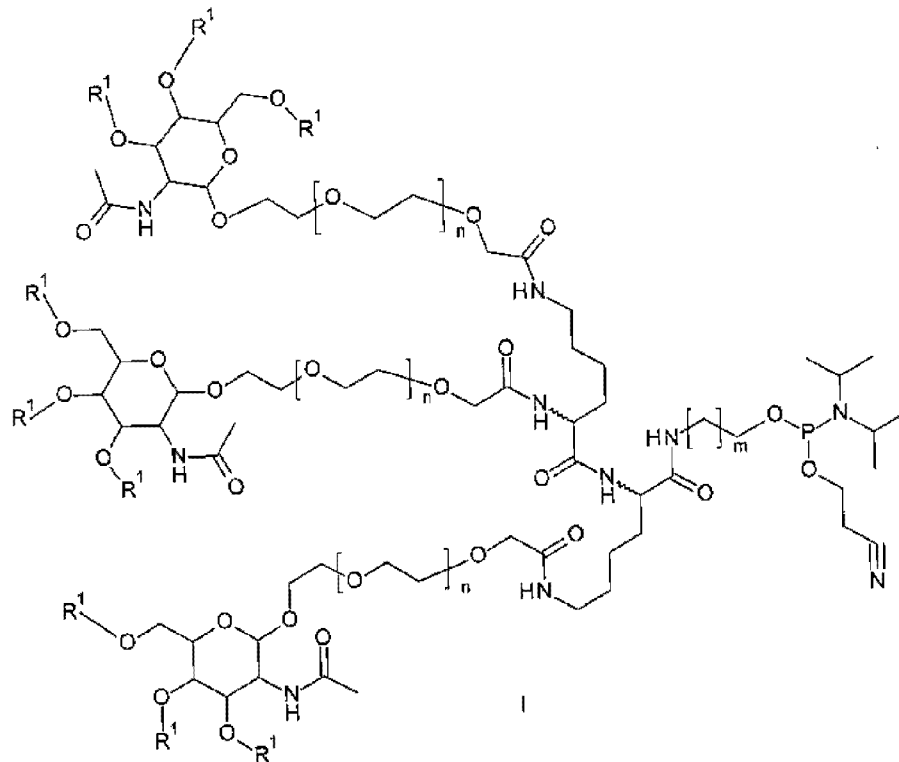
(57)摘要

本發明包含製備式 I 之 GalNAc 亞磷醯胺表異構物、其相應鏡像異構物及/或光學異構物之方法，



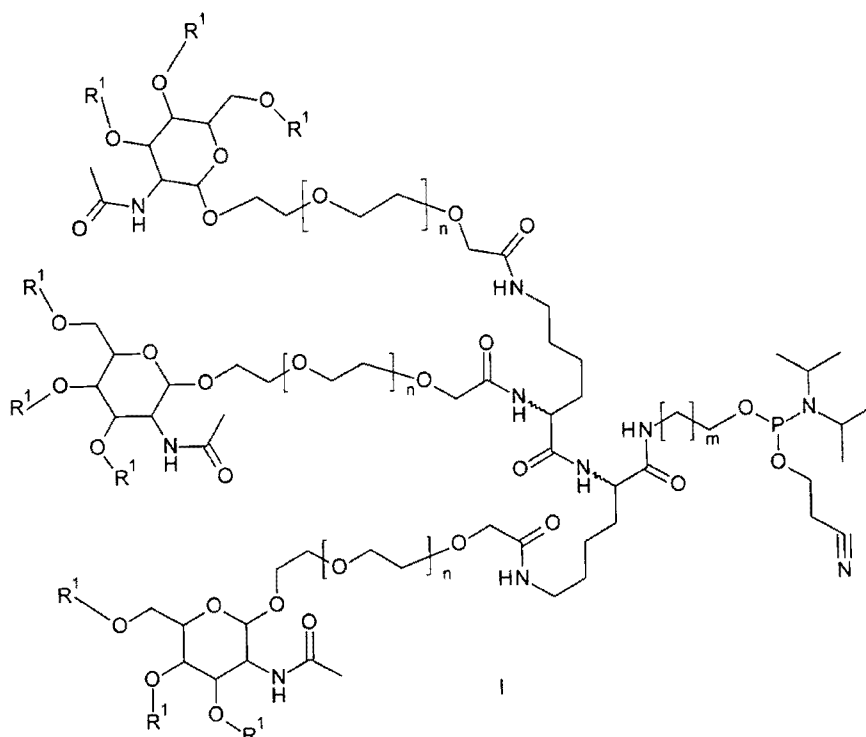
其中 R^1 係羥基保護基團， n 係 0 至 10 之整數且 m 係 0 至 20 之整數；及用於製備 GalNAc 簇寡核苷酸偶聯物之該方法用途。

The invention comprises a process for the preparation of a GalNAc phosphoramidite epimer of the formula I,



wherein R^1 is a hydroxy protecting group, n is an integer from 0 to 10 and m is an integer from 0 to 20, corresponding enantiomers and/ or optical isomers thereof and the use of the process for the preparation of GalNAc-cluster oligonucleotide conjugates.

特徵化學式：





I869403

【發明摘要】

【中文發明名稱】

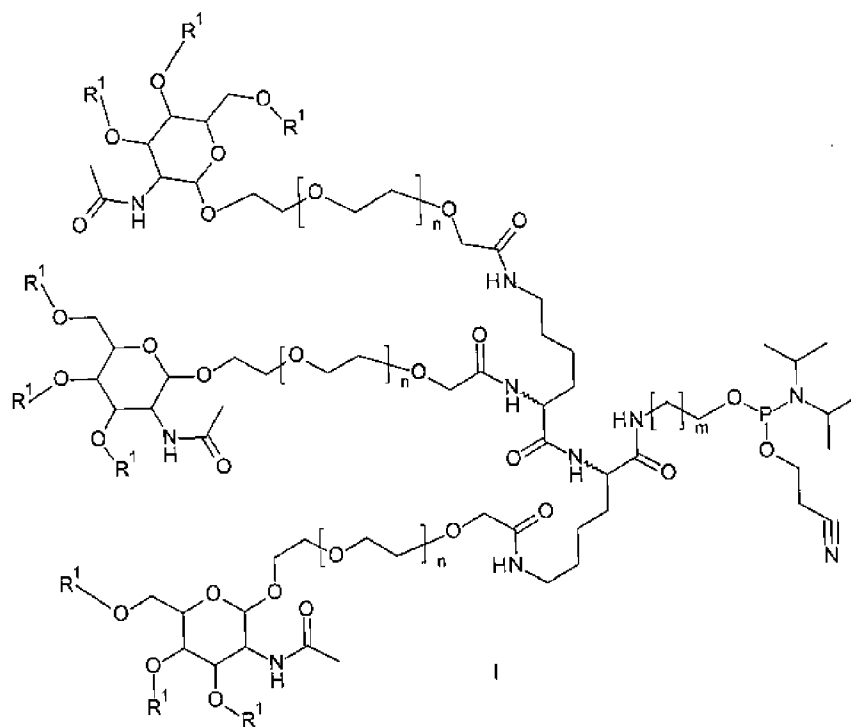
GalNAc亞磷醯胺表異構物

【英文發明名稱】

GALNAC PHOSPHORAMIDITE EPIMERS

【中文】

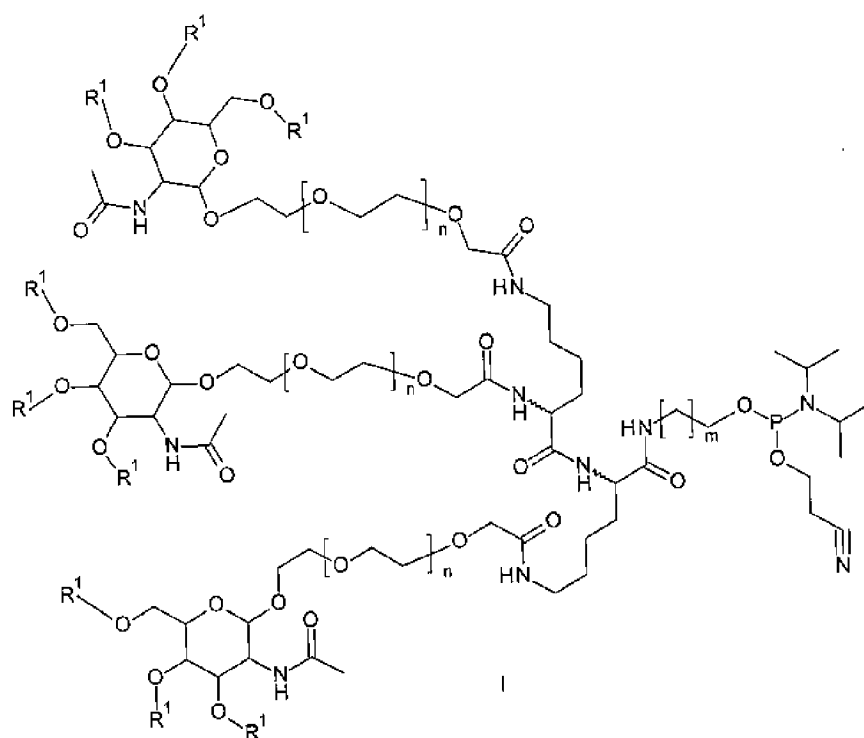
本發明包含製備式I之GalNAc亞磷醯胺表異構物、其相應鏡像異構物及/或光學異構物之方法，



其中 R^1 係經基保護基團， n 係0至10之整數且 m 係0至20之整數；及用於製備GalNAc簇寡核苷酸偶聯物之該方法用途。

【英文】

The invention comprises a process for the preparation of a GalNAc phosphoramidite epimer of the formula I,



wherein R^1 is a hydroxy protecting group, n is an integer from 0 to 10 and m is an integer from 0 to 20, corresponding enantiomers and/ or optical isomers thereof and the use of the process for the preparation of GalNAc-cluster oligonucleotide conjugates.

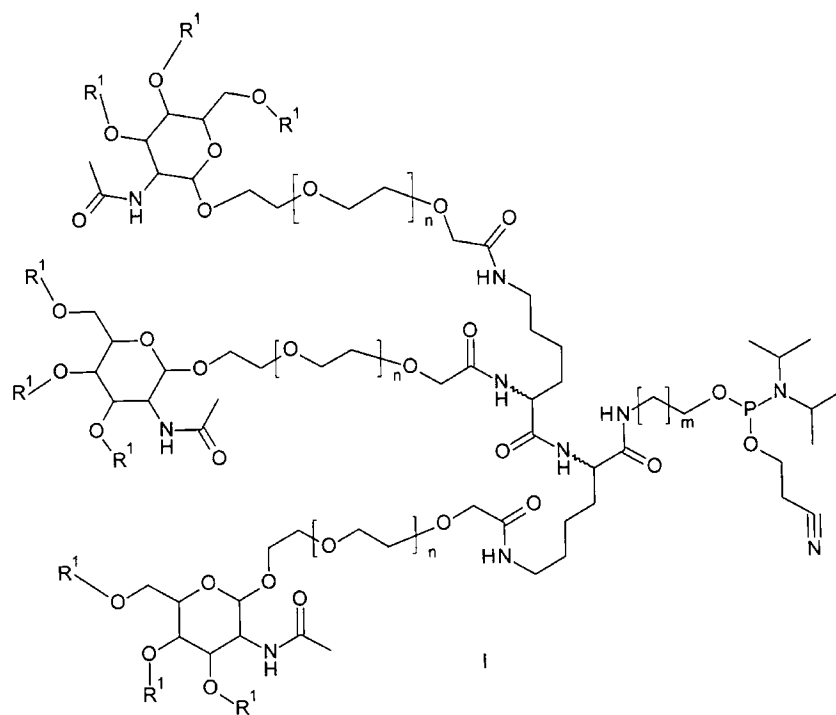
【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】

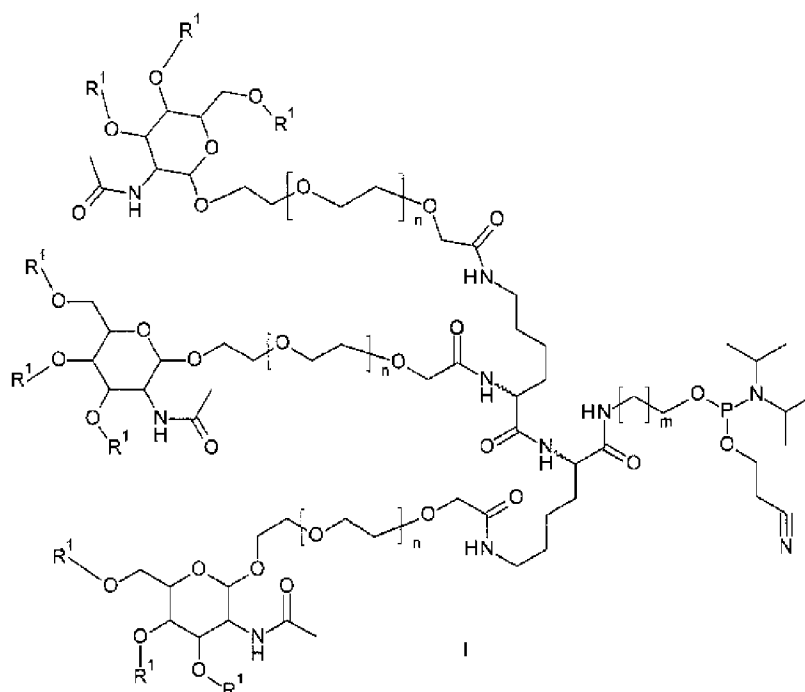
GalNAc亞磷醯胺表異構物

【英文發明名稱】

GALNAC PHOSPHoramidite Epimers

【技術領域】

【0001】 本發明係關於製備式I之表異構物純GalNAc亞磷醯胺表異構物、其相應鏡像異構物及/或光學異構物之新穎方法，



其中 R^1 係羥基保護基團， n 係0至10之整數且 m 係0至20之整數。

【先前技術】

【0002】 式I之GalNAc亞磷醯胺攜載GalNAc部分，其係包含GalNAc部分之偶聯物之靶向部分。由於GalNAc部分對位於肝細胞上之去唾液酸基醣蛋白受體之親和力，該GalNAc部分使得能夠將寡核苷酸偶聯物功能性遞送至肝細胞。此類GalNAc簇偶聯物具有充當藥物動力學調節

