

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 963 336**

51 Int. Cl.:

C08G 79/02 (2006.01)

C07F 9/6558 (2006.01)

C07F 9/6561 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2018** **PCT/US2018/052524**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2019** **WO19060862**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2018** **E 18859106 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2023** **EP 3672601**

54 Título: **Procesos para preparar oligómeros de fosforodiamidato morfolino mediante síntesis de flujo rápido**

30 Prioridad:

25.09.2017 US 201762562741 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2024

73 Titular/es:

SAREPTA THERAPEUTICS, INC. (50.0%)
215 First Street
Cambridge, MA 02142, US y
MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(50.0%)

72 Inventor/es:

TOTARO, KYLE, A.;
SIMON, MARK, D.;
ZHOU, MING;
ZONG, HONG;
HANSON, GUNNAR, J. y
PENTELUTE, BRADLEY, L.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 963 336 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procesos para preparar oligómeros de fosforodiamidato morfolino mediante síntesis de flujo rápido

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos N° 62/562,741, presentada el 25 de septiembre de 2017.

10 CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La tecnología antisentido proporciona un medio para modular la expresión de uno o más productos genéticos específicos, incluidos productos de empalme alternativos, y es excepcionalmente útil en una serie de aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de investigación. El principio detrás de la tecnología antisentido es que un compuesto antisentido, por ejemplo, un oligonucleótido, que se hibrida con un ácido nucleico diana, modula las actividades de expresión génica tales como la transcripción, el empalme o la traducción a través de cualquiera de varios mecanismos antisentido. La especificidad de secuencia de los compuestos antisentido los hace atractivos como herramientas para la validación de objetivos y la funcionalización de genes, así como como terapias para modular selectivamente la expresión de genes implicados en enfermedades.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es provocada por un defecto en la expresión de la proteína distrofina. El gen que codifica la proteína contiene 79 exones repartidos en más de 2 millones de nucleótidos de ADN. Cualquier mutación exónica que cambie el marco de lectura del exón, o introduzca un codón de detención, o se caracterice por la eliminación de un exón o exones completos fuera del marco, o duplicaciones de uno o más exones, tiene el potencial de interrumpir la producción de distrofina funcional, dando por resultado DMD.

Los ensayos clínicos recientes que prueban la seguridad y eficacia de los oligonucleótidos de conmutación de empalme (SSO) para el tratamiento de la DMD se basan en la tecnología SSO para inducir un empalme alternativo de pre-ARNm mediante el bloqueo estérico del espliceosoma (Cirak *et al.*, 2011; 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 tratar la DMD son limitadas.

Eteplirsén es un oligómero de fosforodiamidato morfolino (PMO) diseñado para omitir el exón 51 del gen de la distrofina humana en pacientes con DMD que son susceptibles de omitir el exón 51 para restaurar el marco de lectura y producir una forma funcional más corta de la proteína distrofina. El eteplirsén ha recibido la aprobación de la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA) para el tratamiento de la DMD.

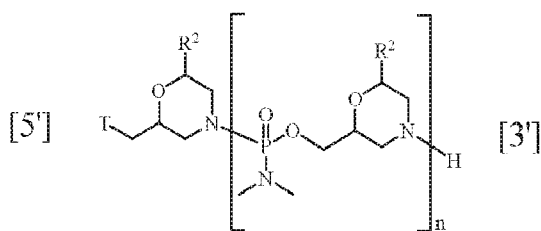
WO2017/062835 un oligómero antisentido capaz de inducir la omisión de exón durante el procesamiento de pre-ARNm de distrofina, en el que el oligómero es un oligómero de fosforodiamidato morfolino (PMO).

Aunque se han logrado avances significativos en el campo de la tecnología antisentido, sigue existiendo una necesidad en la técnica por métodos para preparar oligómeros de fosforodiamidato morfolino con un rendimiento antisentido o antigénico mejorado.

45 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 eficiente de PMO utilizando un catalizador ácido de Lewis mientras se mantiene el rendimiento general y la pureza de un PMO sintetizado. Además se proporciona en la presente un procedimiento de síntesis de PMO de flujo continuo.

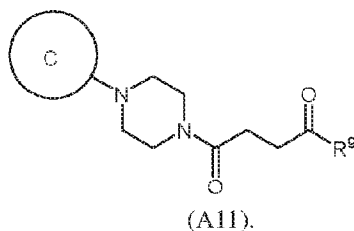
Por consiguiente, en un aspecto, en la presente se proporciona un proceso para preparar un compuesto oligomérico de la Fórmula (I):



(I)

utilizando un catalizador ácido de Lewis.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un proceso continuo para preparar un compuesto oligomérico de la Fórmula (A11):



En una realización, el proceso continuo para preparar un compuesto oligomérico de la Fórmula (A11) se lleva a cabo en un reactor de flujo continuo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la estabilidad del monómero de adenosina, con o sin LiBr, a 90°C, 100°C, 110°C y 150°C.

La Figura 2 muestra la estabilidad del PMO unido a resina.

La Figura 3 muestra la detritilación a 90°C usando: A) Collidina TFA; B) lutidina TFA; C) Piridina TFA; y D) 4-cianopiridina TFA.

La Figura 4 muestra un esquema completo de un sintetizador PMO de flujo.

La Figura 5A, Figura 5B, Figura 5C, Figura 5D, y La Figura 5E muestran el cromatograma de iones totales para la síntesis del tetrámero modelo 5'-Tail-ACGT-3'-Trt.

La Figura 6A, Figura 6B, Figura 6C, Figura 6D, y La Figura 6E muestran el cromatograma de iones totales para la síntesis de eteplirsén (1-10). También se muestran los espectros de masas MALDI-TOF.

La Figura 7 muestra la representación de la parte superior del depósito de reactivo seccionada que tiene tres puertos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente se proporcionan procesos para preparar un oligómero de morfolino útil para aplicaciones de terapia antisentido. La terapia antisentido es una vía atractiva para el tratamiento de enfermedades genéticas graves e infecciones virales. Las terapias antisentido son polímeros de nucleobases sintéticas que se unen al ARNm mediante el emparejamiento de bases complementarias de Watson-Crick y provocan un empalme alternativo o inhibición de la traducción, produciendo proteínas alteradas o niveles reducidos de proteínas (S. Cirak, V. Arechavala-Gomez, M. Guglieri, L. Feng, S. Torelli, K. Anthony, S. Abbs, M. E. Garralda, J. Bourke, D. J. Wells, et al., *Lancet* 2011, 378, 595-605) (J. H. Chan, S. Lim, W. F. Wong, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2006, 33, 533-540). De esta manera, se pueden desactivar proteínas virales críticas, se pueden escindir exones con mutaciones de cambio de marco letales para producir una proteína truncada funcional o se puede suprimir la expresión de genes oncogénicos. Los oligómeros de fosfordiamidato morfolino (PMO) son una clase de agentes terapéuticos antisentido en los que el anillo ribosil de ARN de 5 miembros se ha reemplazado por un anillo de morfolino de 6 miembros y los enlaces fosfato se han reemplazado con fosfordiamidatos sin carga (J. Summerton, D. Weller, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1997, 7, 187-195). Estas modificaciones hacen que los PMO sean resistentes a las nucleasas (RM Hudziak, E. Barofsky, DF Barofsky, DL Weller, S.-B. Huang, DD Weller, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1996, 6, 267-272) y posiblemente más permeables a las células que el ARN desnudo (V. Arora, DC Knapp, MT Reddy, DD Weller, PL Iversen, *J. Pharm.* 2002, 91, 1009-1018). Actualmente se están investigando varios PMO, incluidos análogos estructurales de segunda generación conocidos como PMO-X^{MR} y conjugados de péptido-PMO conocidos como PPMO. Recientemente se aprobó un fármaco de primera clase para la distrofia muscular de Duchenne, Exondys 51^{MR} (eteplirsén) (C. A. Stein, *Mol. Ther.* 2016, 24, 1884-1885) por la FDA, y se están llevando a cabo ensayos para el tratamiento del Dengue (K. L. Holden, D. A. Stein, T. C. Pierson, A. A. Ahmed, K. Clyde, P. L. Iversen, E. Harris, *Virology* 2006, 344, 439-452), Marburg (P. L. Iversen, T. K. Warren, J. B. Wells, N. L. Garza, D. V Mourich, L. S. Welch, R. G. Panchal, S. Bavari, *Viruses* 2012, 4, 2806-30), Ébola (P. L. Iversen, T. K. Warren, J. B. Wells, N. L. Garza, D. V Mourich, L. S. Welch, R. G. Panchal, S. Bavari, *Viruses* 2012, 4, 2806-30) e infecciones virales de la influenza (Q. Ge, M. Pastey, D. Kobasa, P. Puthavathana, C. Lupfer, R. K. Bestwick, P. L. Iversen, J. Chen, D. A. Stein, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50, 3724-33).

A pesar de la amplitud de posibles objetivos de enfermedades, la preparación prolongada de los PMO limita su exploración y aplicación. Para aliviar este problema y permitir la identificación y producción eficiente de estas composiciones, en la

presente se proporciona una síntesis eficiente de PMO utilizando un ácido de Lewis, así como un procedimiento de síntesis de PMO de flujo continuo.

Definiciones

5

A continuación se enumeran las definiciones de varios términos utilizados para describir esta divulgación. Estas definiciones se aplican a los términos tal como se utilizan en esta especificación y reivindicaciones, a menos que se limiten de otro modo en casos específicos, ya sea individualmente o como parte de un grupo más grande.

10

"Base protegida" o "protección de base" se refiere a la protección de los grupos de emparejamiento de bases, por ejemplo, bases purina o pirimidina, en las subunidades de morfolino con grupos protectores adecuados para evitar la reacción o interferencia de los grupos de emparejamiento de bases durante la síntesis gradual de oligómeros. (Un ejemplo de una subunidad morfolino protegida con base es el Compuesto (C) de la subunidad C activada que tiene un grupo protector CBZ en el grupo amino de la citosina que se muestra a continuación).

15

Un "grupo fosforamido activado" es habitualmente un grupo clorofosforamido, que tiene la sustitución en el nitrógeno deseada en el enlace fosforodiamido final en el oligómero. Un ejemplo es clorofosforamido de (dimetilamino), es decir, $-OY(=O)(NMe_2)Cl$.