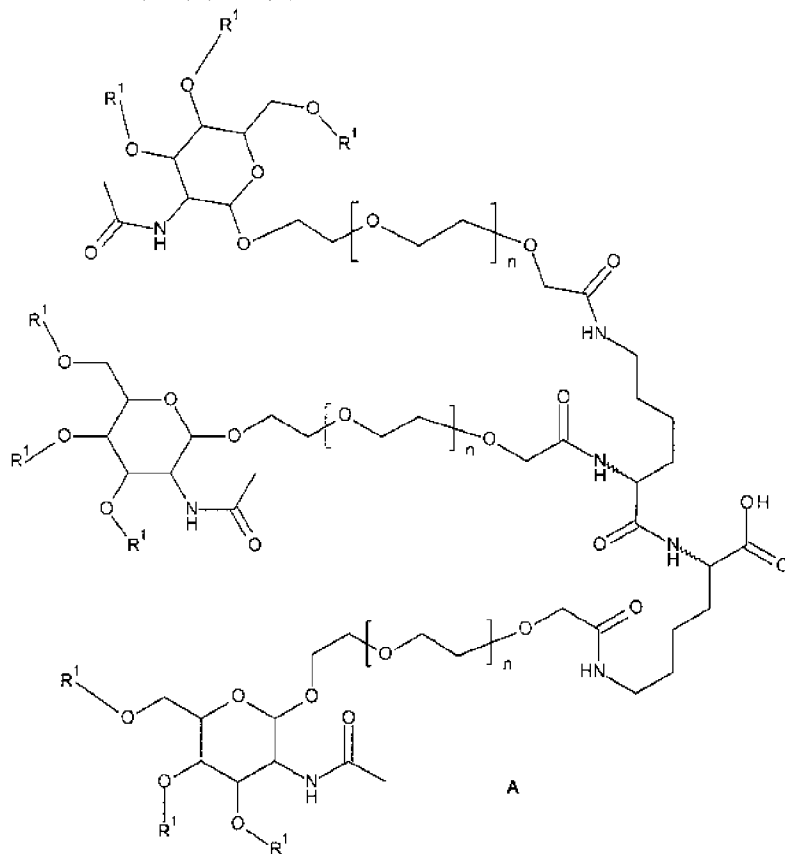
劑之潛力，且因此係具有治療價值之化合物，如例如PCT公開案WO 2017/084987中所述。

【0003】 由於GalNAc部分與亞磷醯胺之獨特組合，式I之GalNAc亞磷醯胺可與核苷結構單元一起在固相寡核苷酸合成中作為建構組元直接引入。由此可避免引入GalNAc部分之單獨偶聯步驟。

【發明內容】

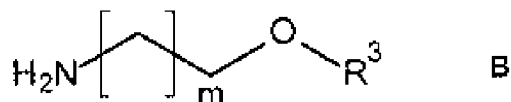
【0004】 根據PCT公開案WO 2017/084987中所述之當前方法，式I之GalNAc亞磷醯胺可藉由以下製備

a) 使式A之GalNAc酸衍生物

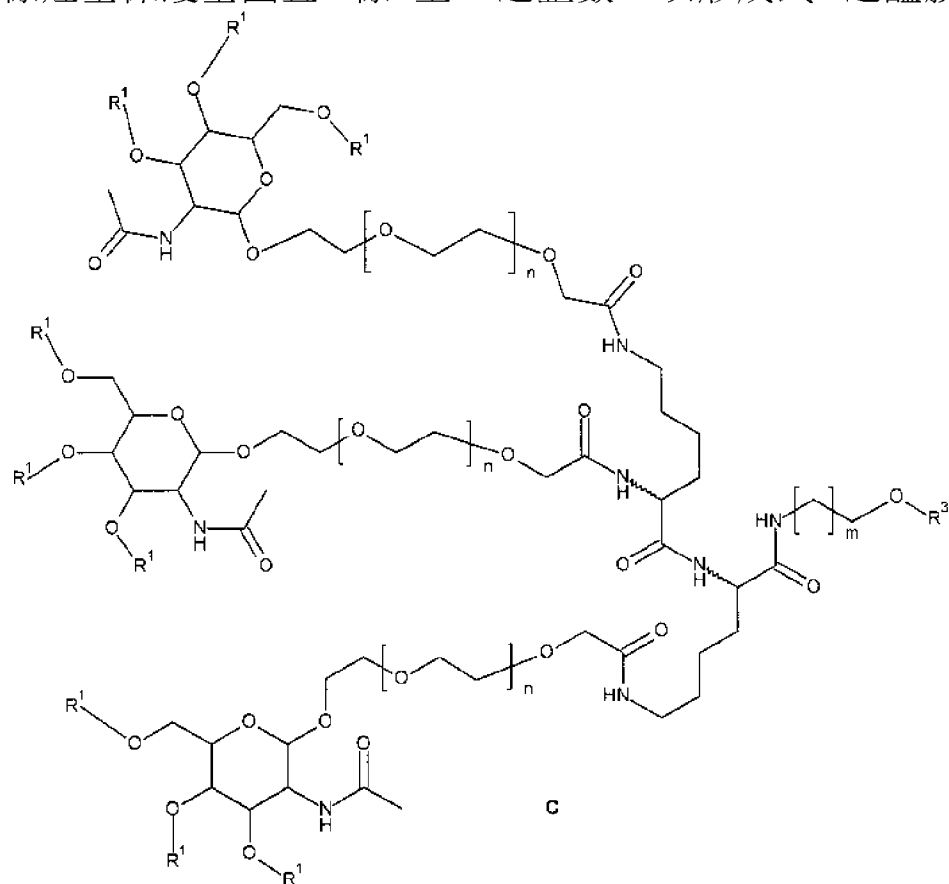


其中 R^1 係經基保護基團且 n 係0至10之整數，

與式B之胺反應

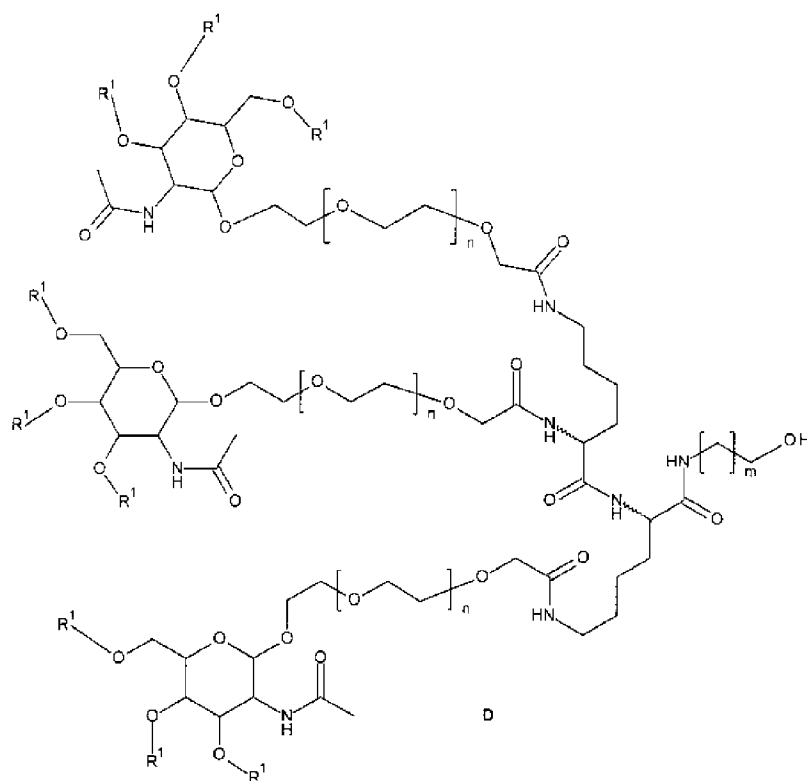


其中 R^3 係羥基保護基團且 m 係0至20之整數，以形成式C之醯胺



其中 R^1 、 R^3 、 n 及 m 係如上文；

b) 去除羥基保護基團 R^3 ，以形成式D之GalNAc醯胺



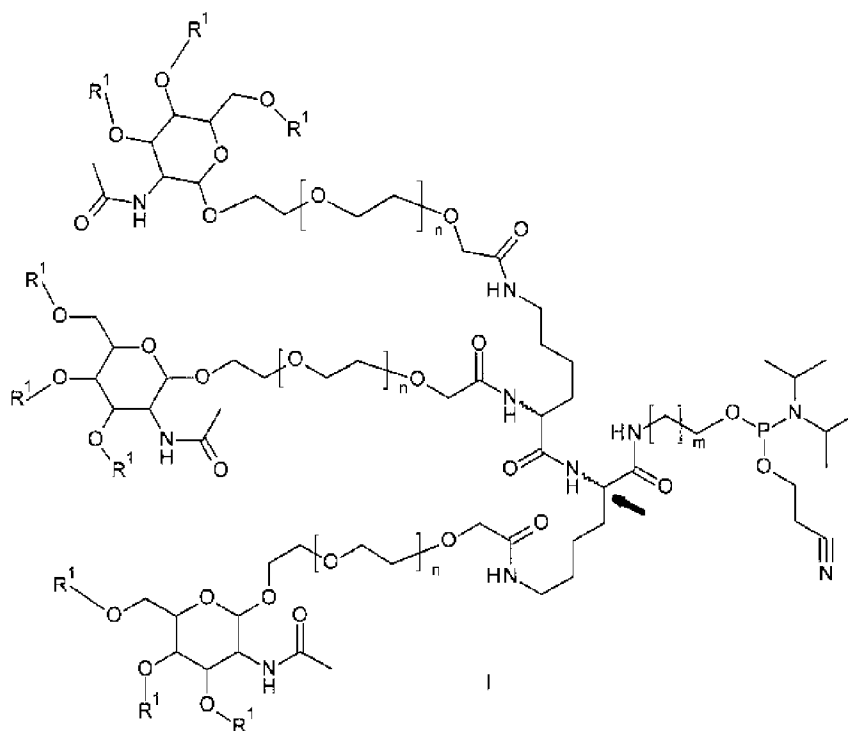
第 3 頁(發明說明書)

其中 R^1 、 n 及 m 係如上文，且

c) 式D之GalNAc醯胺與磷醯胺化劑反應，以形成式I之GalNAc亞磷醯胺衍生物。

【實施方式】

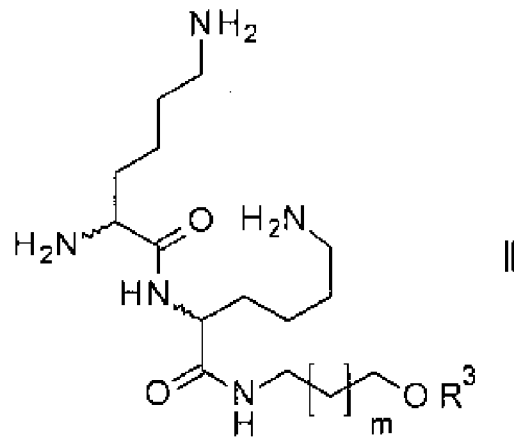
【0005】 已發現，此方法導致在偶合步驟a)中在指定手性中心(下式I中之箭頭)處外消旋



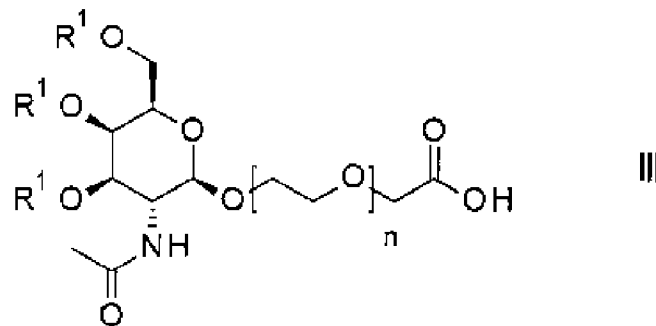
【0006】 因此，本發明之目標係提供產生呈表異構物純形式之建構組元之新穎方法。

【0007】 該目標可利用製備式I之表異構物純GalNAc亞磷醯胺表異構物之新穎方法達成，該方法包含

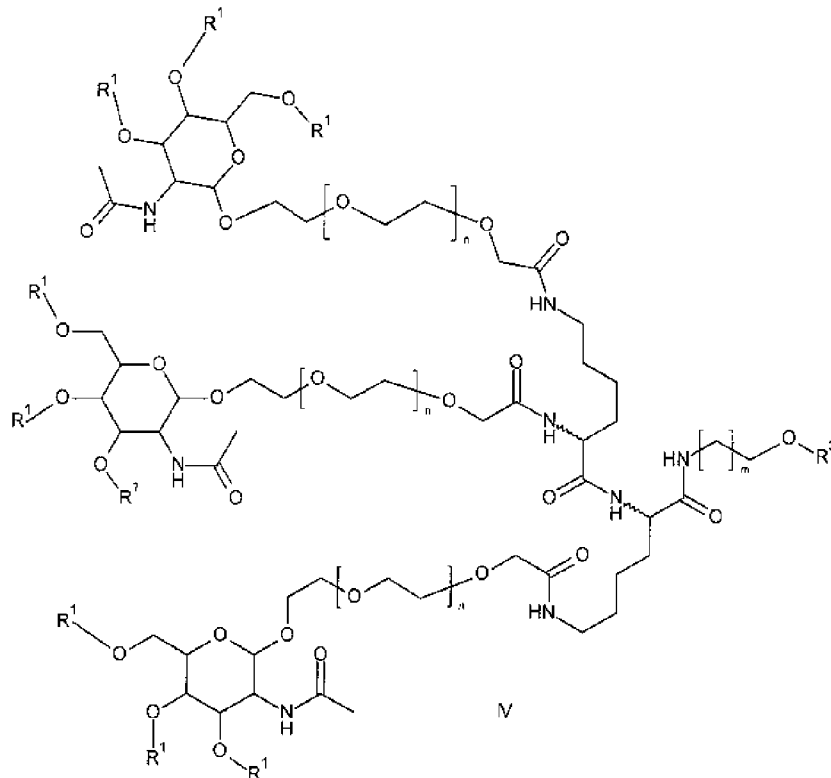
a) 將式II化合物



其中 R^3 係經基保護基團且 m 係如上文，或其鹽
與式III之GalNAc部分偶合



其中 R^1 及 n 係如上文，以形成式IV之GalNAc醯胺



其中 R^1 、 R^3 、 n 及 m 係如上文；及

第 5 頁(發明說明書)

b) 去除羥基保護基團 R^3 ，以形成式IV之GalNAc醯胺之游離醇，及

c) 使式IV之GalNAc醯胺之游離醇與磷醯胺化劑反應，以形成式I之GalNAc亞磷醯胺表異構物。

【0008】 陳述下列定義以說明並定義用於闡述本發明之各種術語之含義及範圍。

【0009】 當在化學結構中存在手性碳時，與該手性碳相關之所有立體異構物均意欲作為純立體異構物及其混合物由該結構涵蓋。

【0010】 術語表異構物表示一對立體異構物中之一者，其中該等異構物僅在一個立體源中心處構形不同且其中分子中之所有其他立體中心均相同。

【0011】 術語「 C_{1-12} -烷基」表示1至12個碳原子之單價直鏈或具支鏈飽和烴基團且術語「 C_{1-6} -烷基」表示1至6個碳原子之單價直鏈或具支鏈飽和烴基團。

【0012】 「 C_{1-12} -烷基」或「 C_{1-6} -烷基」之實例包括甲基、乙基、丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基及戊基及己基以及其異構物。

【0013】 術語「醯基」表示鏈接至烷基之羰基。該術語特定地代表 C_{1-12} -烷基羰基、更特定地 C_{1-6} -烷基羰基，其視情況經 C_{1-6} -烷基取代或視情況經苯基取代。醯基之實例係乙醯基、特戊醯基或苯甲醯基。苯基之可選取代係鹵素(例如氯、溴或碘)或如上文所定義之 C_{1-6} -烷基。醯基較佳代表乙醯基。

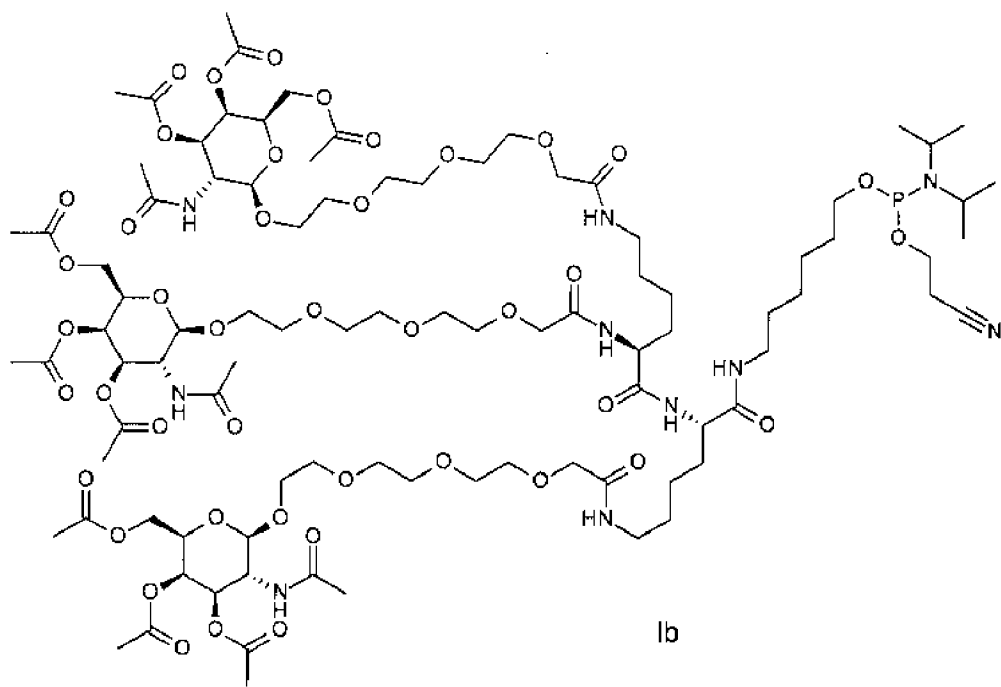
【0014】 術語「羥基-保護基團」表示意欲保護羥基之基團且包括酯形成基及醚形成基團，特定地四氫吡喃基、醯基(例如苯甲醯基、乙醯

基、胺甲醯基)、苄基及矽基醚(例如TBS、TBDPS)基團。該等基團之其他實例見於T. W. Greene及P. G. M. Wuts, 「Protective Groups in Organic Synthesis」, 第2版, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1991, 第2-3章; E. Haslam, 「Protective Groups in Organic Chemistry」, J. G. W. McOmie編輯, Plenum Press, New York, NY, 1973, 第5章, 及T.W. Greene, 「Protective Groups in Organic Synthesis」, John Wiley and Sons, New York, NY, 1981。

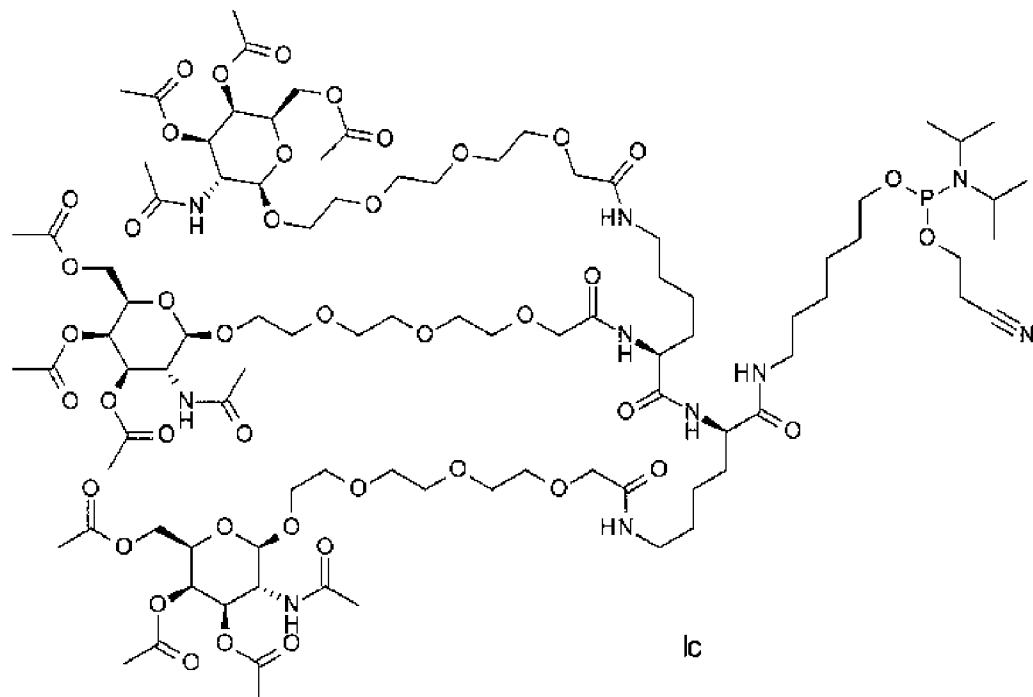
【0015】術語「胺基-保護基團」表示意欲保護胺基之基團且包括苯甲醯基、苄基氧基羰基、苄氧羰基(CBZ或Z)、9-芴基甲氧基羰基(FMOC)、對-甲氧基苄基氧基羰基、對-硝基苄基氧基羰基、第三丁氧基羰基(BOC)及三氟乙醯基。該等基團之其他實例見於T. W. Greene及P. G. M. Wuts, 「Protective Groups in Organic Synthesis」, 第2版, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1991, 第7章; E. Haslam, 「Protective Groups in Organic Chemistry」, J. G. W. McOmie編輯, Plenum Press, New York, NY, 1973, 第5章, 及T.W. Greene, 「Protective Groups in Organic Synthesis」, John Wiley and Sons, New York, NY, 1981。

【0016】式I之GalNAc亞磷醯胺表異構物較佳係其中 R^1 係視情況經 C_{1-6} -烷基或苯基取代之 C_{1-6} -烷基羰基、 n 係0至5之整數且 m 係0至10之整數之彼等, 更佳其中 R^1 係乙醯基、 n 係2且 m 係5之彼等。

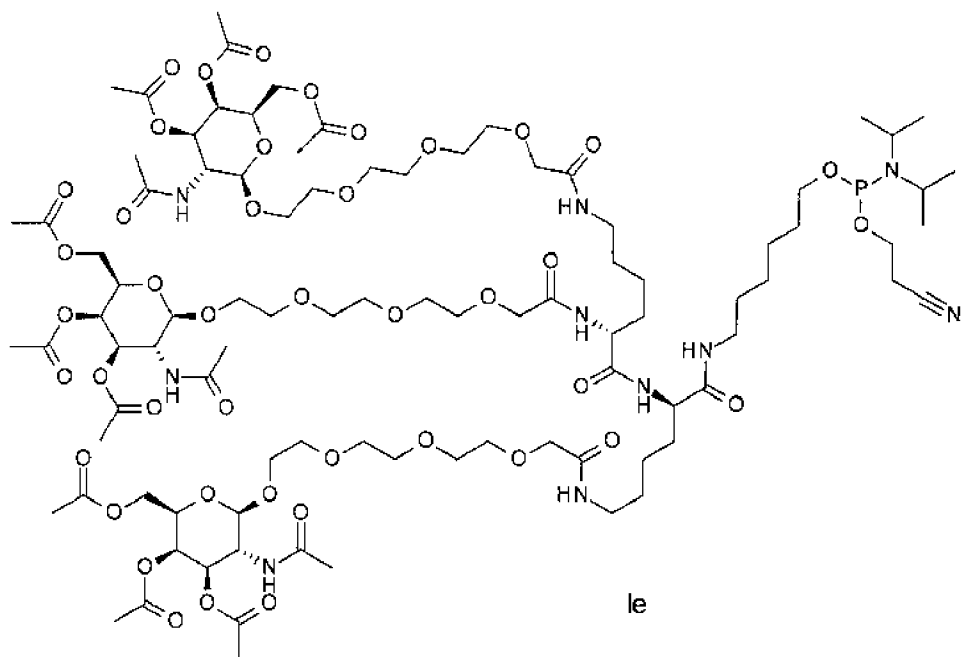
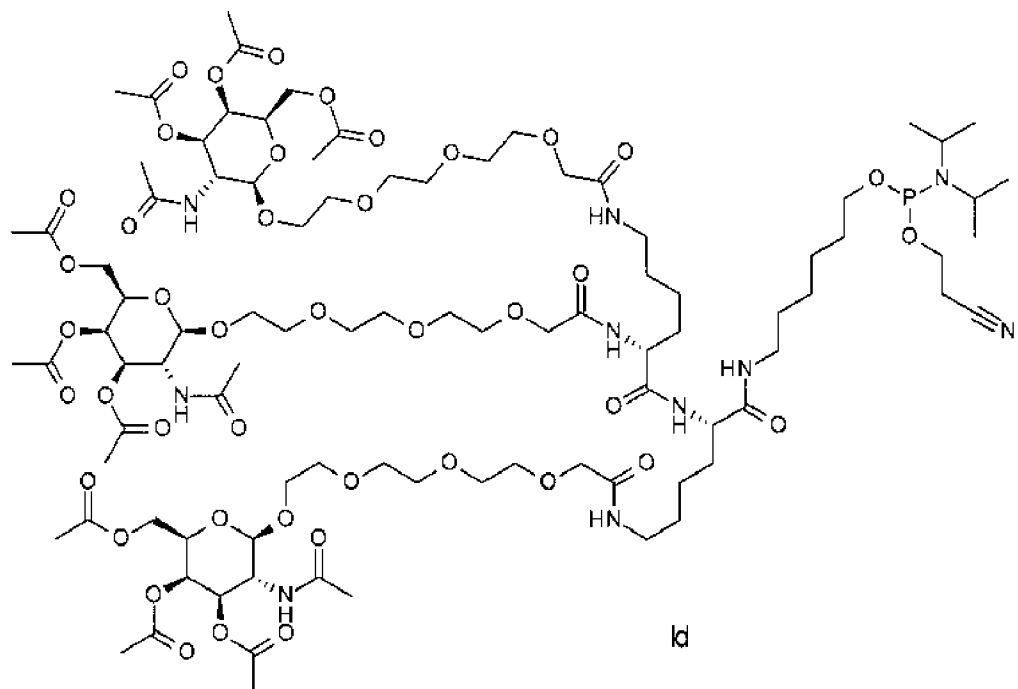
【0017】在更佳實施例中, 式I之GalNAc亞磷醯胺表異構物包含式Ib至Ie之化合物。



1b



1c



【0018】 甚至更佳者係式Ib及Ic之表異構物。

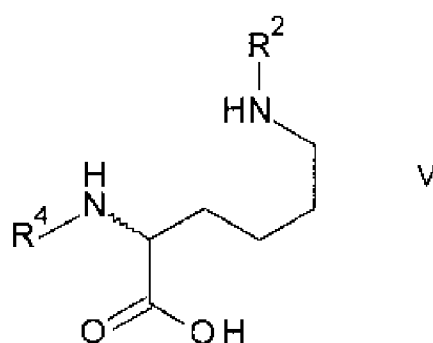
【0019】

步驟a)

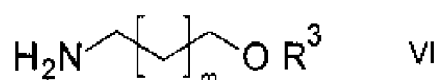
步驟a)之特徵在於式II之化合物或其鹽與式III之GalNAc部分偶合以形成式IV之GalNAc醯胺。

【0020】 式II之化合物或其鹽可藉由以下製備

a1) 使式V之離胺酸化合物

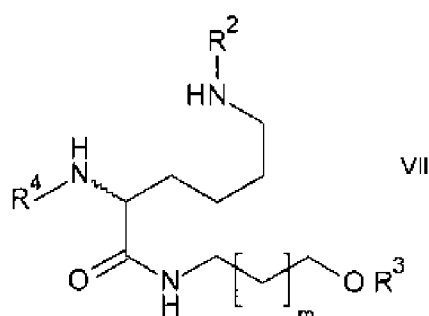


其中R²及R⁴係胺基保護基團，與式VI之胺偶合



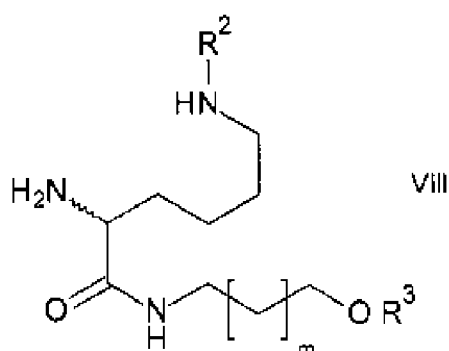
其中R³係經基保護基團且m係如上文

以形成式VII之羧醯胺；



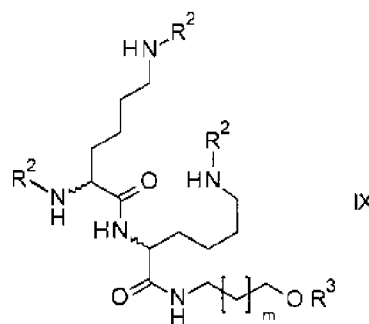
其中R²、R³、R⁴及m係如上文，且藉由

b1) 去除胺基保護基團R⁴，以形成式VIII之胺



其中R²及R³及m係如上文；

c1) 使式VIII之胺與胺基經保護之離胺酸偶合，以形成式IX之二肽



其中 R^2 及 R^3 及 m 係如上文；及

d1) 去除胺基保護基團 R^2 ，以形成式II之化合物。

【0021】 在較佳實施例中，偶合步驟a1)及c1)係在肽偶合劑、胺鹼及有機溶劑之存在下實施。

【0022】 偶合可遵循熟習此項技術者已知之古典方法使用碳二亞胺偶合劑(如，DCC (N,N'-二環己基碳二亞胺)或EDC (N-(N'',N''-二甲基胺基丙基-N'-乙基碳二亞胺))在有或沒有添加劑(如，HOBt (1-羥基苯并三唑)或HOSu (N-羥基琥珀醯亞胺)、TBTU (N,N,N',N'-四甲基-O-(苯并三唑-1-基)脲鎘四氟硼酸鹽)、HBTU (2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎘四氟磷酸鹽)或HOAt (1-羥基-7-氮雜苯并三唑)及其常見組合(例如TBTU/HOBt或HBTU/HOAt))之情形下實施。

【0023】 在較佳實施例中，選擇正丙基膦酸酐(T3P)作為偶合劑以及三級胺作為胺鹼(如三乙胺、N-甲基嗎啉或N-二異丙基乙胺)，但較佳與N-二異丙基乙胺一起。

【0024】 偶合反應通常在極性非質子溶劑(如乙腈、乙酸乙酯或四氫呋喃或其混合物)中在 20°C 與 70°C 之範圍內、較佳在 20°C 與 40°C 之範圍內的反應溫度下進行。

【0025】 來自偶合步驟a1)及c1)之產物可自反應混合物之有機層應用熟習此項技術者已知之方法(例如藉由洗滌有機相且隨後藉由蒸發去除

溶劑)獲得。

【0026】 胺基保護基團 R^4 通常係可在鹼性條件下裂解之胺基保護基團。Fmoc係最佳胺基保護基團。鹼性條件通常涉及利用脂肪族二級胺、例如利用六氫吡啶、4-甲基六氫吡啶、吡咯啉或二乙基胺、但較佳利用二乙基胺在有機溶劑之存在下處理。適宜溶劑係極性非質子溶劑，如乙腈或四氫呋喃或其混合物。