20

El término "unido a soporte" se refiere a una entidad química que está unida covalentemente a un medio de soporte.

25

El término "medio soporte" se refiere a cualquier material que incluye, por ejemplo, cualquier partícula, perla o superficie, sobre la cual se puede unir o sintetizar un oligómero, o se puede modificar para la unión o síntesis de un oligómero. Los sustratos representativos incluyen, entre otros, soportes inorgánicos y soportes orgánicos tales como vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluidos acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibuteno, poliuretanos, TEFLON, etc.), polisacáridos, nailon o nitrocelulosa, cerámica, resinas, sílice o materiales a base de sílice, incluidos silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, plásticos, haces de fibras ópticas y una variedad de otros polímeros. El medio de soporte y las superficies sólidas particularmente útiles para algunas realizaciones están ubicados dentro de un reactor de flujo continuo. En algunas realizaciones de los procesos descritos en la presente, el medio soporte comprende poliestireno con divinilbenceno reticulado al 1%.

35

En algunas realizaciones, los medios de soporte representativos comprenden al menos un sitio reactivo para la unión o síntesis de un oligómero. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un medio soporte de la divulgación comprende uno o más grupos amino o hidroxilo terminales capaces de formar un enlace químico con una subunidad entrante u otro grupo activado para unir o sintetizar un oligómero.

40

Algunos medios de soporte representativos que son susceptibles de los procesos descritos en la presente incluyen, entre otros, los siguientes: vidrio de poros controlados (CPG): vidrio de poros controlados por oxalilo (ver, por ejemplo, Alul, et al., Nucleic Acids Research 1991, 19, 1527); partículas que contienen sílice, tales como perlas de vidrio porosas y gel de sílice como el formado por la reacción de tricloro-[3-(4-clorometil)fenil] propilsilano y perlas de vidrio porosas (ver Parr y Grolimann, Angew. Química. Interno. Ed. 1972, 11, 314, vendido bajo la marca comercial "PORASIL E" por Waters Associates, Framingham, Mass., EE.UU.); un monoéster de 1,4-dihidroximetilbenceno y sílice (ver Bayer y Jung, Tetrahedron Lett., 1970, 4503, vendido bajo la marca comercial "BIOPAK" por Waters Associates); TENTAGEL (ver, por ejemplo, Wright, et al., Tetrahedron Letters 1993, 34, 3373); matriz de perlas de copolímero de estireno/divinilbenceno reticulado, o POROS, un copolímero de poliestireno/divinilbenceno (disponible en Perceived Biosystems); medio de soporte soluble tal como polietilenglicol PEG (ver Bonora et al., Organic Process Research & Development, 2000, 4, 225-231); Soporte de PEPS, que es una película de polietileno (PE) con injertos colgantes de poliestireno (PS) de cadena larga (ver Berg, et al., J. Am. Chem. Soc., 1989, 111, 8024 y la solicitud de patente internacional WO 1990/ 02749); copolímeros de dimetilacrilamida reticulados con N,N'-bisacriloletilendiamina, incluyendo una cantidad conocida de N-tercbutoxicarbonil-beta-alanil-N'-acriloleilhexametildiamina (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 recubiertas con un polímero de estireno reticulado hidrófobo (ver Scott, et al., J. Chrom. Sci., 1971, 9, 577); polímero de etileno fluorado sobre el cual se ha injertado poliestireno (ver Kent y Merrifield, Israel J. Chem. 1978, 17, 243 y van Rietschoten en Peptides 1974, Y. Wolman, Ed., Wiley and Sons, Nueva York, 1975, págs. 113-116); membranas de polipropileno recubiertas con hidroxipropilacrilato (Daniels, et al., Tetrahedron Lett. 1989, 4345); varillas de polietileno injertadas con ácido acrílico (Geysen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81, 3998); una "bolsita de té" que contiene perlas poliméricas utilizadas tradicionalmente (Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 5131); y combinaciones de los mismos.

60

El término "reactor de flujo continuo" se refiere a una cámara que comprende una superficie (por ejemplo, una superficie sólida) a través de la cual pueden fluir uno o más reactivos fluidos (por ejemplo, líquidos o gases). En una realización, la cámara puede ser, pero no se limita a, un mezclador de unión, un recipiente de mezcla, un reactor de bobina, un reactor de tubo, un reactor de disco giratorio, un reactor de tubo giratorio, un reactor de flujo de células múltiples, un reactor oscilatorio, reactor de flujo, o un microrreactor. En una realización adicional, la cámara contiene un reactivo químico soportado en un sólido. En una realización particular, el reactivo químico soportado en sólido está confinado dentro de la cámara mediante un filtro.

65

El término "agente de desbloqueo" se refiere a una composición (por ejemplo, una solución) que comprende un ácido químico o una combinación de ácidos químicos para eliminar grupos protectores. Los ácidos químicos ejemplares usados en agentes de desbloqueo incluyen ácidos halogenados, por ejemplo, ácido cloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloraacético, ácido fluoroacético, ácido difluoroacético y ácido trifluoroacético. En algunas realizaciones, un agente de desbloqueo elimina uno o más grupos tritilo de, por ejemplo, un oligómero, un oligómero unido a un soporte, una subunidad unida a un soporte u otro resto de nitrógeno u oxígeno protegido.

Los términos "halógeno" y "halo" se refieren a un átomo seleccionado del grupo formado por flúor, cloro, bromo y yodo.

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

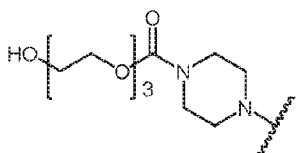
El término "agente de escisión" se refiere a una composición (por ejemplo, una solución líquida o mezcla gaseosa) que comprende una base química (por ejemplo, amoníaco o 1,8-diazabicycloundec-7-eno) o una combinación de bases químicas útiles para escindir, por ejemplo por ejemplo, un oligómero unido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

El término "agente desprotector" se refiere a una composición (por ejemplo, una solución líquida o mezcla 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 Eliminación de grupos protectores. Por ejemplo, un agente desprotector, en algunas realizaciones, puede eliminar la protección de base de, por ejemplo, una subunidad de morfolino, subunidades de morfolino de un oligómero de morfolino o versiones unidas a soporte de los mismos.

El término "solvente" se refiere a un componente de una solución o mezcla en la que se disuelve un soluto. Los solventes pueden ser inorgánicos u orgánicos (p. ej., ácido acético, acetona, acetonitrilo, acetil acetona, 2-aminoetanol, anilina, anisol, benceno, benzonitrilo, alcohol bencílico, 1-butanol, 2-butanol, i-butanol, 2-butanona, alcohol t-butilico, disulfuro de carbono, tetracloruro de carbono, clorobenceno, cloroformo, ciclohexano, ciclohexanol, ciclohexanona, ftalato de di-n-butilo, 1,1-dicloroetano, 1,2-dicloroetano, dietilamina, dietilenglicol, diglima, dimetoxietano (glima), N,N-dimetilanilina, dimetilformamida, dimetilftalato, dimetilsulfóxido, dioxano, etanol, éter, 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-propanol, piridina, tetrahidrofurano, tolueno, agua, p-xileno).

Las frases "oligómero de morfolino" y "oligómero de morfolino fosforodiamidato" u "PMO" se refieren a un oligómero que tiene subunidades de morfolino unidas entre sí mediante enlaces fosforodiamidato, uniendo el nitrógeno de morfolino de una subunidad al carbono exocíclico 5' de una subunidad adyacente. Cada subunidad de morfolino comprende un resto de emparejamiento de nucleobases eficaz para unirse, mediante enlaces de hidrógeno específicos de nucleobase, a una nucleobase en un objetivo.

El término "cola de EG3" se refiere a restos de trietilenglicol conjugados con el oligómero, por ejemplo, en su extremo 3' o 5'. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la "cola de EG3" conjugada con el extremo 3' de un oligómero puede tener la estructura:



Los términos "alrededor" o "aproximadamente" en general los entienden personas con conocimientos en el área temática relevante, pero en ciertas circunstancias pueden significar dentro de $\pm 10\%$, o dentro de $\pm 5\%$, de un valor o intervalo dado.

Procesos para Preparar Oligómeros de Morfolino en un Procedimiento Por Lotes o de Flujo Rápido

En la presente se proporciona una síntesis eficaz de PMO utilizando un ácido de Lewis. También se proporciona en la presente un procedimiento de síntesis de PMO de flujo continuo (también denominado en la presente "síntesis continua" o "síntesis de flujo rápido").

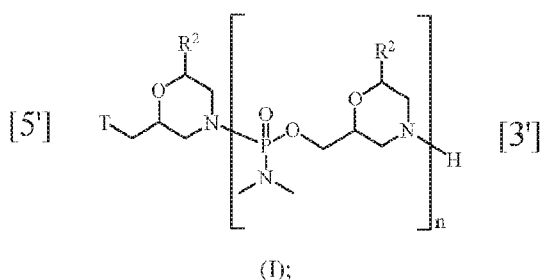
La síntesis en general se lleva a cabo, como se describe en la presente, sobre un medio de soporte. En una realización, se proporciona en la presente un primer sintón (por ejemplo, un monómero, tal como una subunidad de morfolino) que primero se une a un medio de soporte, y luego el oligómero se sintetiza acoplando secuencialmente subunidades al sintón unido al soporte en presencia de un catalizador ácido de Lewis. Este alargamiento iterativo finalmente da como resultado un compuesto oligomérico final. Este proceso se puede llevar a cabo mediante una síntesis de flujo rápido, que se describe

en la presente. Las ventajas del flujo rápido son reacciones más rápidas, optimización rápida, productos más limpios, fácil ampliación, reacciones más seguras y la integración de procesos habitualmente separados.

Los medios de soporte adecuados pueden ser solubles o insolubles, o pueden poseer una solubilidad variable en diferentes solventes para permitir que el polímero unido al soporte en crecimiento esté dentro o fuera de la solución, según se desee. Los medios de soporte tradicionales son en su mayor parte insolubles y se colocan rutinariamente en recipientes de reacción mientras los reactivos y solventes reaccionan con la cadena en crecimiento y/o lavan hasta que el oligómero ha alcanzado la longitud objetivo, después de lo cual se escinde del soporte y, si es necesario, se elabora adicionalmente para producir el compuesto polimérico final. Procedimientos más recientes han introducido soportes solubles que incluyen soportes poliméricos solubles para permitir precipitar y disolver el producto sintetizado iterativamente en puntos deseados de la síntesis (Gravert et al., Chem. Rev., 1997, 97, 489-510).