【0027】 胺基保護基團 R^2 通常係可在酸性條件下裂解之胺基保護基團，較佳第三丁基氧基羰基(Boc)。

【0028】 因此，胺基保護基團 R^2 之去除可利用例如選自鹽酸、三氟乙酸、磺酸(例如對-甲苯磺酸或甲磺酸)之適宜酸在極性非質子溶劑中(例如在乙腈中)進行。

【0029】 在較佳實施例中，應用甲磺酸。

【0030】 酸性處理利用各別酸形成式IX之二肽之三-銨鹽，對於較佳實施例利用甲磺酸形成式IX之二肽之三-銨鹽。

【0031】 式IX之二肽之三-銨鹽可藉由應用熟習此項技術者已知之方法(例如結晶)分離或直接應用於步驟b)中與式III之GalNAc部分之偶合。

【0032】 式III之GalNAc部分可根據PCT國際公開案WO 2017/084987、特別地根據其實例7製備。

【0033】 式II之化合物或其鹽(例如式IX之二肽之三-銨鹽)與式III之GalNAc部分之最終偶合可在上文所提及之偶合條件下實施。而且，上文所報告之較佳反應條件可應用於此偶合反應。

【0034】 式IV之GalNAc醯胺可藉由反相層析進一步純化且含有產

物之部分可例如凍乾，以獲得式IV之經純化GalNAc醯胺。

【0035】

步驟b)

步驟b)需要去除羥基保護基團 R^3 ，以形成式IV之GalNAc醯胺之游離醇。

【0036】 重要的是，羥基保護基團 R^3 化學上不同於羥基保護基團 R^1 ，使得去除條件係以羥基保護基團 R^3 裂解而羥基保護基團 R^1 保持不受影響之方式經選擇。

【0037】 適宜羥基保護基團 R^3 係視情況經鹵素或 C_{1-6} -烷基取代之苄基或係二苯甲基或三苯甲基，即可藉由氫解裂解之基團。

【0038】 在較佳實施例中， R^3 係苄基且氫解係利用氫在適宜氫化觸媒之存在下催化氫化。

【0039】 用於去除苄基之適宜氫化觸媒係碳載鈀(Pd/C)。

【0040】 反應通常在極性質子溶劑(如脂肪族醇，例如2-丙醇)或極性非質子溶劑(例如THF或乙酸乙酯)之存在下在介於 0°C 與 40°C 之間、較佳 10°C 與 30°C 之間之反應溫度下且在10巴(bar)至100巴、較佳30巴至80巴之氫壓力下實施。

【0041】 式IV之GalNAc醯胺之游離醇可藉由濾除觸媒並藉由在真空中蒸發濃縮濾液來獲得。

【0042】

步驟c)

步驟c)需要式IV之GalNAc醯胺之游離醇與磷醯胺化劑反應，以形成式I之GalNAc亞磷醯胺表異構物。

【0043】 磷醯胺化劑可選自2-氰基乙基-N,N-二-(2-丙基)氯亞磷醯胺或2-氰基乙基-N,N,N',N'-四(2-丙基)亞磷醯二胺。

【0044】 在較佳實施例中，磷醯胺化劑係2-氰基乙基-N,N,N',N'-四(2-丙基)亞磷醯二胺與活化劑之組合。

【0045】 活化劑可選自二級胺、較佳脂肪族二級胺(如二異丙胺)之酸性銨鹽，較佳二異丙基銨四唑鹽。或者，可使用其他四唑類型活化劑，如四唑、5-(乙基硫基)-1H-四唑、5-(苄基硫基)-1H-四唑或4,5-二氰基咪唑。

【0046】 反應可在極性非質子溶劑(如二氯甲烷、四氫呋喃或乙腈)中在介於-20°C與50°C之間、較佳介於10°C與30°C之間之反應溫度下實施。

【0047】 產物自反應混合物之分離可藉由蒸發實施。然而，通常產物留在溶液中並藉由製備型層析進一步純化。

【0048】 或者，上述磷醯胺化反應之反應混合物可不經層析純化而直接用於固相寡核苷酸合成。

【0049】 在較佳實施例中，將式I之層析純化產物GalNAc亞磷醯胺表異構物溶於極性非質子溶劑(例如二氯甲烷或乙腈或其混合物)中並直接應用於GalNAc簇寡核苷酸偶聯物之製備。或者，產物溶液可經乾燥劑(例如分子篩(3Å或4Å)、無水K₂CO₃、鹼性活性氧化鋁、CaCl₂或CaH₂，較佳CaH₂或3Å分子篩)乾燥。

【0050】 GalNAc簇寡核苷酸偶聯物之製備包含

- a) 製備式I之GalNAc亞磷醯胺表異構物；
- b) 在固相寡核苷酸合成中將式I之GalNAc亞磷醯胺表異構物連同期

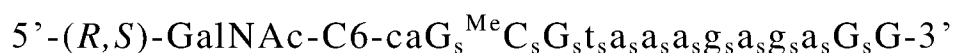
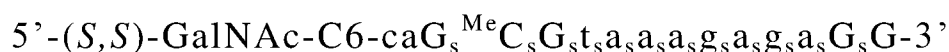
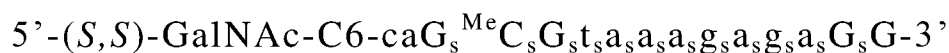
望核苷建構組元以期望序列一起使用，以形成結合至固體支撐物之期望GalNAc簇寡核苷酸偶聯物，及最後

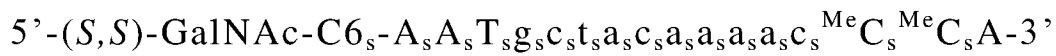
c) 使GalNAc簇寡核苷酸偶聯物自固相支撐物裂解並完全去保護並純化。

【0051】 如熟習此項技術者通常所理解，本文所用之術語寡核苷酸定義為包含兩個或更多個共價鏈接之核苷的分子。為用作治療上有價值之寡核苷酸，寡核苷酸通常合成為7至30個核苷酸長度。寡核苷酸通常在實驗室中藉由固相化學合成、然後純化來製得。當提及寡核苷酸之序列時，係指共價鏈接之核苷酸或核苷之核鹼基部分或其改質之序列或順序。本發明之寡核苷酸係人造的，且係以化學方式合成，且通常經純化或分離。本發明之寡核苷酸可包含一或多個經改質核苷或核苷酸。在一些實施例中，寡核苷酸係反義寡核苷酸。

【0052】 寡核苷酸可由DNA、RNA、經改質RNA或LNA核苷單體或其組合組成。LNA核苷單體係經改質核苷，其在核苷酸之核糖糖環之C2'與C4'之間包含鏈接體基團(稱為雙基或橋基)。該等核苷在文獻中亦稱為橋接核酸或二環核酸(BNA)。

【0053】 在非限制性實施例中，GalNAc簇寡核苷酸偶聯物可選自由以下組成之群：





其中大寫字母表示β-D-氧基-LNA單元；小寫字母表示DNA單元；下標「s」表示硫代磷酸酯鏈接；上標Me表示含有5-甲基胞嘧啶鹼基之DNA或β-D-氧基-LNA單元且C6表示6-胺基己基-1-磷酸酯鏈接。

【0054】 固相合成之後，GalNAc簇寡核苷酸偶聯物仍結合至固體支撐物上且仍攜載諸如羥基保護基團R¹之保護基團。

【0055】 自支撐物裂解及去保護可使用熟習此項技術者已知且闡述於文獻(Wincott等人；Nucl. Acids Res. (1995) 23 (14): 2677-2684)中之方法進行。通常，GalNAc簇寡核苷酸偶聯物係以適宜鹽(如銨鹽或鹼金屬鹽，例如鈉或鉀鹽)之形式獲得。

【0056】 本文所揭示之化合物具有選自由SEQ ID NO：1、2、3及4組成之群之核鹼基序列。

SEQ ID NO 1: cagcgtaaagagagg

SEQ ID NO 2: cacctatttaacatcagac

SEQ ID NO 3: catcaactttcacttcag

SEQ ID NO 4: aatgctacaaaacca

【0057】

實例

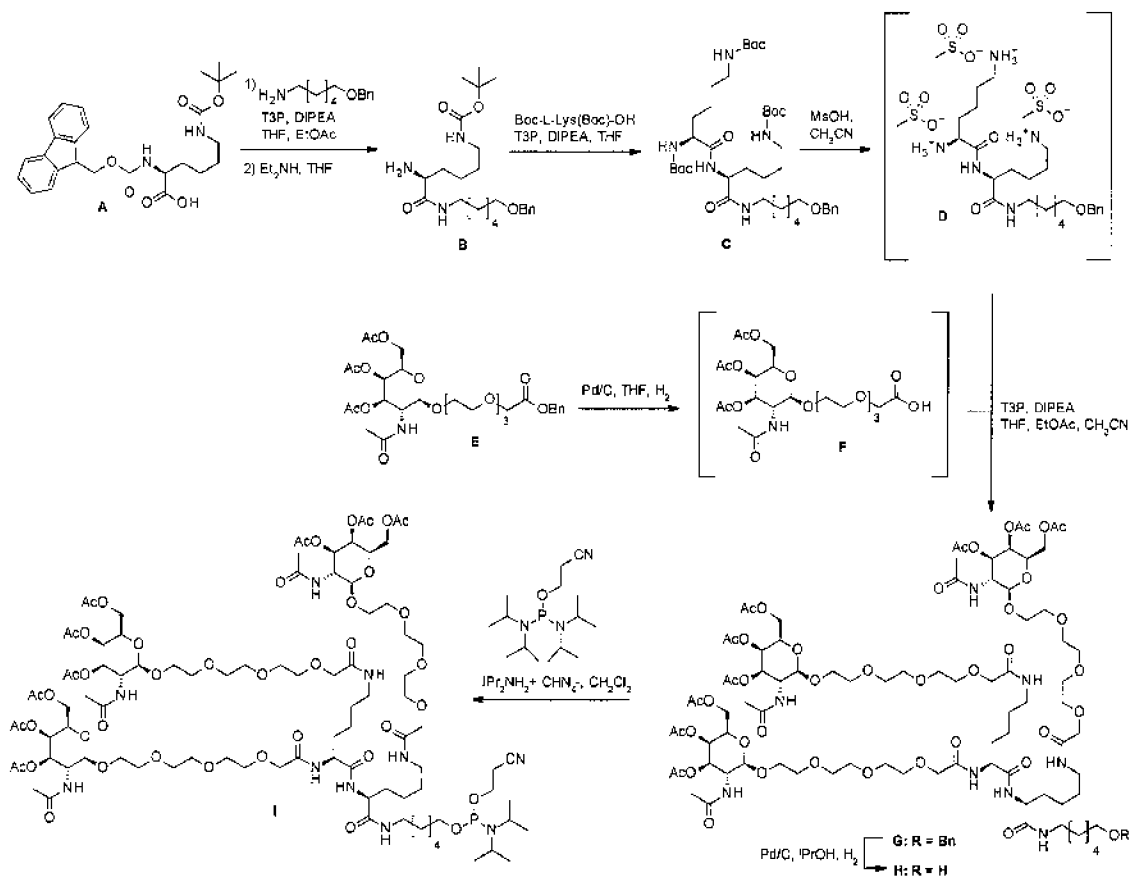
縮寫：

DIPEA 二異丙基乙基胺

DMAP	4-(二甲基胺基)吡啶
ESI	電噴霧電離
EtOAc	乙酸乙酯
EtOH	乙醇
HRMS	高解析度質譜
HSQC-NMR	異核單量子相干-核磁共振
MeOH	甲醇
MS	分子篩
MsOH	甲磺酸
rt	室溫(20-25°C)
SPOS	固相寡核苷酸合成
T3P	正丙基膦酸酐
THF	四氫呋喃
TBME	甲基第三丁基醚

【0058】

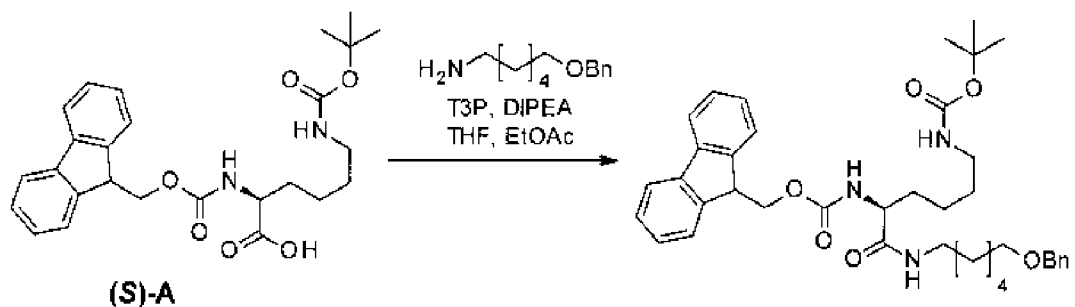
製程方案：



【0059】

實例1a

(2S)-6-(第三丁氧基羰基胺基)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)己酸



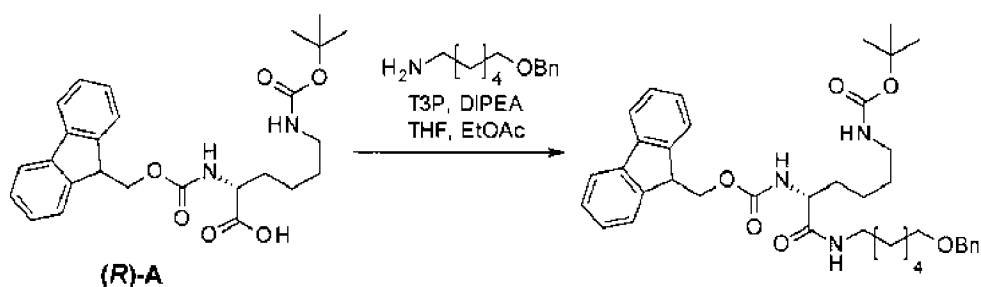
在20-25°C下向Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (54 g, 115 mmol)、6-苄基氧基己基-1-胺鹽酸鹽(根據WO2017084987A1製備) (29.5 g, 121 mmol)及N-乙基二異丙胺(78.4 ml, 461 mmol)於THF (540 ml)中之溶液中經30 s添加正丙基膦酸酐(環狀三聚體, 50%於EtOAc中, 122 ml, 207 mmol)。將所得淺黃色溶液(pH 7-8)於20-25°C攪拌1 h。將水(540 ml)、TBME (135

ml)及正-庚烷(540 ml)依序添加至反應混合物並萃取雙相混合物。將有機層濃縮並在真空中濃縮，以獲得目標(*S*)-醯胺(79 g)，其不經進一步純化即使用。HRMS (ESI)：C₃₉H₅₁N₃O₆ (MH⁺)之計算值：657.3778；試驗值：657.3781。

【0060】

實例1b

(2*R*)-6-(第三丁氧基羰基胺基)-2-(9*H*-芴-9-基甲氧基羰基胺基)己酸

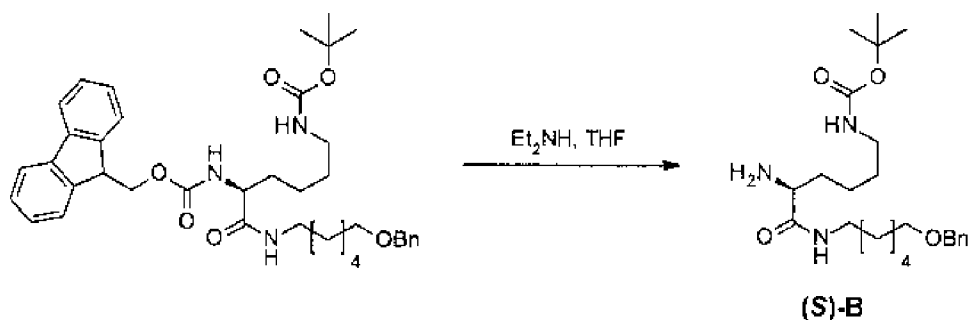


以與實例1a相同之方式，獲得呈白色固體之粗製(*R*)-醯胺且不經進一步純化即使用。HRMS (ESI)：C₃₉H₅₁N₃O₆ (MH⁺)之計算值：657.3778；試驗值：657.3789。

【0061】

實例2a

N-[(5*S*)-5-胺基-6-(6-苄基氧基己基胺基)-6-側氧基-己基]胺基甲酸第三丁基酯



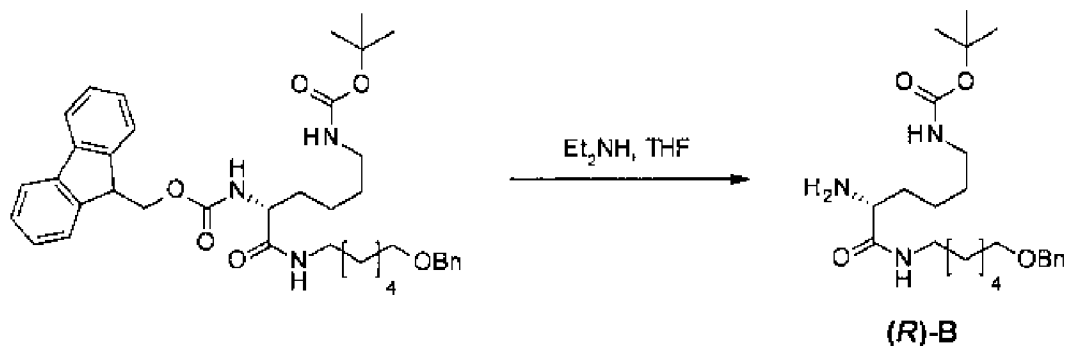
向上述粗製醯胺(79 g, 120 mmol)於THF (237 ml)中之溶液中添加二

乙胺(251 ml, 2.4 mol)並在20-25°C下將無色溶液攪拌1.5 h。然後，將反應混合物濃縮並在真空中乾燥，以獲得淡黃色油狀物，將其重新溶於TBME (521 ml)及水(521 ml)中。添加甲磺酸(7.02 ml, 108 mmol)至pH 4並將各層分離。水層用TBME (521 ml)重新萃取且然後利用氫氧化鈉(32%於水中，12.9 ml, 139 mmol)鹼化至pH 14。水相用TBME (521 ml)萃取，分離有機層，經硫酸鈉乾燥，濃縮並在真空中乾燥，以獲得呈無色油狀物之(S)-**B** (48.5g, 97% 產率，經 2 個步驟)。HRMS (ESI) : $C_{24}H_{41}N_3O_6$ (MH^+)之計算值: 435.3097；試驗值：435.3121。

【0062】

實例2b

N-[(5*R*)-5-胺基-6-(6-苄基氧基己基胺基)-6-側氧基-己基]胺基甲酸第三丁基酯

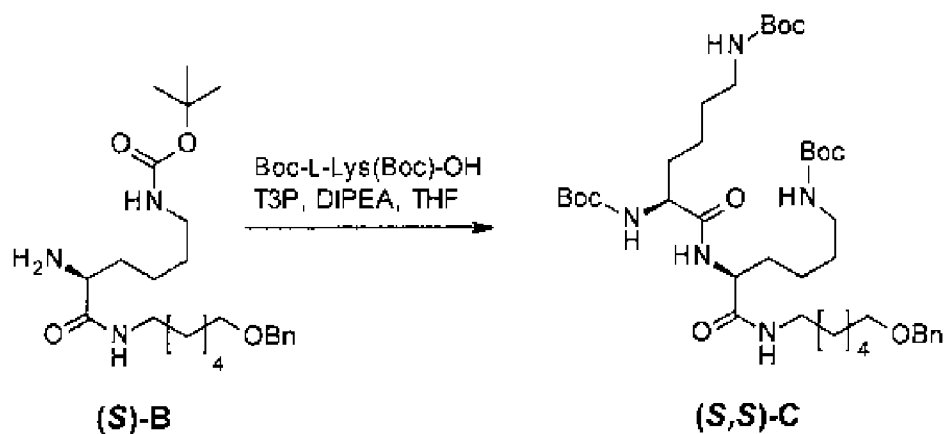


以與實例2a相同之方式，獲得呈淡黃色油狀物之(R)-**B** (923 mg, 85%，經 2 個步驟)。HRMS (ESI) : $C_{24}H_{41}N_3O_6$ (MH^+)之計算值：435.3097；試驗值：435.3113。

【0063】

實例3a

N-[(5*S*)-6-(6-苄基氧基己基胺基)-6-側氧基-5-[[*(2S)*-2,6-雙(第三丁氧基羰基胺基)己醯基]胺基]己基]胺基甲酸第三丁基酯

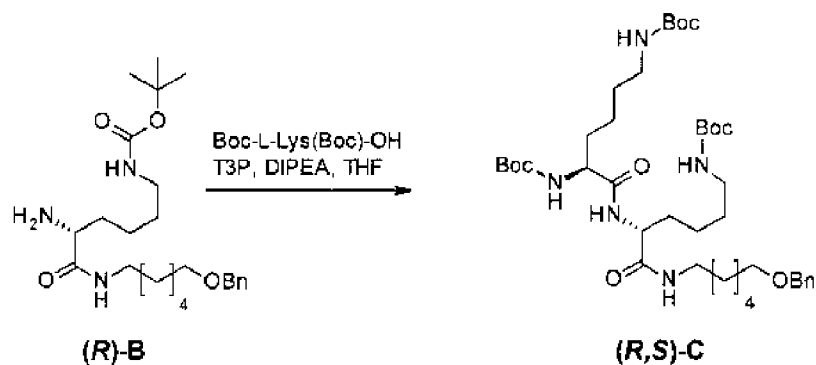


在20-25°C下向(S)-B (48 g, 110 mmol)、DIPEA (75 ml, 441 mmol) 及Boc-L-Lys(Boc)-OH (45.8 g, 132 mmol)於THF (480 ml)中之溶液中經30 s添加T3P (50%於乙酸乙酯中, 97.4 ml, 165 mmol)並將無色溶液攪拌45 min。然後添加水(480 ml)並將雙相混合物攪拌5 min。添加正庚烷(480 ml)並將各層分離。將有機層用於水中之0.5M HCl (230 ml)、0.5M NaOH (230 ml)洗滌，經硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。將粗產物溶於EtOH (45 ml)並添加正庚烷(428 ml)。將所得白色懸浮液在20-25°C下攪拌16 h。將懸浮液過濾，濾餅用EtOH/正庚烷(0.5/9.5, 50ml)洗滌且白色固體在真空中乾燥，以獲得呈白色結晶固體之(S,S)-C (63.3g, 75%產率)。HRMS (ESI) : C₄₀H₆₉N₅O₉ (MH⁺)之計算值：763.5095；試驗值：763.5098。

【0064】

實例3b

N-[(5*R*)-6-(6-苄基氧基己基胺基)-6-側氧基-5-[[[(2*S*)-2,6-雙(第三丁氧基羰基胺基)己醯基]胺基]己基]胺基甲酸第三丁基酯

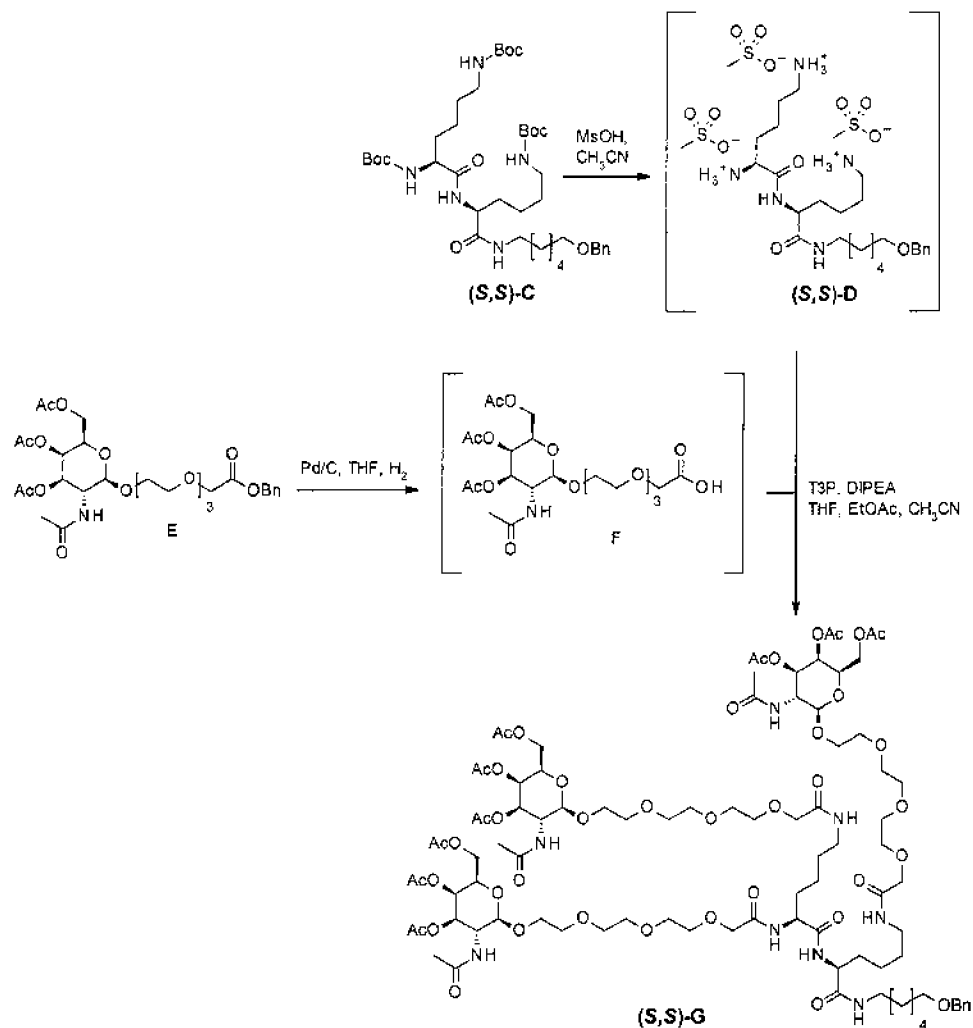


以與實例3a相同之方式，獲得呈白色固體之(R,S)-C (16.4 g, 71%)。HRMS (ESI) : C₄₀H₆₉N₅O₉ (MH⁺) 之計算值：763.5095；試驗值：763.5076。

【0065】

實例4a

(2S)-2,6-雙[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3-乙醯胺基-6-乙基-4,5-二甲基-四氫吡喃-2-基]氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-N-[(1S)-1-(6-苄基氧基己基胺甲醯基)-5-[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3-乙醯胺基-6-乙基-4,5-二甲基-四氫吡喃-2-基]氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]戊基]己醯胺



將(S,S)-C (36.1 g, 47.3 mmol)懸浮於乙腈(366 ml)中並添加甲磺酸(15.4 ml, 237 mmol)。將所得黃色渾濁溶液加熱至55-60°C。20 min後，添加額外乙腈(366 ml)以能夠攪拌。2h後，去除油浴且白色漿液用於偶合。將DIPEA (137 ml, 804 mmol)及F之溶液(其根據WO2017084987A製備) (7.6% w/w, 1.35 kg, 191 mmol)添加至上述反應混合物並將淺黃色溶液升溫至40-45°C。然後，經5 min添加T3P (50%於乙酸乙酯中, 139 ml, 237 mmol)並將無色溶液在40-45°C下攪拌。30 min後，將反應混合物冷卻至20-25°C並在真空中濃縮至大約500 g。將此粗製溶液溶於1 M碳酸氫鈉(236 ml, 236 mmol)中並藉由反相層析分4部分純化(Redisep R_f C18, 360 g, H₂O/乙腈100:0至70:30至60:40至10:90)。將含有產物之部分在真

空中濃縮以去除乙腈並然後凍乾，以獲得白色泡沫狀物，使其與乙腈(2x)共沸，以獲得呈白色泡沫狀之部分去乙醯化(*S,S*)-**G** (77.1g)。

【0066】

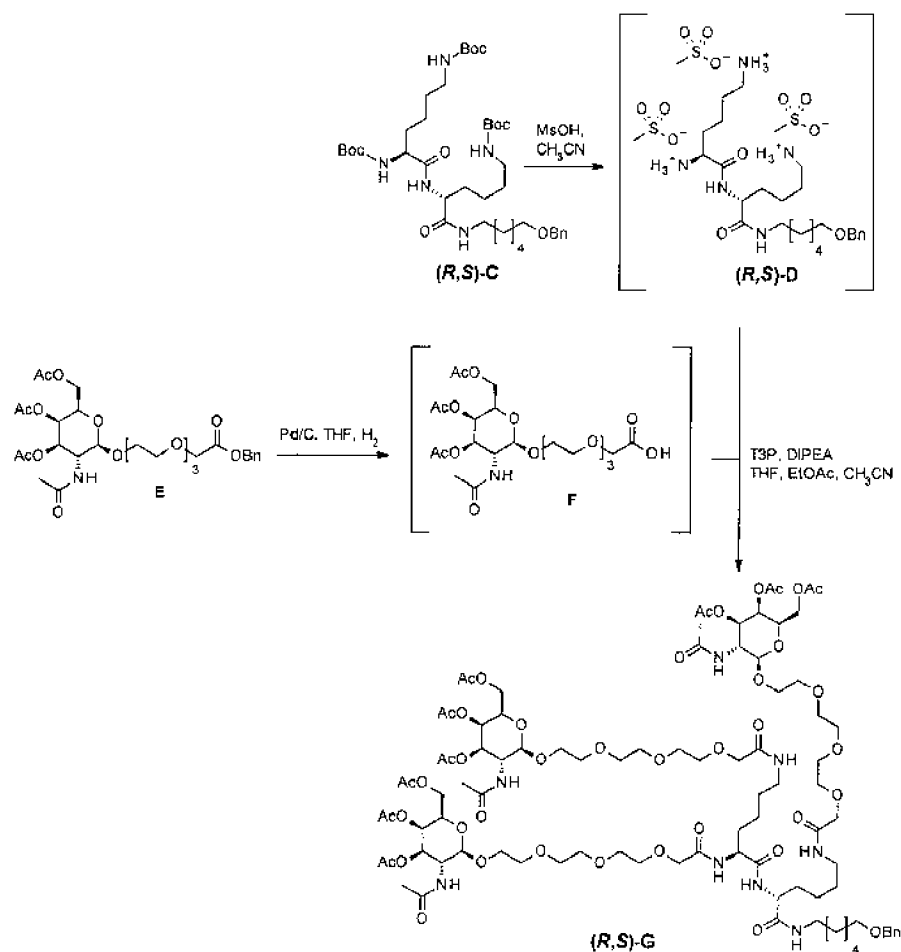
再乙醯化：

將以上獲得之(*S,S*)-**G** (77.1g)吸收於乙腈(231 ml)中並在20-25°C下用DMAP (465 mg, 3.81 mmol)、DIPEA (4.86 ml, 28.6 mmol)及乙酸酐(2.51 ml, 26.7 mmol)處理1 h。用水(1.0 l)稀釋之後，溶液藉由反相層析分5部分再次純化(Redisep R_f C18, 360 g, H₂O/乙腈100:0至70:30至65:35至0:100)。將含有產物之部分在真空中濃縮以獲得白色泡沫狀物，使其與乙腈共沸，以獲得呈白色泡沫之(*S,S*)-**G** (67.0 g, 87%)。HRMS (ESI)：C₉₁H₁₄₄N₈O₄₂ ((M+2H)/2²⁺)之計算值: 1011.4762；試驗值：1011.4761。