También se proporcionan en la presente procesos para preparar oligómeros de morfolino.

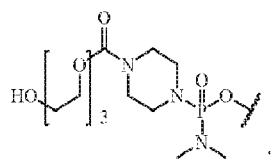
Por consiguiente, en un aspecto, en la presente se proporciona un proceso para preparar un compuesto oligomérico de la Fórmula (I):



en donde

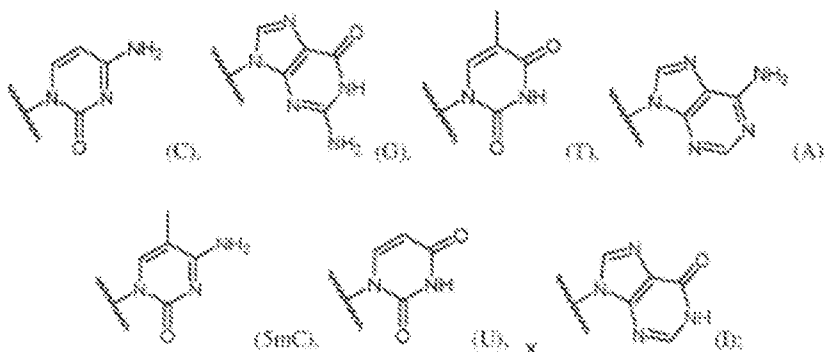
n es un número entero de 9 a 39;

T es OH o



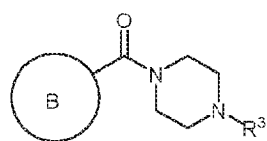
y

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



en donde el proceso comprende los pasos secuenciales de:

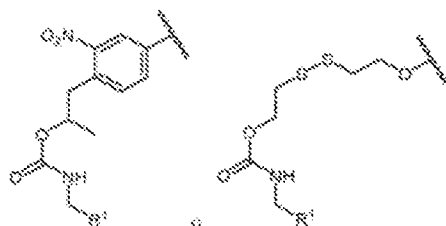
(a) poner en contacto un compuesto de la Fórmula (A1):



(A1);

en donde

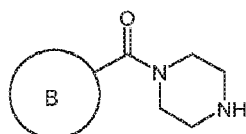
B es



R¹ es un medio de soporte; y

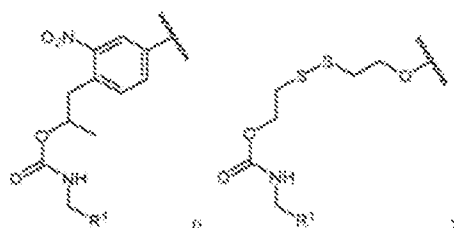
R³ se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo;

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



(II);

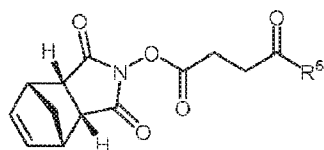
en donde B es



y

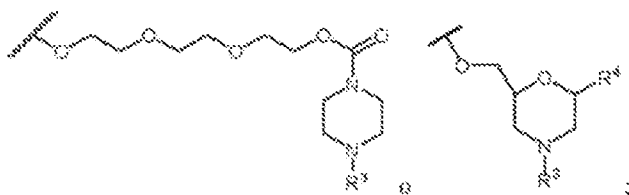
R¹ es un medio de soporte;

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



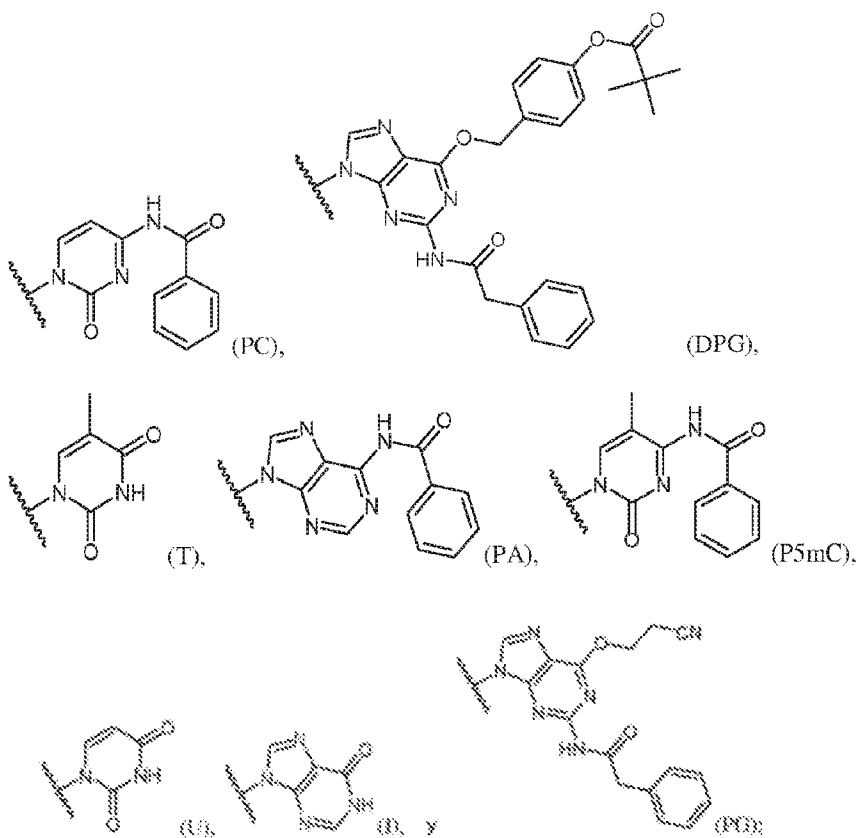
(A2);

En donde R⁵ es

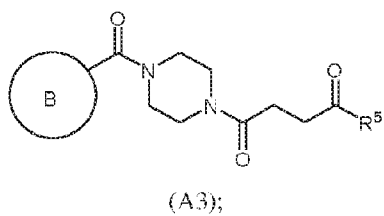


R^3 se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y

R^4 se selecciona del grupo que consiste en:

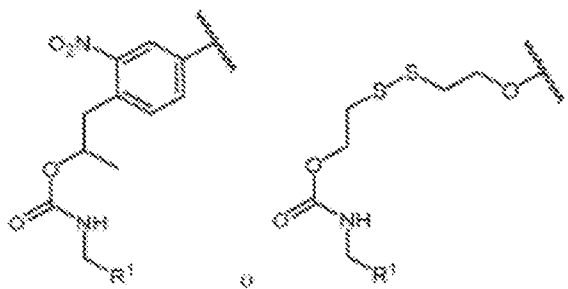


para formar un compuesto de la Fórmula (A3):



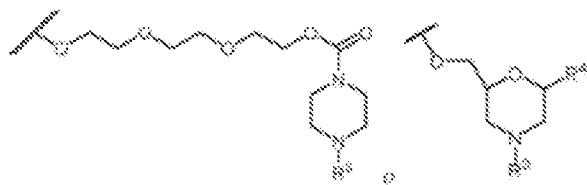
en donde

B es



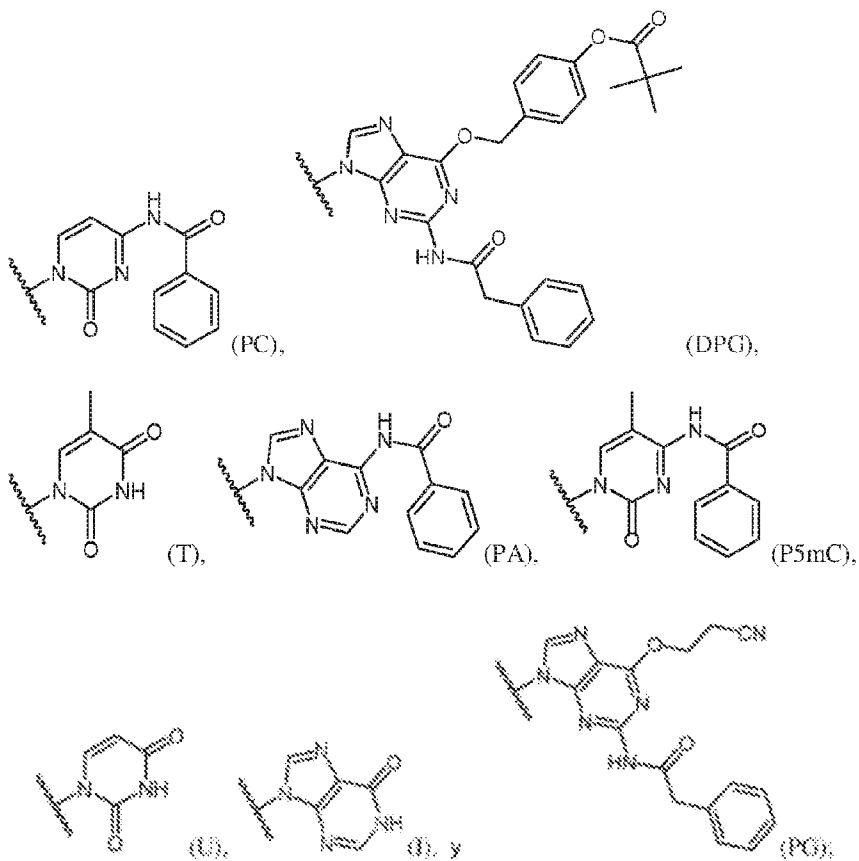
R¹ es un medio de soporte;

R⁵ es

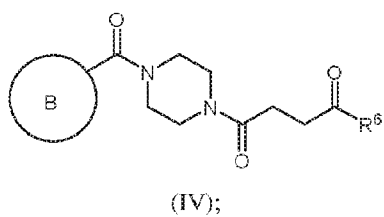


R³ se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y

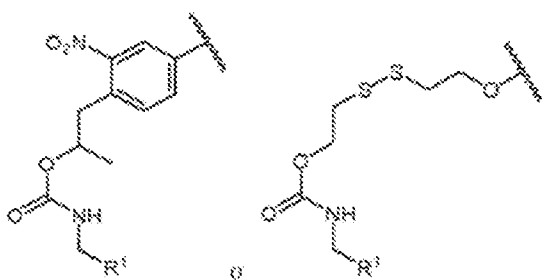
R⁴ se selecciona del grupo que consiste en:



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

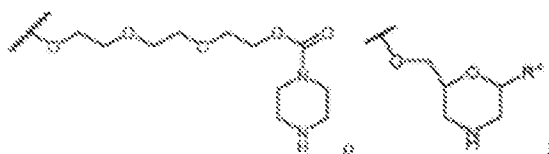


en donde B es



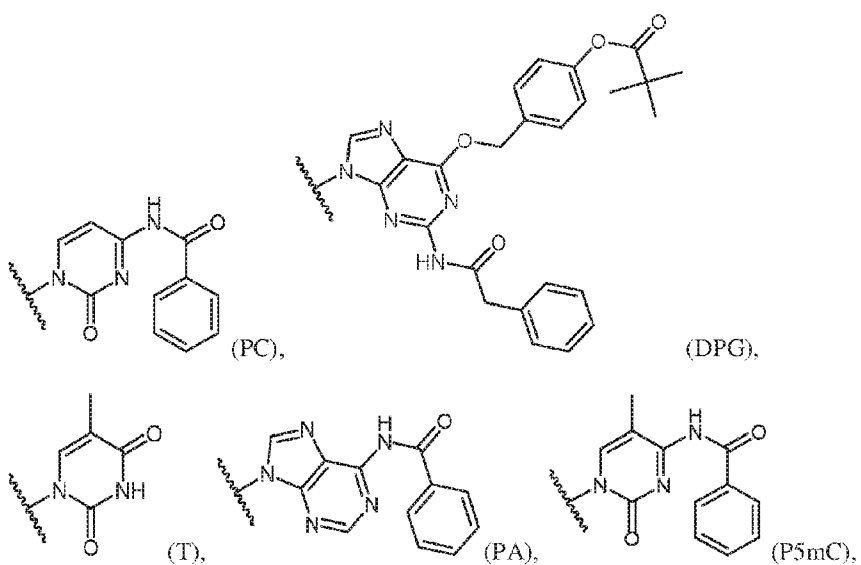
R^1 es un medio de soporte;

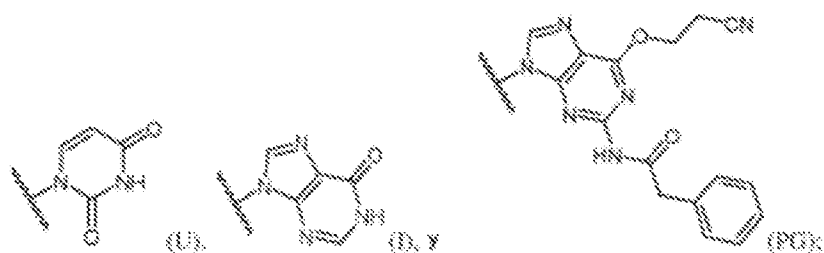
R^6 es



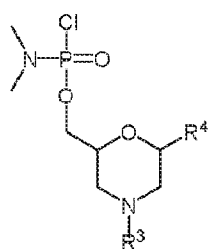
y

R^4 se selecciona del grupo que consiste en:





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



(A4)

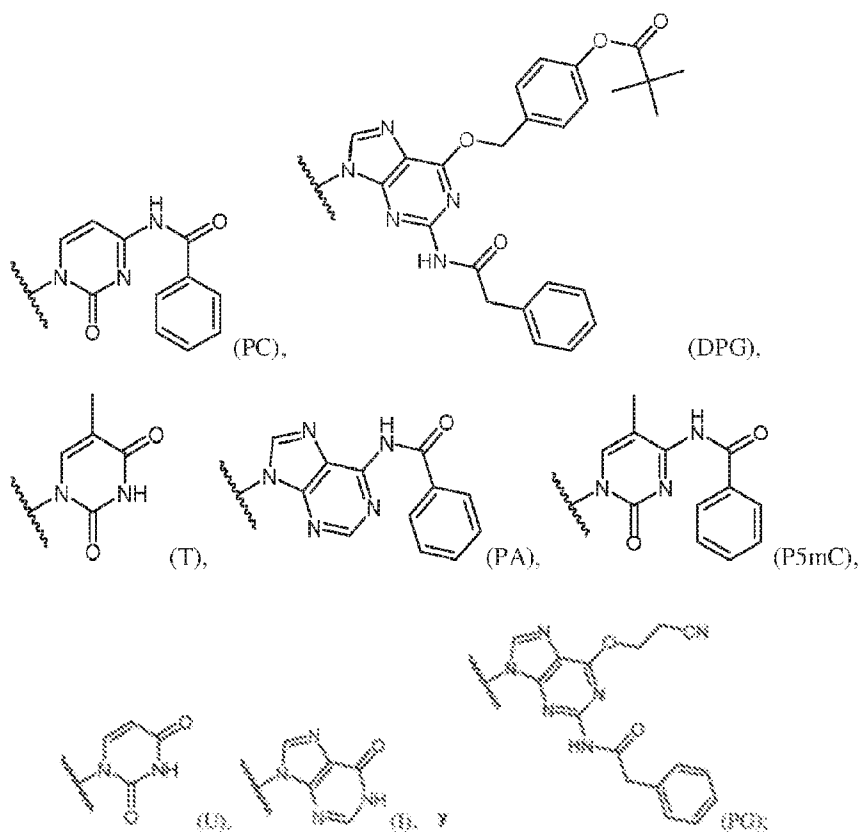
en presencia de un catalizador ácido de Lewis;

en donde

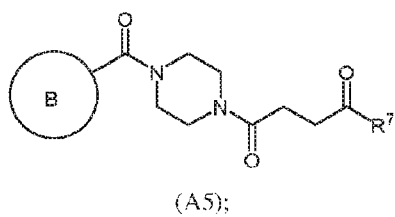
R³ se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo,

dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y

R⁴ se selecciona del grupo que consiste en:

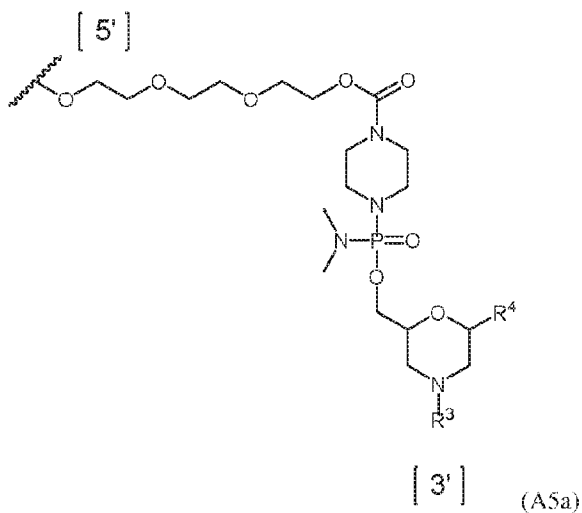


para formar un compuesto de la Fórmula (A5):

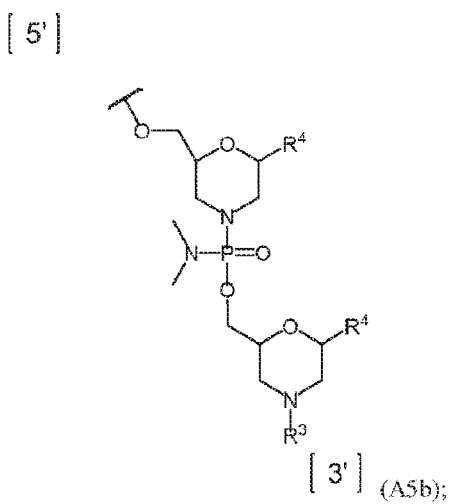


5

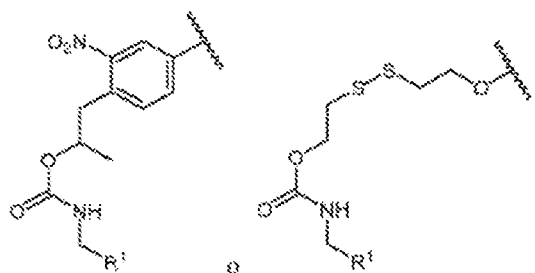
en la que R^7 es de la Fórmula (A5a) o Fórmula (A5b):



o



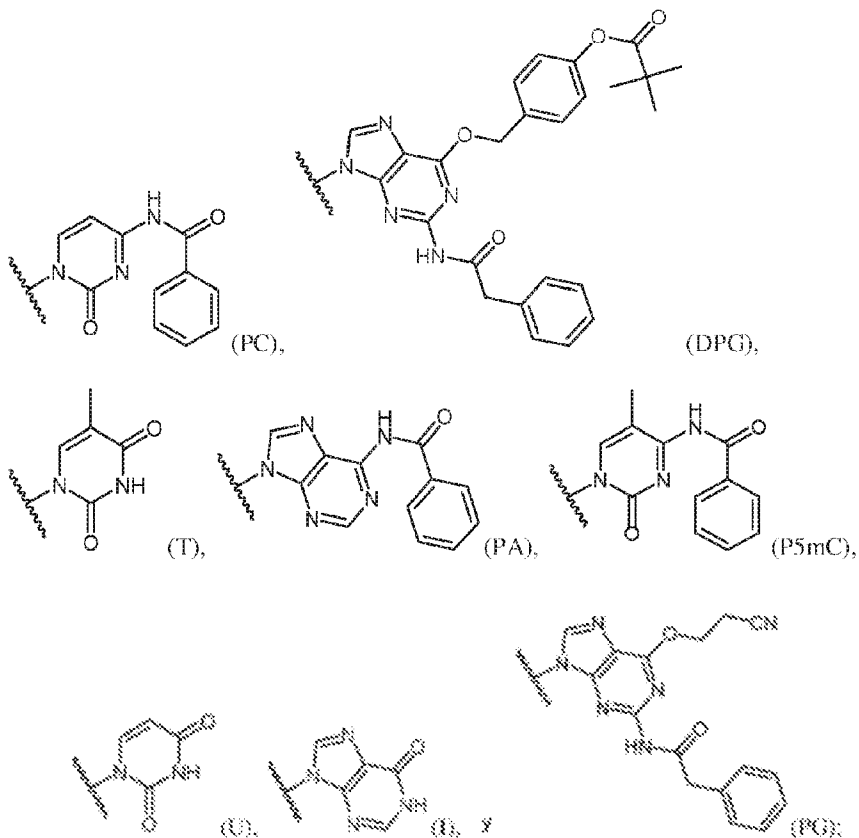
B es



R¹ es un medio de soporte;