【0067】

實例4b

(2*S*)-2,6-雙[[2-[2-[2-[2-[(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3-乙醯胺基-6-乙基-4,5-二甲基-四氫吡喃-2-基]氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-*N*-[(1*R*)-1-(6-苄基氧基己基胺甲醯基)-5-[[2-[2-[2-[2-[(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3-乙醯胺基-6-乙基-4,5-二甲基-四氫吡喃-2-基]氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]戊基]己醯胺

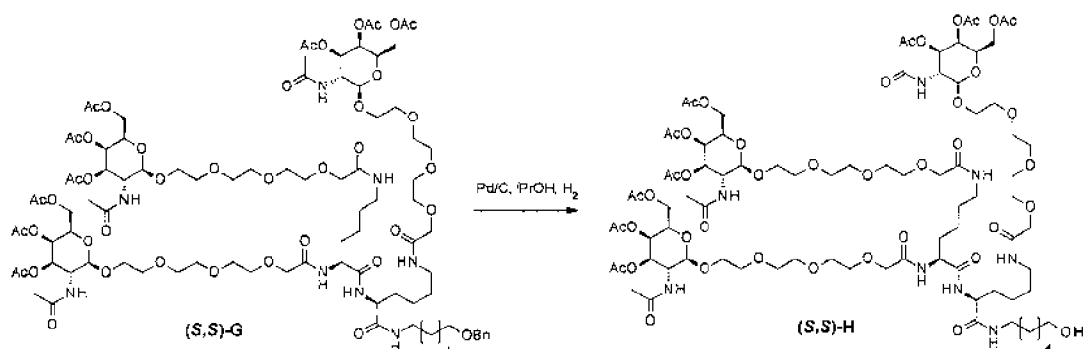


以與實例4a相同之方式但沒有再乙醯化程序，獲得呈白色泡沫之 (R,S)-G (29.1 g, 66%)。HRMS (EI)：C₉₁H₁₄₄N₈O₄₂ (M⁺)之計算值：2020.9378；試驗值：2020.9365。

【0068】

實例5a

(2S)-2,6-雙[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3-乙醯胺基-6-乙基-4,5-二甲基-四氫吡喃-2-基]氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-N-[(1S)-1-(6-羥基己基胺甲醯基)-5-[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3-乙醯胺基-6-乙基-4,5-二甲基-四氫吡喃-2-基]氧基乙氧基]-乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]戊基]己醯胺

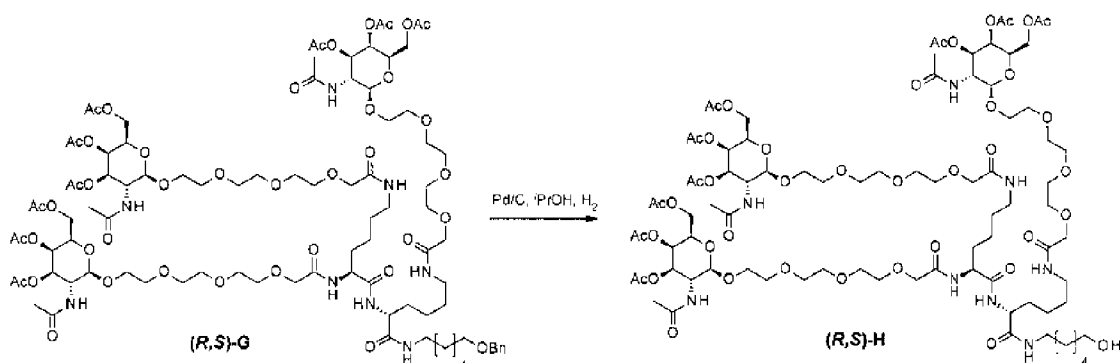


將(S,S)-G (67.0 g, 33.1 mmol)溶於2-丙醇(670 ml)中並添加碳載鈀 10% (3.8 g, 3.57 mmol)。將混合物在加壓反應器中在20°C在60巴H₂下氫化2 h。將懸浮液過濾且過濾器用2-丙醇(150 ml)洗滌。將所得無色溶液在真空中濃縮且殘餘物與乙腈(3×500 ml)共沸，以獲得呈白色泡沫之粗製(S,S)-H (61.1 g, 95%)，其不經進一步純化即使用且儲存於-20°C下。HRMS (ESI) : C₈₄H₁₃₉N₈O₄₂ (MH⁺)之計算值: 1930.8908 ; 試驗值: 1931.9004。

【0069】

實例5b

(2S)-2,6-雙[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3-乙醯胺基-6-乙基-4,5-二甲基-四氫吡喃-2-基]氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-N-[(1R)-1-(6-羥基己基胺甲醯基)-5-[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3-乙醯胺基-6-乙基-4,5-二甲基-四氫吡喃-2-基]氧基乙氧基]-乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]戊基]己醯胺

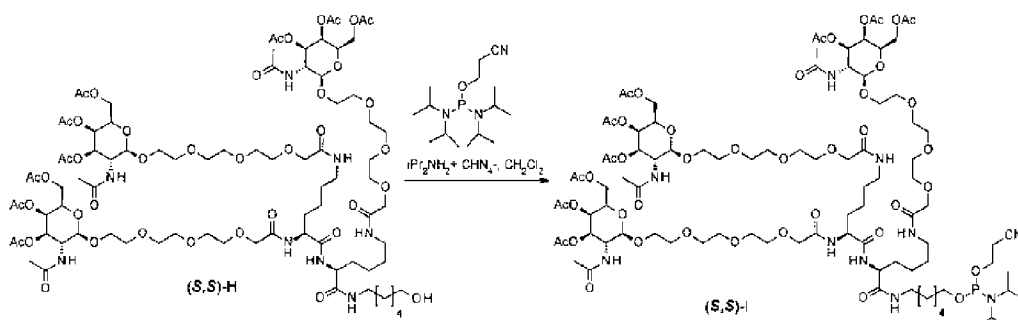


以與實例5a相同之方式，獲得呈白色泡沫之(*R,S*)-**H** (29.1 g, 定量)。
LC-MS (ESI) : $C_{84}H_{139}N_8O_{42}$ (MH^+) 之計算值：1931.9；試驗值：
1931.5。

【0070】

實例6a

(2*S*)-2,6-雙[[2-[2-[2-[2-[rac-(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3-乙醯胺基-6-乙基-4,5-二甲基-四氫吡喃-2-基]氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-*N*-[(1*S*)-1-[6-[2-氰基乙氧基-(二異丙基胺基)磷烷基]氧基己基胺甲醯基]-5-[[2-[2-[2-[2-[(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3-乙醯胺基-6-乙基-4,5-二甲基-四氫吡喃-2-基]氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]-胺基]戊基]己醯胺

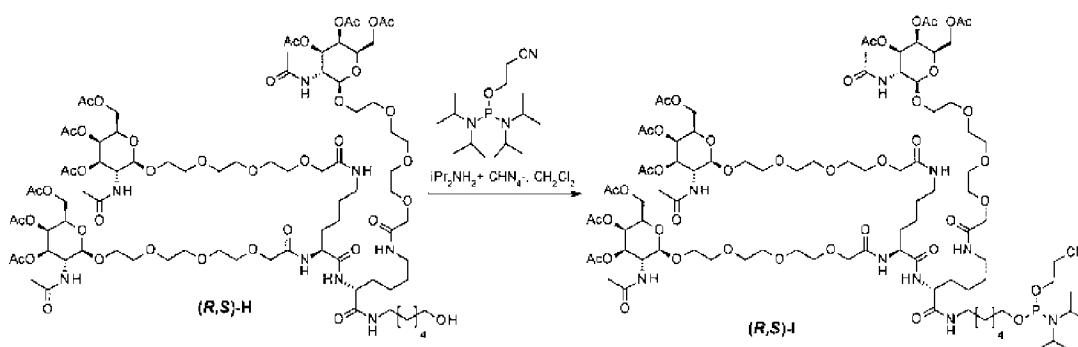


向(*S,S*)-**H** (3.4 g, 1.76 mmol)於無水二氯甲烷(20 ml)中之溶液中添加3-((雙(二異丙基胺基)磷基)氧基)丙腈(902 mg, 2.99 mmol)及二異丙基-銨四唑鹽(151 mg, 0.88 mmol)。將淡黃色溶液在20-25°C攪拌1 h。將反應混合物用TBME稀釋並直接藉由製備型層析(Redisep R_f Gold Cyano, 275 g, TBME (含有1% v/v NEt_3)/乙腈90:10至70:30)純化。將含有產物之部分在真空中濃縮，以獲得呈白色泡沫狀之(*S,S*)-**I** (3.0 g, 80%)。³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): ppm 146.32；HRMS (自無水 $CHCl_3$ 之奈米噴霧)： $C_{91}H_{144}N_8O_{42}$ ($(M+2H)/2^{2+}$) 之計算值：1066.5066；試驗值：1066.5078。

【0071】

實例6b

(2*S*)-2,6-雙[[2-[2-[2-[2-[(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3-乙醯胺基-6-乙基-4,5-二甲基-四氫吡喃-2-基]氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-*N*-[(1*R*)-1-[6-[2-氰基乙氧基-(二異丙基胺基)磷烷基]氧基己基胺甲醯基]-5-[[2-[2-[2-[2-[(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3-乙醯胺基-6-乙基-4,5-二甲基-四氫吡喃-2-基]氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]-胺基]戊基]己醯胺



向(*R,S*)-**H** (2.5 g, 1.29 mmol)於乙腈(20 ml, 經CaH₂乾燥)中之溶液中添加3-((雙(二異丙基胺基)磷基)氧基)丙腈(624 mg, 2.07 mmol)及二異丙基-銨四唑鹽(44.3 mg, 0.26 mmol)。將無色溶液於20-25°C攪拌1.5 h。將反應混合物在真空中濃縮至12 ml之體積並實施製備型層析(Redisep R_f Gold Cyano, 275 g, TBME/乙腈95:5至75:25)。將含有產物之部分在真空中濃縮，以獲得呈無色蠟狀之(*R,S*)-**I** (2.1 g, 76%)。³¹P NMR (162 MHz, DMSO-d₆): ppm 146.83。

【0072】對於固相寡核苷酸合成(SPOS)，將(*S,S*)-**I**及(*R,S*)-**I**中之任一者溶於無水MeCN或CH₂Cl₂中，以獲得0.1-0.2M溶液。將此溶液經4Å MS、3Å MS、無水K₂CO₃、鹼性活化氧化鋁、CaCl₂或CaH₂乾燥1小時且然後直接用於寡核苷酸合成器上。

【0073】

固相寡核苷酸合成

GalNAc 簇改質之 LNA/DNA 係藉由標準亞磷醯胺化學(參見 WO2017084987A1 及 WO2018215391A1)在固相上以 1 或 20 μmol 之規模在 BioAutomation Mermade 12 上或以 0.2、0.95 或 1.9 mmol 規模使用 AKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany) 產生。所用固體支撐物包括 Primer Support 5G Unylinker 200 (GE Healthcare, Freiburg, Germany)、Primer Support 5G Unylinker 350 (GE Healthcare, Freiburg, Germany) 或 Kinovate NittoPhase HL Unylinker 400。含有 2-OCH₂-4 橋接核苷酸 (Sigma-Aldrich, SAFC, Hamburg, Germany) 及 DNA (Sigma-Aldrich, SAFC, Hamburg, Germany) 之寡核苷酸係利用相應亞磷醯胺產生。以上製備之 GalNAc 簇亞磷醯胺 (*S,S*)-I 及 (*R,S*)-I 於 MeCN 或 CH₂Cl₂ 中之溶液與標準 SPOS 活化劑(例如, 4,5-二氫基咪唑(有或沒有 *N*-甲基咪唑)) 或四唑活化劑(例如 5-(苄基硫基)-1*H*-四唑或 Activator 42) 一起使用, 採用 1.5 - 4.0 當量之亞磷醯胺、30/70 - 40/60 之亞醯胺與活化劑比率及 10 - 30 min 之偶合時間。氧化係藉由有機氧化劑(例如, 樟腦磺醯基氧氮環丙烷、異丙苯氫過氧化物、第三丁基氫過氧化物或於吡啶/H₂O (9:1) 中之碘) 實施。硫醇化可藉由用於 SPOS 之標準硫醇化試劑實施, 例如 3-胺基-1,2,3-二噻唑-5-硫酮(氫化黃原素(xanthane hydride))、3-二甲基胺基-1,2,3-二噻唑-5-硫酮、3-乙氧基-1,2,4-二噻唑啉-5-酮、Beaucage 試劑或苯基乙酸二硫化物於其各別溶劑中。GalNAc 簇亞磷醯胺之偶聯不採用封端步驟。裂解及去保護係藉由該領域中已知之方法達成(Wincott F. 等人 Nucleic Acid Research, 1995, 23,14, 2677-84), 例如濃 NH₄OH (28-33%), 在 25 - 55°C 之間之溫度下。對經去保護及乾燥之粗製 GalNAc 簇改質之 LNA 鉸

鹽進行表徵且利用離子對HPLC-MS確認身份。其可藉由用於寡核苷酸之標準純化方法進行純化(例如，參見WO2018215391A1)。

(大寫字母表示β-D-氧基-LNA單元；小寫字母表示DNA單元；下標「s」表示硫代磷酸酯鏈接；上標Me表示含有5-甲基胞嘧啶鹼基之DNA或β-D-氧基-LNA單元且AM-C6表示6-胺基己基-1-磷酸酯鏈接)。

【0074】

實例7a:

5'-(S,S)-GalNAc-C6-caG_s^{Me}C_sG_st_sa_sa_sa_sg_sa_sg_sa_sG_sG-3'之合成

根據以上標準SPOS條件使用(S,S)-I，以1.9 mmol規模在AKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany)上合成標題產物。將去保護且經濃縮之粗製寡核苷酸銨鹽藉由反相HPLC純化，且在超濾/滲濾及凍乾之後，獲得呈白色凍乾物之5'-(S,S)-GalNAc-C6-caG_s^{Me}C_sG_st_sa_sa_sa_sg_sa_sg_sa_sG_sG-3'之鈉鹽(1.7 g, 87.0a% HPLC純度)。IP-RP-HPLC-HRMS (ESI) : C₂₂₀H₃₀₃N₇₆O₁₁₁P₁₅S₁₂ (M⁻)之計算值：6633.3115；試驗值：6633.3089。經¹H-¹³C-HSQC-NMR測定，表異構物純度>95% (LOD)。另外，於6M HCl中水解、游離胺基酸之衍生及離胺酸鏡像異構物於CHIRASIL VAL上之氣相層析分離均顯示99.8%之表異構物純度。

【0075】

實例7b

5'-(R,S)-GalNAc-C6-caG_s^{Me}C_sG_st_sa_sa_sa_sg_sa_sg_sa_sG_sG-3'之合成

根據以上標準SPOS條件使用(R,S)-I，以1.9 mmol規模在AKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany)上合成標題產物。將

去保護且經濃縮之粗製寡核苷酸銨鹽藉由反相HPLC純化，且在超濾/滲濾及凍乾之後，獲得呈白色凍乾物之5'-(*R,S*)-GalNAc-C6-caG_s^{Me}C_sG_st_sa_sa_sa_sg_sa_sg_sa_sG_sG-3'之鈉鹽(1.6 g, 91.6a% HPLC純度)。IP-RP-HPLC-HRMS (ESI) : C₂₂₀H₃₀₃N₇₆O₁₁₁P₁₅S₁₂ (M⁻)之計算值：6633.3115；試驗值：6633.3134。經¹H-¹³C-HSQC-NMR測定，表異構物純度>95% (LOD)。另外，於6M HCl中水解、游離胺基酸之衍生及離胺酸鏡像異構物於CHIRASIL VAL上之氣相層析分離均顯示<95.6%之表異構物純度。

【0076】

實例8a

5'-(*S,S*)-GalNAc-C6-ca^{Me}C_s^{Me}C_st_sa_st_st_st_sa_sa_sc_sa_st_sc_sA_sG_sA_s^{Me}C-3' 之合成

根據以上標準SPOS條件使用(*S,S*)-**I**，以0.2 mmol規模在AKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany)上合成標題產物。將去保護且經濃縮之粗製寡核苷酸銨鹽藉由IEX-MPLC純化，且在超濾/滲濾及凍乾之後，獲得呈白色凍乾物之5'-(*S,S*)-GalNAc-C6-ca^{Me}C_s^{Me}C_st_sa_st_st_st_sa_sa_sc_sa_st_sc_sA_sG_sA_s^{Me}C-3'之鈉鹽(350 mg, 79.1a% HPLC純度)。IP-RP-HPLC-HRMS (ESI) : C₂₅₉H₃₅₉N₇₆O₁₃₅P₁₉S₁₆ (M⁻)之計算值：7793.4109；試驗值：7793.4127。經¹H-¹³C-HSQC-NMR測定，表異構物純度>96% (LOD)。另外，於6M HCl中水解、游離胺基酸之衍生及離胺酸鏡像異構物於CHIRASIL VAL上之氣相層析分離均顯示99.8%之表異構物純度。

【0077】

實例8b

5'-(*R,S*)-GalNAc-C6-ca^{Me}C_s^{Me}C_st_sa_st_st_st_sa_sa_sc_sa_st_sc_sA_sG_sA_s^{Me}C-3' 之合成

根據以上標準SPOS條件使用(*R,S*)-**I**，以0.2 mmol規模在AKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany)上產生標題產物。將去保護且經濃縮之粗製寡核苷酸銨鹽藉由IEX-MPLC純化，且在超濾/滲濾及凍乾之後，獲得呈白色凍乾物之5'-(*R,S*)-GalNAc-C6-ca^{Me}C_s^{Me}C_st_sa_st_st_st_sa_sa_sc_sa_st_sc_sA_sG_sA_s^{Me}C-3'之鈉鹽(630 mg, 82.9a% HPLC)。IP-RP-HPLC-HRMS (ESI)：C₂₅₉H₃₅₉N₇₆O₁₃₅P₁₉S₁₆ (M⁻)之計算值：7793.4109；試驗值：7793.4127。經¹H-¹³C-HSQC-NMR測定，表異構物純度>96% (LOD)。另外，於6M HCl中水解、游離胺基酸之衍生及離胺酸鏡像異構物於CHIRASIL VAL上之氣相層析分離均顯示>95.4%之表異構物純度。

【0078】

實例9a

5'-(*S,S*)-GalNAc-C6-caT_s^{Me}C_sA_sa_sc_st_st_st_sc_sa_sc_st_st_s^{Me}C_sA_sG_s-3'之合成

根據以上標準SPOS條件使用(*S,S*)-**I**，以2*1.9 mmol規模在AKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany)上合成標題產物。將去保護且經濃縮之粗製寡核苷酸銨鹽藉由IEX-MPLC、隨後反相HPLC純化，且在超濾/滲濾及凍乾之後，獲得呈白色凍乾物之5'-(*S,S*)-GalNAc-C6-caT_s^{Me}C_sA_sa_sc_st_st_st_sc_sa_sc_st_st_s^{Me}C_sA_sG_s-3'之鈉鹽(12.5 g, 92.7a% HPLC純度)。IP-RP-HPLC-HRMS (ESI)：C₂₄₈H₃₄₆N₆₈O₁₃₃P₁₈S₁₅ (M⁻)之計算值：7441.3490；試驗值：7441.3730。經¹H-¹³C-HSQC-NMR測定，表異構物

純度>98% (LOD)。另外，於6M HCl中水解、游離胺基酸之衍生及離胺酸鏡像異構物於CHIRASIL VAL上之氣相層析分離均顯示99.6%之表異構物純度。

【0079】

實例9b

5'-(*R,S*)-GalNAc-C6-caT_s^{Me}C_sA_sa_sc_st_st_st_sc_sa_sc_st_st_s^{Me}C_sA_sG_s-3'之合成

根據以上標準SPOS條件使用(*R,S*)-**I**，以1.9 mmol規模在AKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany)上合成標題產物。將去保護且經濃縮之粗製寡核苷酸銨鹽藉由反相HPLC純化，且在超濾/滲濾及凍乾之後，獲得呈白色凍乾物之5'-(*R,S*)-GalNAc-C6-caT_s^{Me}C_sA_sa_sc_st_st_st_sc_sa_sc_st_st_s^{Me}C_sA_sG_s-3'之鈉鹽(6.0 g, 82.0a% HPLC)。IP-RP-HPLC-HRMS (ESI)：C₂₄₈H₃₄₆N₆₈O₁₃₃P₁₈S₁₅ (M⁻)之計算值：7441.3490；試驗值：7441.3508。經¹H-¹³C-HSQC-NMR測定，表異構物純度>98% (LOD)。另外，於6M HCl中水解、游離胺基酸之衍生及離胺酸鏡像異構物於CHIRASIL VAL上之氣相層析分離均顯示>97.0%之表異構物純度。

【0080】

實例10a

5'-(*S,S*)-GalNAc-C6_s-A_sA_sT_sg_sc_st_sa_sc_sa_sa_sa_sa_sc_s^{Me}C_s^{Me}C_sA-3'之合成

根據以上標準SPOS條件使用(*S,S*)-**I**，以0.95 mmol規模在AKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany)上合成標題產物。將去保護且經濃縮之粗製寡核苷酸銨鹽藉由反相HPLC純化，且在超濾/滲濾及凍乾之後，獲得呈白色凍乾物之5'-(*S,S*)-GalNAc-C6_s-

$A_sA_sT_sG_sC_sT_sA_sC_sA_sA_sA_sA_sC_s^{Me}C_s^{Me}C_sA-3'$ 之鈉鹽 (1.6 g, 87.7a% HPLC 純度)。IP-RP-HPLC-HRMS (ESI) : $C_{229}H_{318}N_{72}O_{113}P_{16}S_{16}$ (M^-) 之計算值: 6891.2684 ; 試驗值 : 6891.2714 。經 $^1H-^{13}C$ -HSQC-NMR 測定, 表異構物純度 >94% (LOD) 。另外, 於 6M HCl 中水解、游離胺基酸之衍生及離胺酸鏡像異構物於 CHIRASIL VAL 上之氣相層析分離均顯示 99.6% 之表異構物純度。

【0081】

實例 10b

$5'-(R,S)$ -GalNAc- $C6_s$ - $A_sA_sT_sG_sC_sT_sA_sC_sA_sA_sA_sA_sC_s^{Me}C_s^{Me}C_sA-3'$ 之合成
 根據以上標準 SPOS 條件使用 (R,S) -I, 以 0.95 mmol 規模在 AKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany) 上產生標題產物。將去保護且經濃縮之粗製寡核苷酸銨鹽藉由反相 HPLC 純化, 且在超濾/滲濾及凍乾之後, 獲得呈白色凍乾物之 $5'-(R,S)$ -GalNAc- $C6_s$ - $A_sA_sT_sG_sC_sT_sA_sC_sA_sA_sA_sA_sC_s^{Me}C_s^{Me}C_sA-3'$ 之鈉鹽 (2.0 g, 88.0a% HPLC) 。IP-RP-HPLC-HRMS (ESI) : $C_{229}H_{318}N_{72}O_{113}P_{16}S_{16}$ (M^-) 之計算值: 6891.2684 ; 試驗值 : 6891.2715 。經 $^1H-^{13}C$ -HSQC-NMR 測定, 表異構物純度 >95% (LOD) 。另外, 於 6M HCl 中水解、游離胺基酸之衍生及離胺酸鏡像異構物於 CHIRASIL VAL 上之氣相層析分離均顯示 99.4% 之表異構物純度。

【序列表】

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司(F.Hoffmann-La Roche AG)

<120> GalNAc亞磷醯胺表異構物

<130> P35524-WO

<150> EP19175309.4

<151> 2019-05-20

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> DNA

<213> 寡核苷酸

<400> 1
cagcgtaaag agagg 15

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> 寡核苷酸

<400> 2
cacctattta acatcagac 19

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 寡核苷酸

<400> 3
catcaacttt cacttcag 18

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> 寡核苷酸

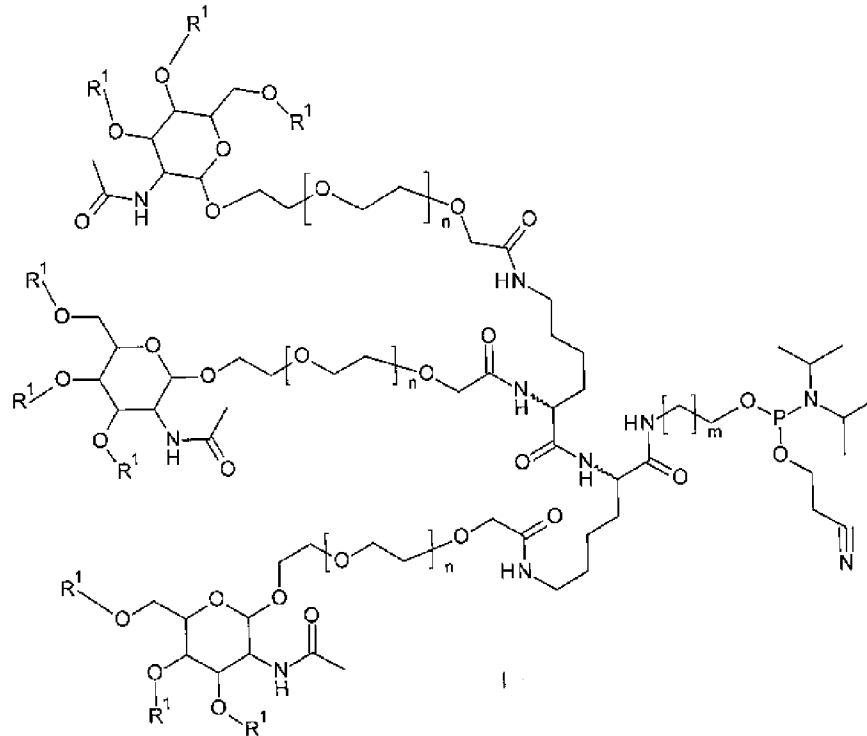
<400> 4
aatgctacaa aacca 16

I869403

【發明申請專利範圍】

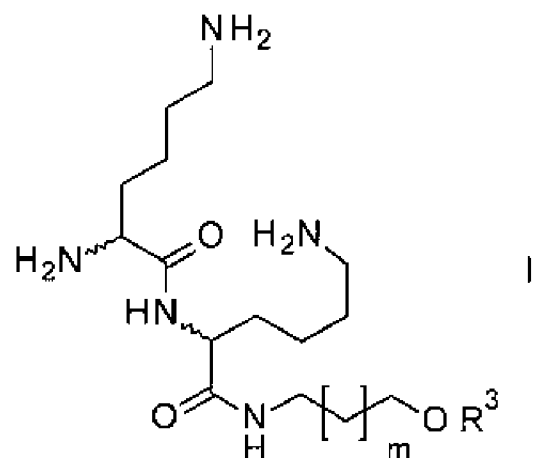
【請求項1】

一種製備式I之表異構性上純GalNAc亞磷醯胺表異構物、其相應鏡像異構物及/或光學異構物之方法，



其中 R^1 係經基保護基團， n 係0至10之整數且 m 係0至20之整數，該方法包含

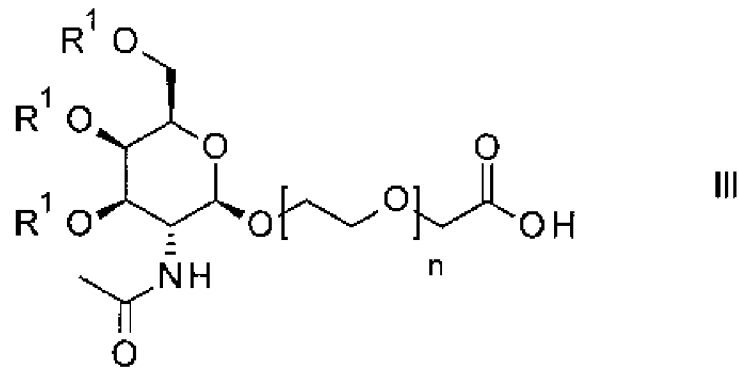
a) 使式II之表異構性上純化合物



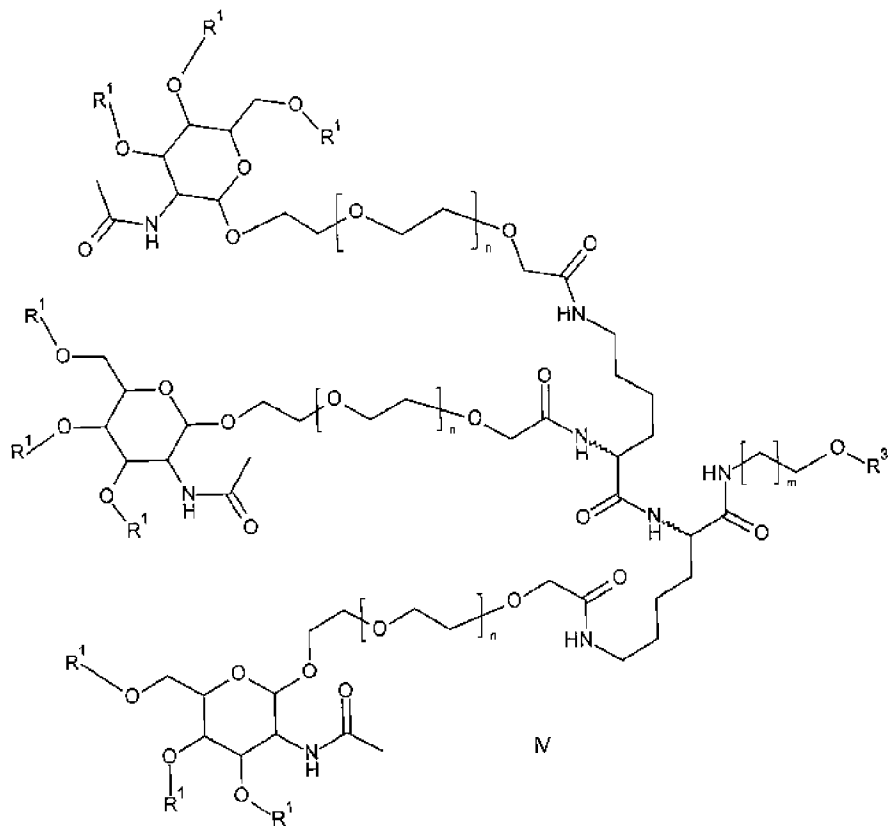
其中 R^3 係經基保護基團且 m 係如上文，或其鹽

第 1 頁(發明申請專利範圍)