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

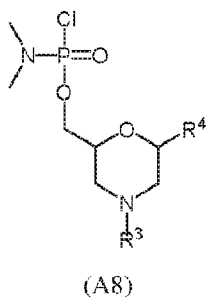
R⁴ se selecciona entre:



(e) llevar a cabo iteraciones Y de los pasos secuenciales de:

(e1) poner en contacto el producto formado en el paso inmediatamente anterior con un agente de desbloqueo; y

(e2) poner en contacto el compuesto formado en el paso inmediatamente anterior con un compuesto de la Fórmula (A8):



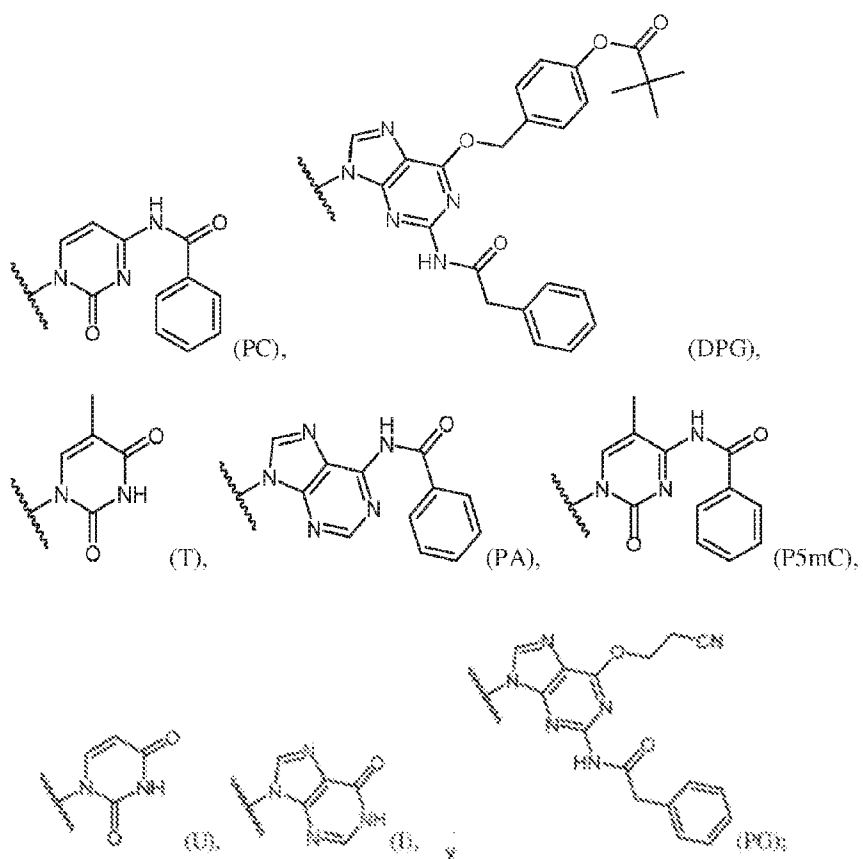
en presencia de un catalizador ácido de Lewis;

en donde

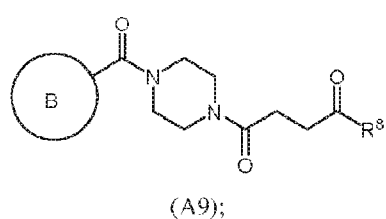
Y es n-1 si R⁷ es de la Fórmula (A5a) o Y es n-2 si R⁷ es de la Fórmula (ASb);

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

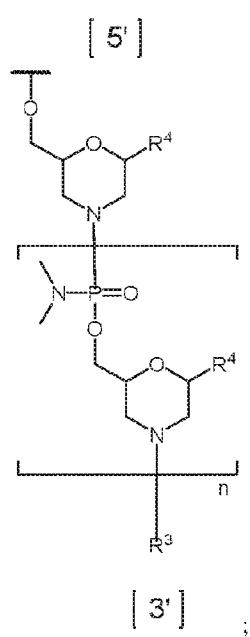
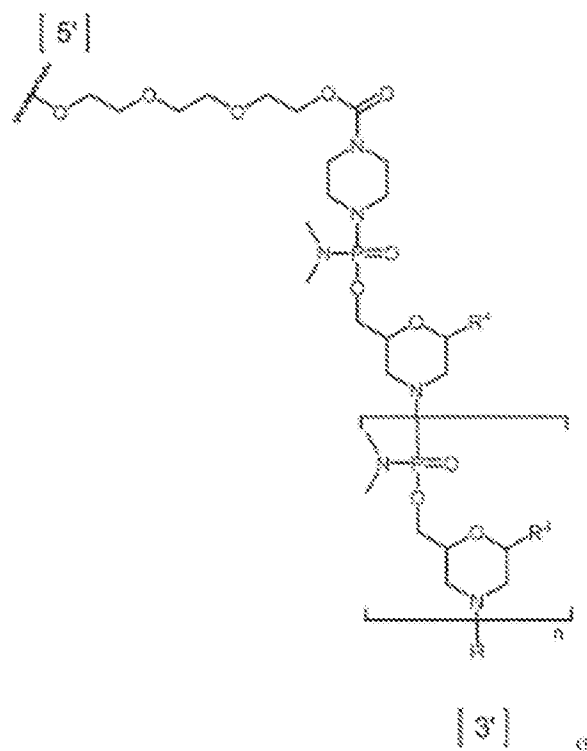
R⁴ se selecciona, independientemente para cada compuesto de la Fórmula (A8), del grupo que consiste en:



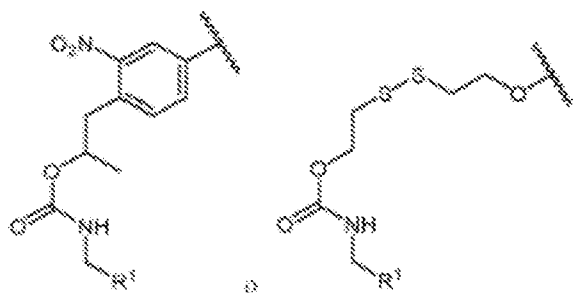
para formar un compuesto de la Fórmula (A9):



En donde R⁸ es



B es

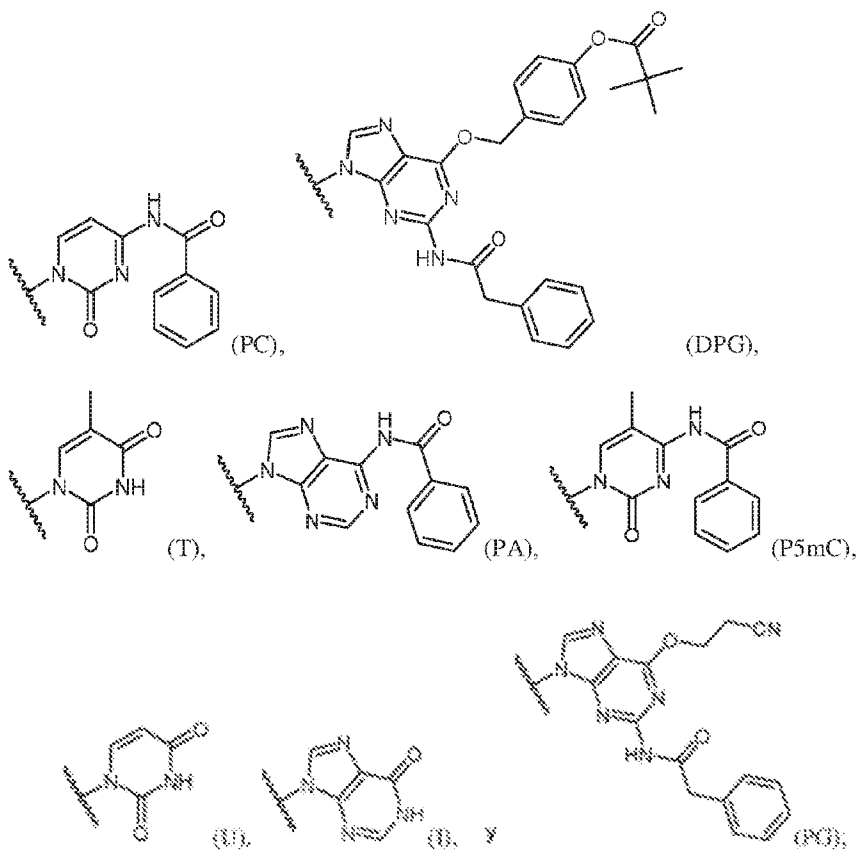


n es un número entero de 9 a 39;

R¹ es un medio de soporte;

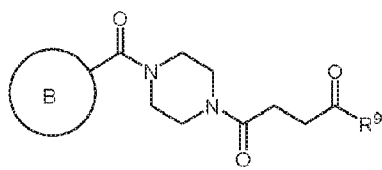
R³ se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y

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



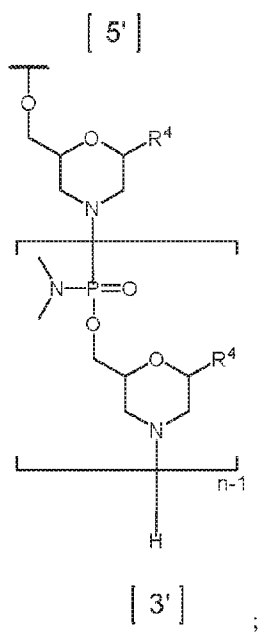
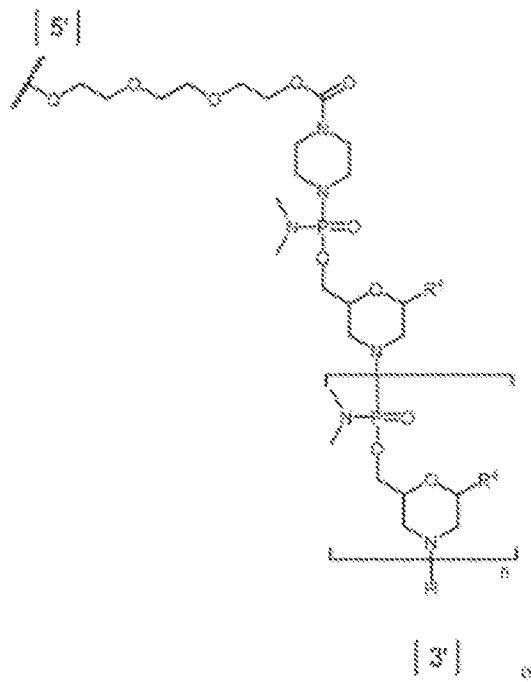
y

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

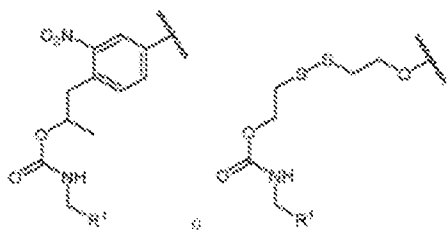


(A10);

en donde R^9 es



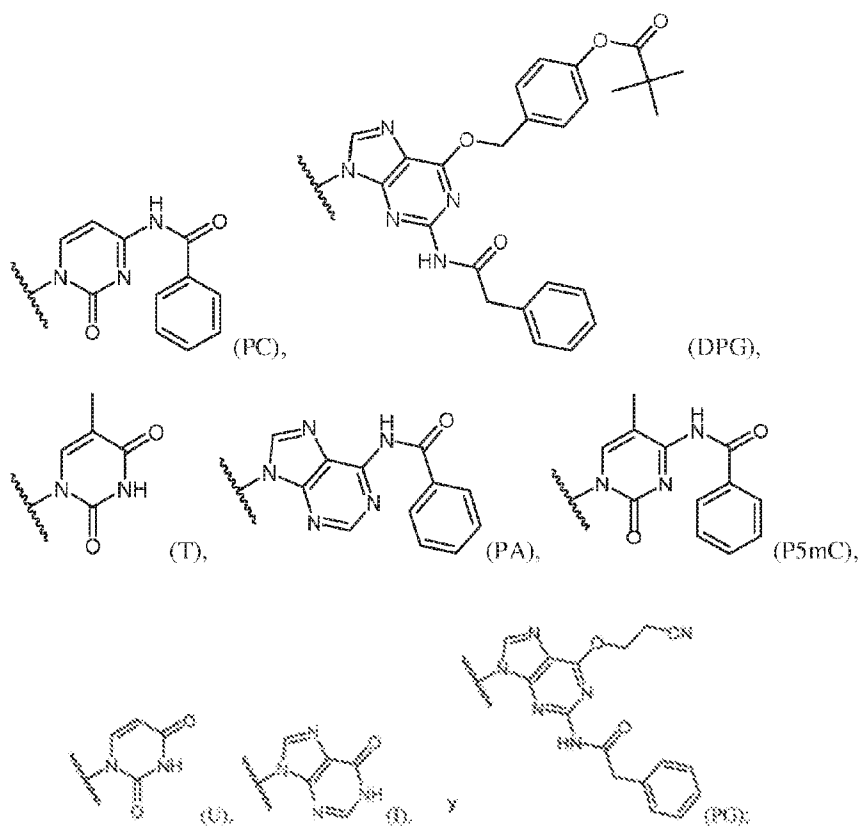
B es



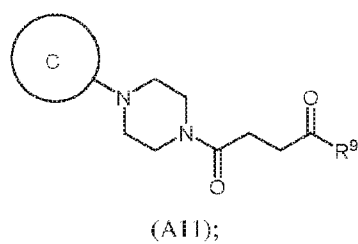
n es un número entero de 9 a 39;

5 R^1 es un medio de soporte; y

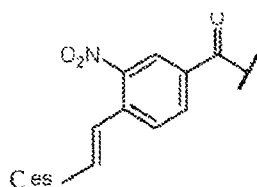
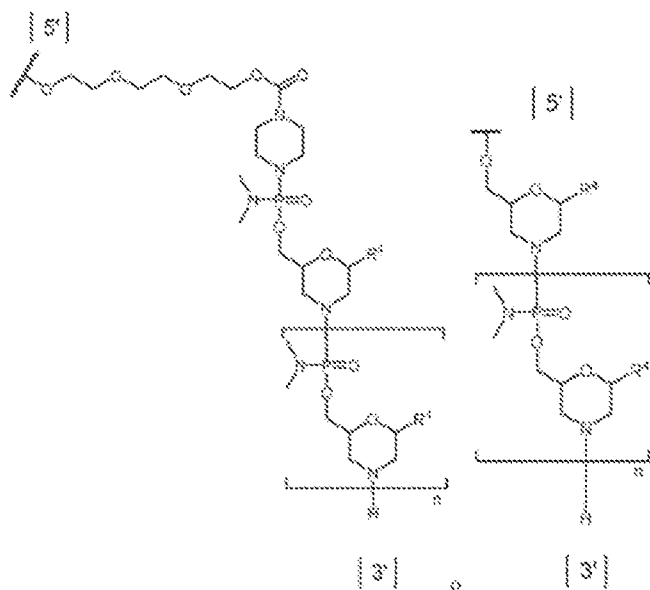
R^4 se selecciona, independientemente para cada aparición, del grupo que consiste en:



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



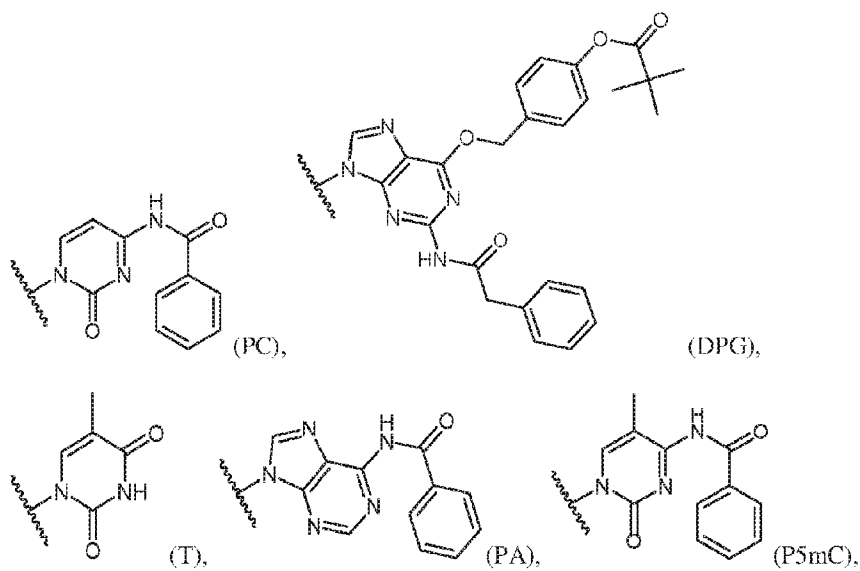
20 R^9 es

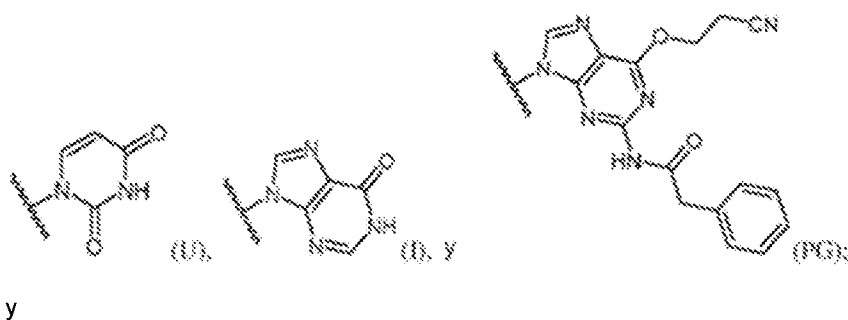


o H;

n es un número entero de 9 a 39; y

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





y

5 (b) poner en contacto el compuesto de la Fórmula (A11) con un agente desprotector para formar el compuesto oligomérico de la Fórmula (I).

En una realización, uno de los pasos (d) o (e2) comprende además poner en contacto el compuesto formado en el paso inmediatamente anterior con un agente de protección.

10 En otra realización, al menos uno de los pasos (a), (c), (e1) o (f) comprende además poner en contacto el compuesto desbloqueado con un agente de neutralización.

15 En otra realización más, los pasos (a), (c), (e1) y (f) comprenden además poner en contacto el compuesto desbloqueado de cada paso con un agente de neutralización.

En otra realización, el paso de desbloqueo se lleva a cabo entre temperatura ambiente y 110°C.

20 En otra realización más, el paso de desbloqueo se lleva a cabo entre 50°C y 100°C.

En una realización particular, el paso de desbloqueo se lleva a cabo entre 70°C y 90°C.

En una realización, el agente de protección está en una solución que comprende N-etilmorfolino y metilpirrolidinona.

25 En otra realización, el agente de protección es un anhídrido de ácido.

En una realización particular, el agente de protección es anhídrido benzoico.

30 En una realización, los compuestos de la Fórmula (A4) y Fórmula (A8) están cada uno, independientemente, en una solución que comprende N-etilmorfolino y dimetilimidazolidinona.

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

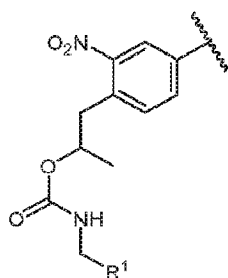
35 En otra realización más, el agente de escisión está en una solución que comprende N-metil-2-pirrolidona.

En otra realización, el agente desprotector comprende NH₃.

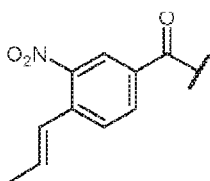
En una realización adicional, el agente desprotector está en una solución acuosa.

40 En una realización, el medio soporte comprende poliestireno con divinilbenceno reticulado al 1%.

En una realización, en los pasos (a)-(g), B es



45 y en el paso (h), C es



En otra realización, el proceso se lleva a cabo en una síntesis por lotes o en una síntesis continua.

- 5 En otra realización más, cualquiera de los pasos (a), (b), (c), (d), (e1), (e2), (f), (g) o (h) se lleva a cabo de forma discontinua, síntesis o en síntesis continua.