與式III之GalNAc部分偶合



其中R¹及n係如上文，以形成式IV之GalNAc醯胺



其中R¹、R³、n及m係如上文；及

- b) 去除該羥基保護基團R³，以形成式IV之該GalNAc醯胺之游離醇，及
- c) 使式IV之該GalNAc醯胺之該游離醇與磷醯胺化劑反應，以形成該式I之該GalNAc亞磷醯胺表異構物。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中 R^1 係醯基。

【請求項3】

如請求項1或2之方法，其中 R^1 係 C_{1-6} -烷基羰基，其視情況經 C_{1-6} -烷基或苯基取代。

【請求項4】

如請求項1或2之方法，其中 n 係0至5之整數且 m 係0至10之整數。

【請求項5】

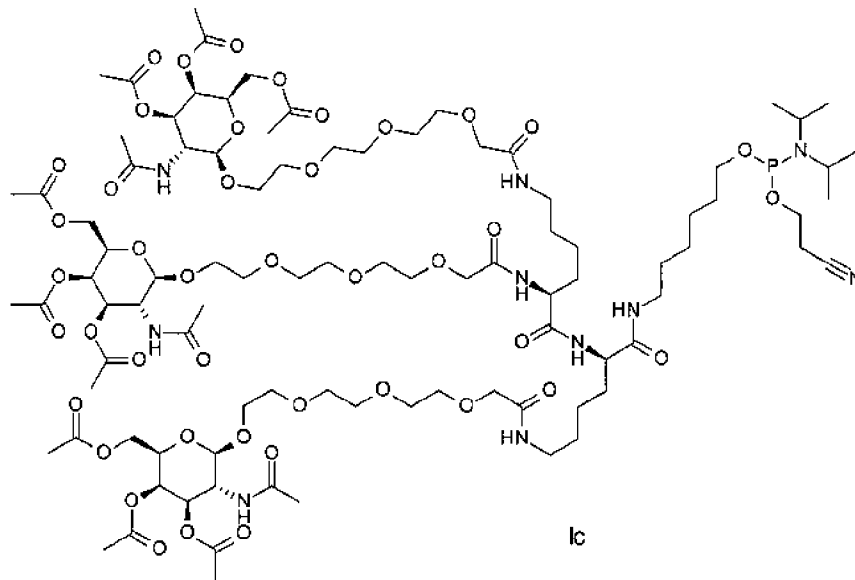
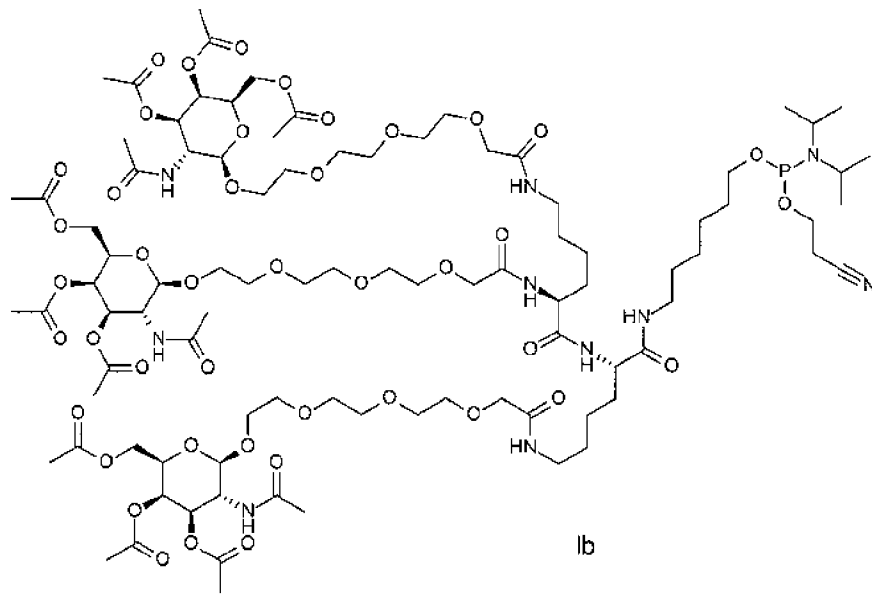
如請求項2之方法，其中 R^1 係乙醯基， n 係2且 m 係5。

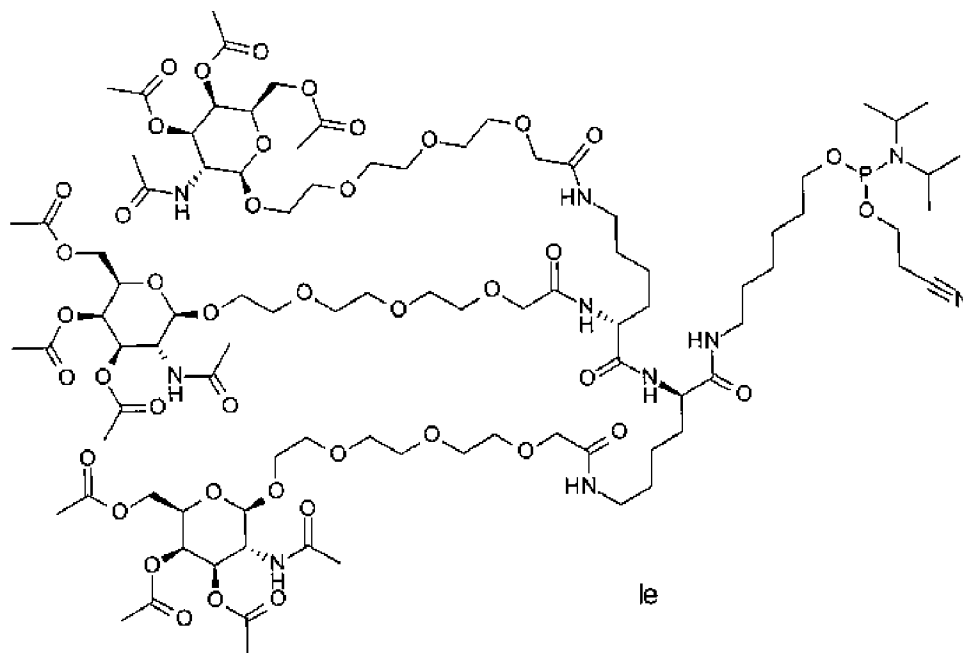
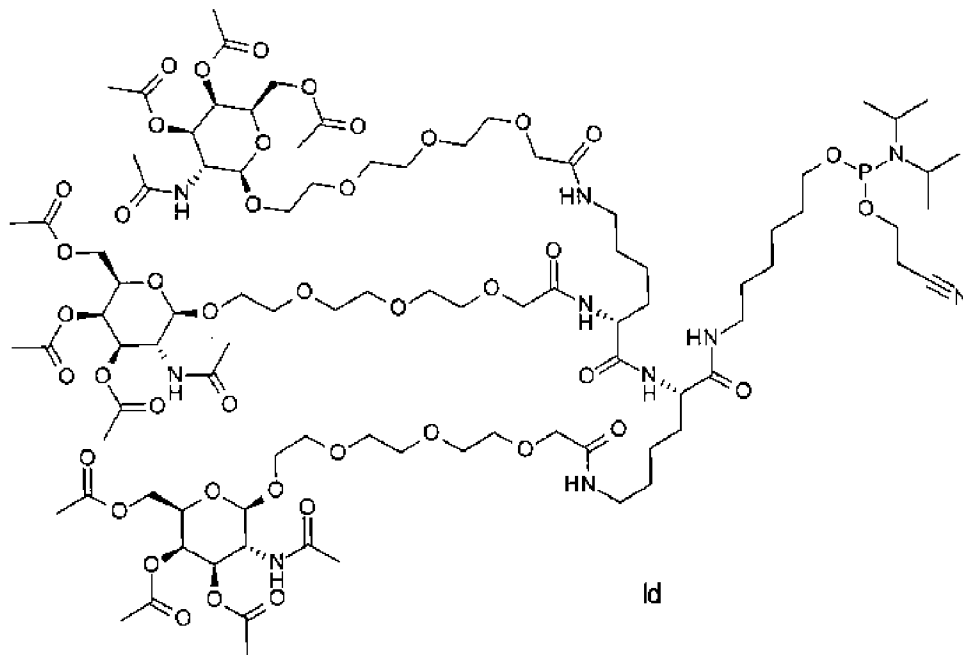
【請求項6】

如請求項1、2及5中任一項之方法，其中 R^3 係苄基。

【請求項7】

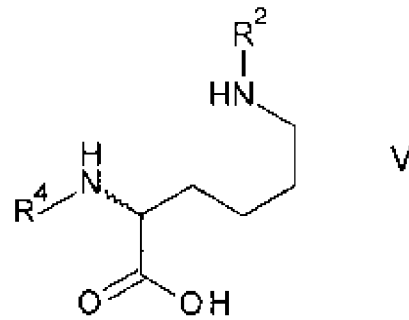
如請求項1、2及5中任一項之方法，其中該式I包含式Ib至Ie之GalNAc亞磷醯胺表異構物



**【請求項8】**

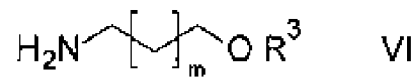
如請求項1、2及5中任一項之方法，其中該式II之表異構性上純化合物係藉由以下製備

a1) 使式V之離胺酸化合物



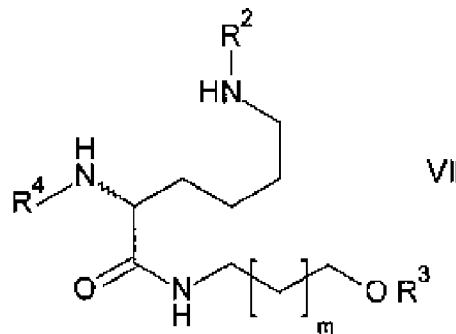
其中 R^2 及 R^4 係胺基保護基團

與式VI之胺偶合



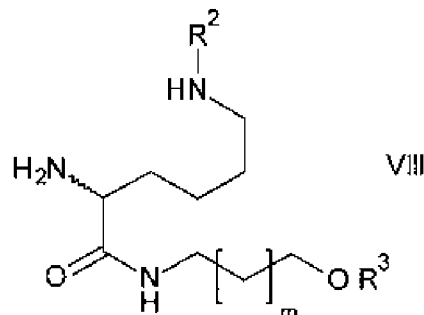
其中 R^3 及 m 係如請求項1中所定義

以形成式VII之羧醯胺；



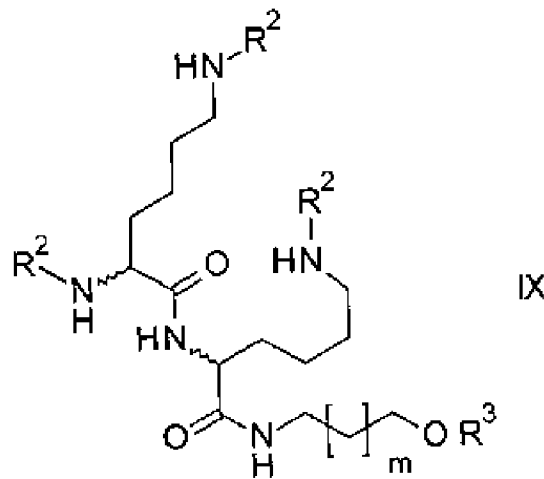
其中 R^2 、 R^3 、 R^4 及 m 係如上文，及

b1) 去除該胺基保護基團 R^4 以形成式VIII之胺



其中 R^2 、 R^3 及 m 係如上文；

c1) 使式VIII之該胺與胺基經保護之離胺酸偶合，以形成式IX之二肽



其中 R^2 及 R^3 及 m 係如上文；及

d1) 去除該等胺基保護基團 R^2 ，以形成該式II之表異構性上純化合物。

【請求項9】

如請求項8之方法，其中該等偶合步驟a1)及c1)係在肽偶合劑、胺鹼及有機溶劑之存在下實施。

【請求項10】

如請求項8之方法，其中該肽偶合劑係正丙基膦酸酐，該胺鹼係三級胺，該有機溶劑係極性非質子溶劑且反應溫度選自 20°C 至 70°C 。

【請求項11】

如請求項8之方法，其中 R^4 係在鹼性條件下可裂解之胺基保護基團。

【請求項12】

如請求項11之方法，其中該等鹼性條件涉及利用脂肪族二級胺在有機溶劑之存在下處理。

【請求項13】

如請求項8之方法，其中該胺基保護基團 R^2 係第三丁基氧基羰基。

【請求項14】

如請求項8之方法，其中在步驟d1)中，該胺基保護基團 R^2 係在酸性條件下去除且利用各別酸形成式IX之二肽之三-銨鹽。

【請求項15】

如請求項14之方法，其中該酸係磺酸。

【請求項16】

如請求項1、2及5中任一項之方法，其中在步驟a)中，該式II之表異構性上純化合物與該式III之該GalNAc部分之該偶合係在肽偶合劑、胺鹼及有機溶劑之存在下實施。

【請求項17】

如請求項16之方法，其中該肽偶合劑係正丙基膦酸酐，該胺鹼係三級胺，該有機溶劑係極性非質子溶劑且反應溫度選自 20°C 至 70°C 。

【請求項18】

如請求項1、2及5中任一項之方法，其中在步驟b)中，該去除該羥基保護基團 R^3 以形成該游離醇係利用氫在氫化觸媒之存在下藉助催化氫化實施。

【請求項19】

如請求項1、2及5中任一項之方法，其中步驟c)中之該磷醯胺化劑係選自2-氰基乙基-N,N-二-(2-丙基)氯亞磷醯胺或2-氰基乙基-N,N,N',N'-四(2-丙基)亞磷醯二胺。

【請求項20】

如請求項19之方法，其中步驟c)中之該反應係利用2-氰基乙基-N,N,N',N'-四(2-丙基)亞磷醯二胺在二級胺之酸性銨鹽及極性非質子溶劑之存在下在 -20°C 與 50°C 之間之反應溫度下實施。

【請求項21】

一種如請求項1至20中任一項之方法的用途，其用於製備包含GalNAc部分作為單一表異構物之GalNAc簇寡核苷酸偶聯物。

【請求項22】

如請求項21之用途，其中GalNAc簇寡核苷酸偶聯物之該製備包含

a) 根據請求項1至20製備式I之GalNAc亞磷醯胺表異構物；

b) 在固相寡核苷酸合成中，將該式I之該GalNAc亞磷醯胺表異構物連同期望核苷建構組元以期望序列一起使用，以形成結合至固體支撐物之期望GalNAc簇寡核苷酸偶聯物，及最後

c) 使該GalNAc簇寡核苷酸偶聯物自該固相支撐物裂解並完全去保護並純化。