En una realización particular, los pasos (a), (b), (g) y (h) se llevan a cabo en una síntesis por lotes y los pasos (c), (d), (e1), (e2) y (f) se llevan a cabo en una síntesis continua.

10

En una realización, el agente de desbloqueo utilizado en cada paso es una solución que comprende un ácido halogenado.

En otra realización, el agente de desbloqueo se selecciona del grupo que consiste en ácido cloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido fluoroacético, ácido difluoroacético y ácido trifluoroacético.

15

En una realización particular, el agente de desbloqueo es ácido trifluoroacético.

En una realización, el ácido de Lewis es soluble en el solvente de acoplamiento.

20

En otra realización, el ácido de Lewis se selecciona de un grupo que consiste en LiCl, LiBr, LiI y LiOTf.

En una realización particular, el ácido de Lewis es LiBr.

25

En una realización, el agente de neutralización está en una solución que comprende un solvente halogenado y alcohol isopropílico.

En otra realización, el solvente halogenado es diclorometano o dicloroetano.

En otra realización más, el agente de neutralización es una monoalquil, dialquil o trialquilamina.

30

En otra realización, el agente de neutralización es N,N-diisopropiletilamina. En otra realización, el agente de neutralización es N-etilmorfolino.

35

En una realización, el agente de desbloqueo utilizado en cada paso es una solución que comprende 4-cianopiridina, diclorometano, ácido trifluoroacético, trifluoroetanol y agua.

En una realización, el agente de desbloqueo utilizado en cada paso es una solución que comprende 4-cianopiridina, dicloroetano, ácido trifluoroacético, trifluoroetanol y agua.

40

En una realización, el agente de desbloqueo utilizado en cada paso es una solución que comprende 3,5-dimetilpiridina, diclorometano, ácido trifluoroacético, trifluoroetanol y agua.

En una realización, el agente de desbloqueo utilizado en cada paso es una solución que comprende 3,5-dimetilpiridina, dicloroetano, ácido trifluoroacético, trifluoroetanol y agua.

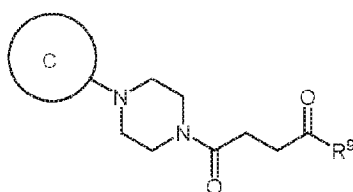
45

Procesos Continuos para la Preparación de Oligómeros de Morfolino.

En la presente se proporciona un proceso continuo (de flujo continuo) para preparar oligómeros de morfolino.

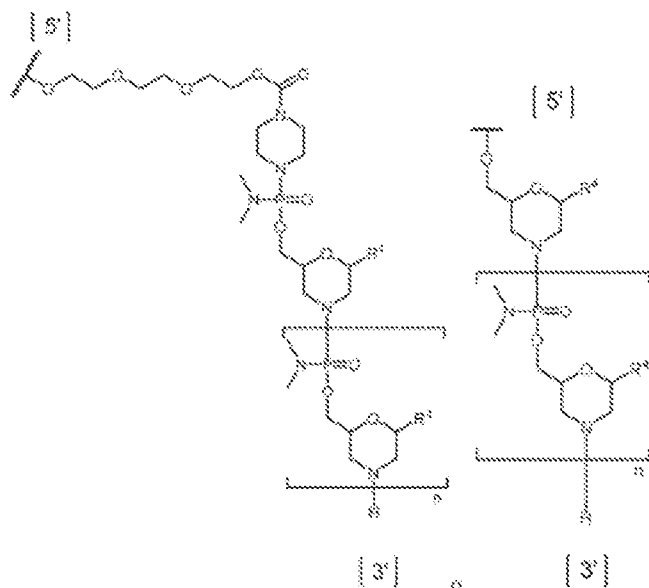
50

Por consiguiente, en un aspecto, se proporciona en la presente un proceso continuo para preparar un compuesto oligomérico de la Fórmula (A11):



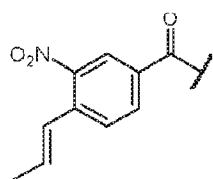
(A11);

en donde R^9 es



5

C es



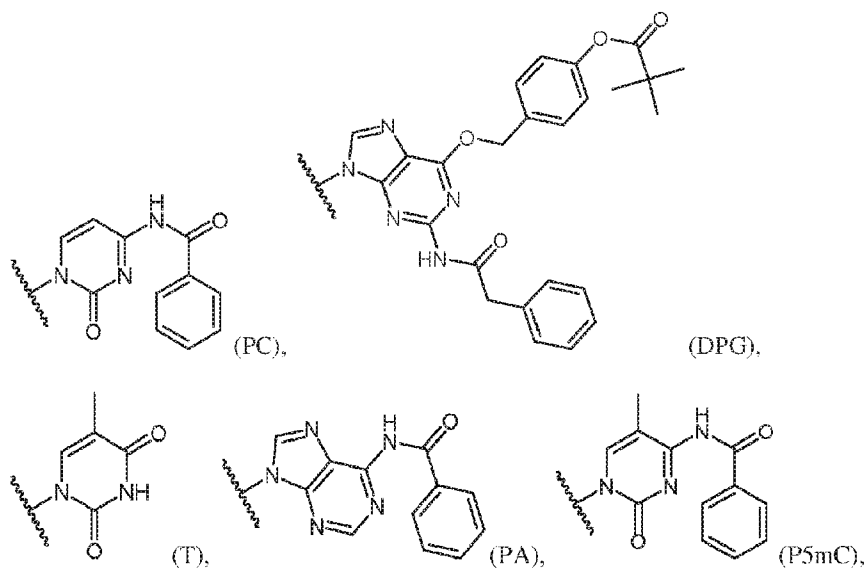
10

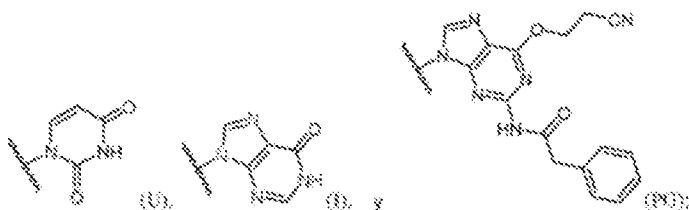
o H;

n es un número entero de 9 a 39; y

15

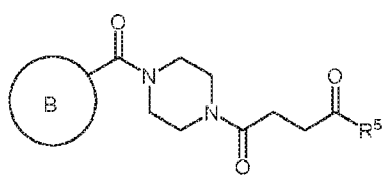
R^4 se selecciona, independientemente para cada aparición, del grupo que consiste en:



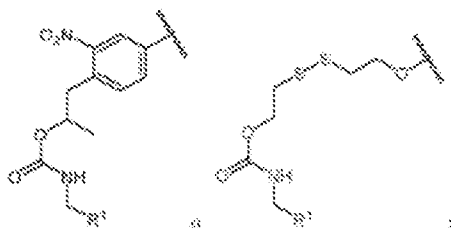


en donde el proceso comprende los pasos secuenciales de:

- 5 (a) poner en contacto un agente de desbloqueo con un compuesto de la Fórmula (A3):



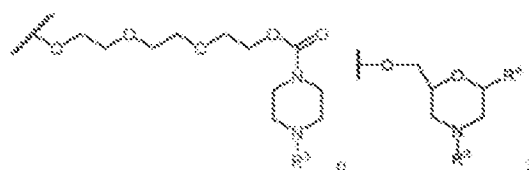
en donde B es



R¹ es un medio de soporte;

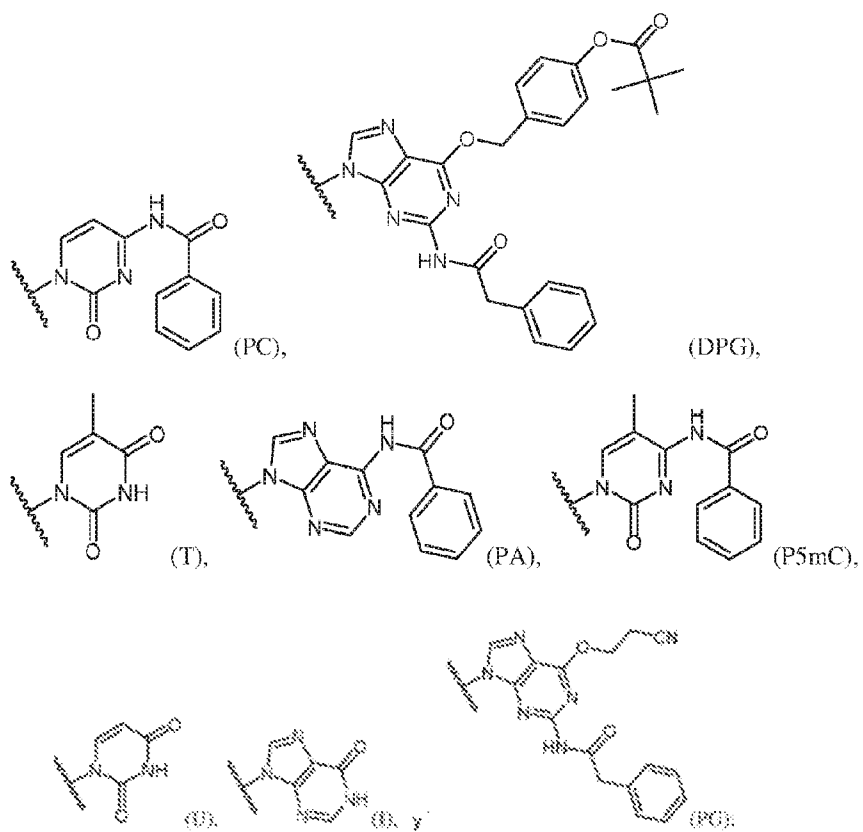
15 R³ se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo;

R⁵ es

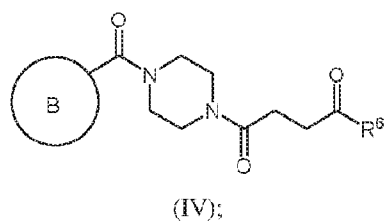


20 R³ se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y

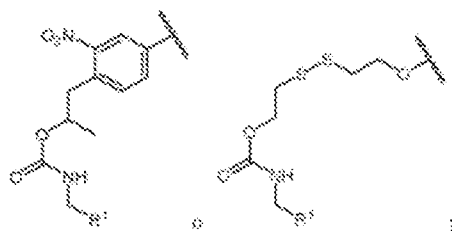
25 R⁴ se selecciona del grupo que consiste en:



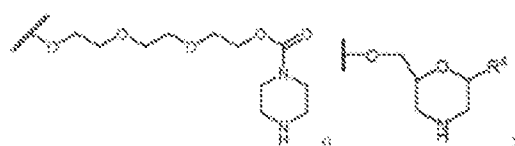
en un recipiente reactor para formar un compuesto de la Fórmula (IV):



en donde B es

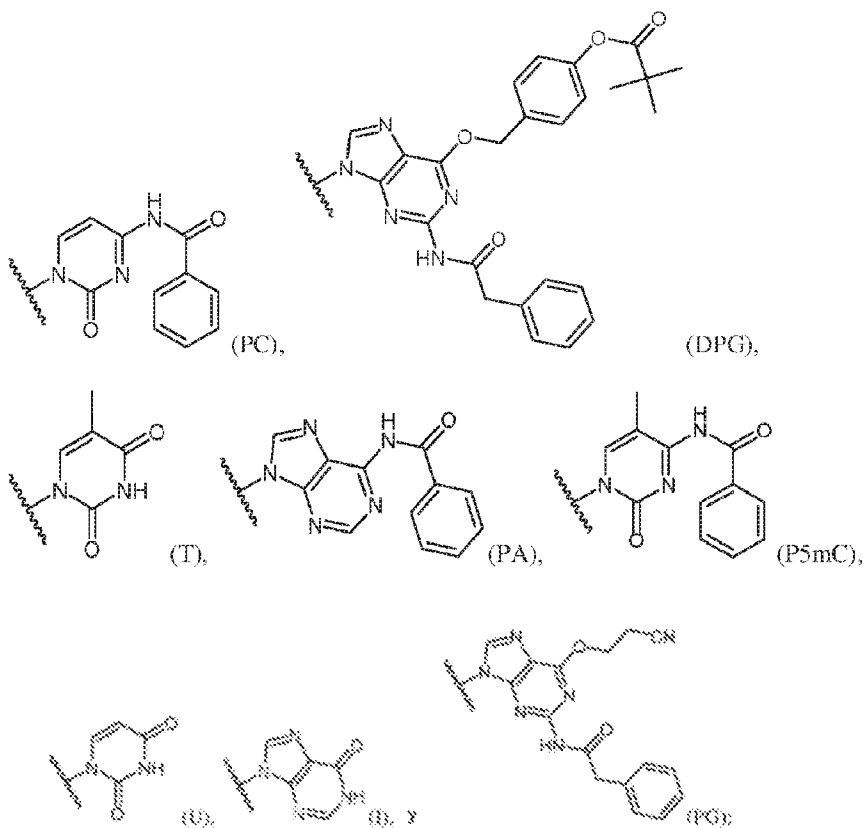


R^1 es un medio de soporte;

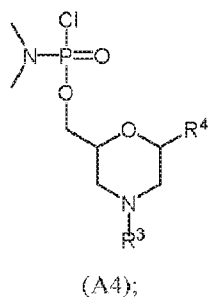
R⁶ es

y

R⁴ se selecciona del grupo que consiste en:



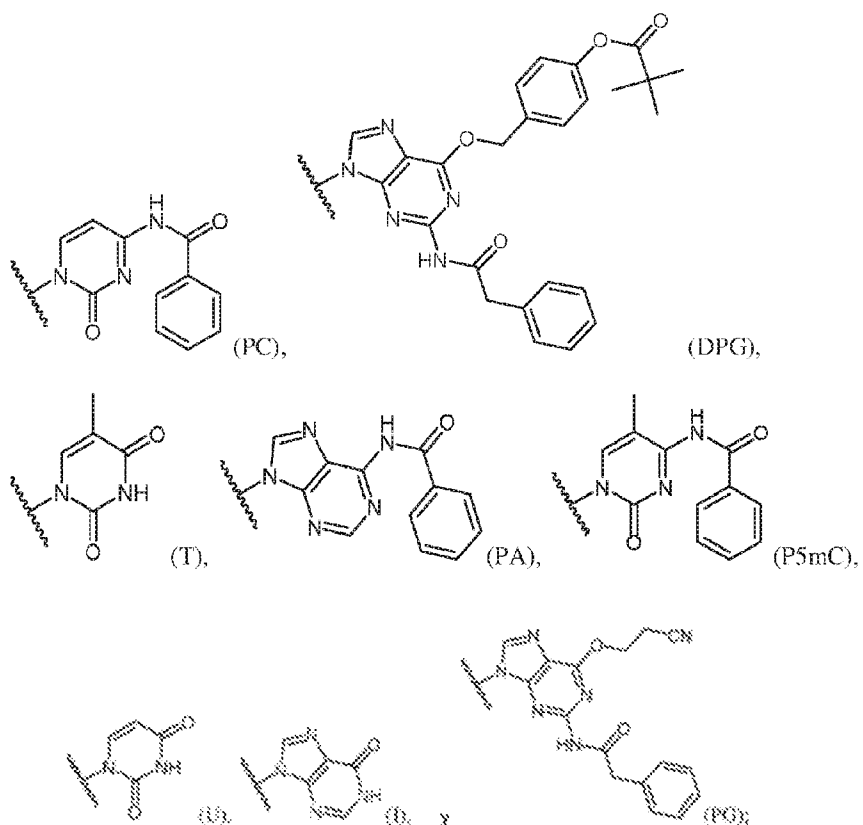
- (b) lavar el compuesto de la Fórmula (IV) con un solvente de lavado y un agente neutralizante, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado y un agente neutralizante a través del recipiente del reactor;
- (c) lavar el compuesto de la Fórmula (IV) con un solvente de lavado, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado a través del recipiente del reactor;
- (d) lavar el compuesto de la Fórmula (IV) con un solvente de acoplamiento, en el que el lavado comprende pasar un solvente de acoplamiento a través del recipiente del reactor;
- (e) introducir en la vasija del reactor un ácido de Lewis y un compuesto de la Fórmula (A4):



en donde

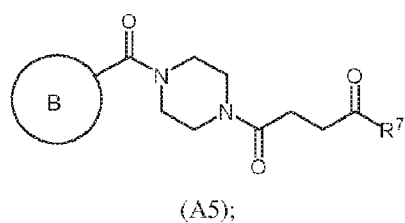
R³ se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y

R⁴ se selecciona del grupo que consiste en:



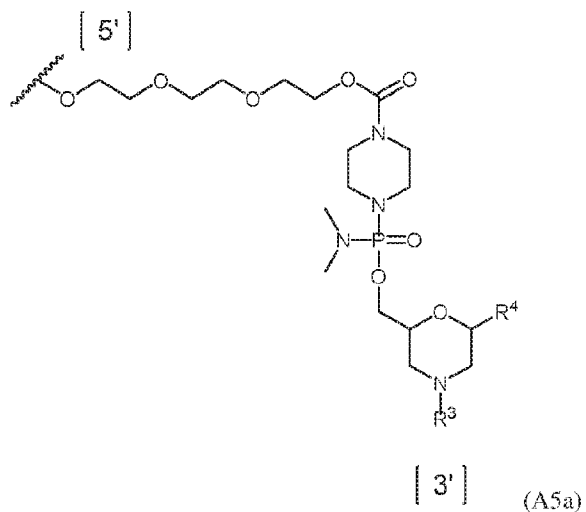
5

de manera que el compuesto de fórmula (A4) entra en contacto con el compuesto de fórmula (IV) para formar un compuesto de fórmula (A5):



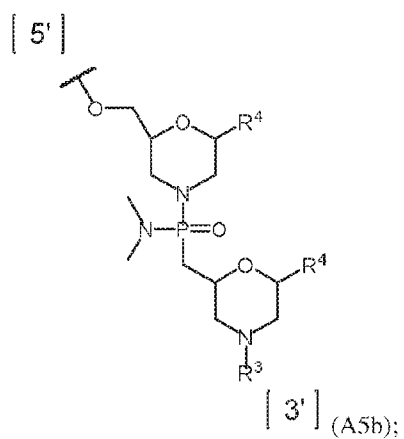
10

en la que R^7 es de la Fórmula (A5a) o Fórmula (A5b):

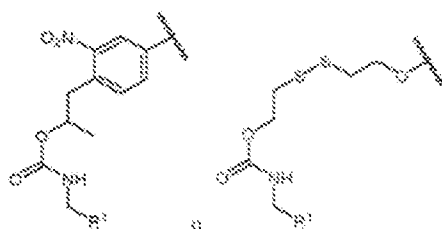


15

o



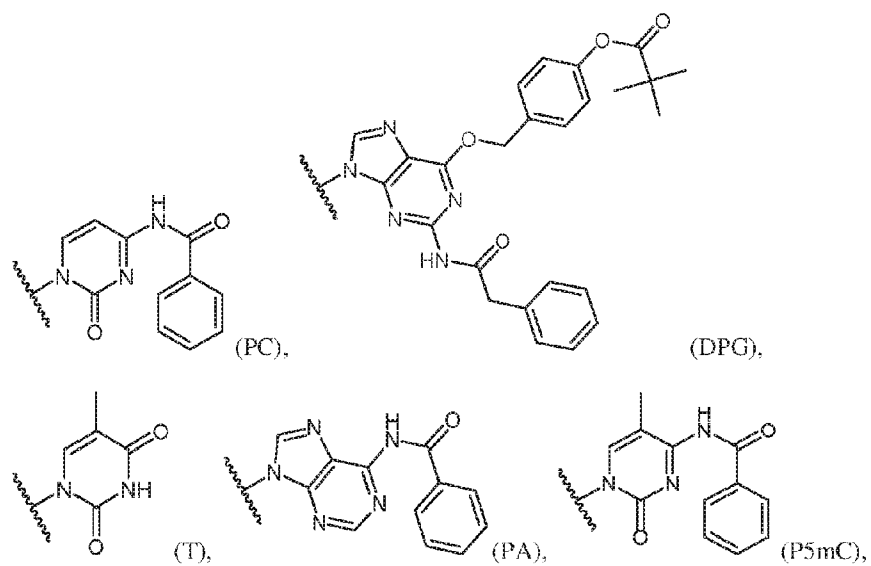
B es

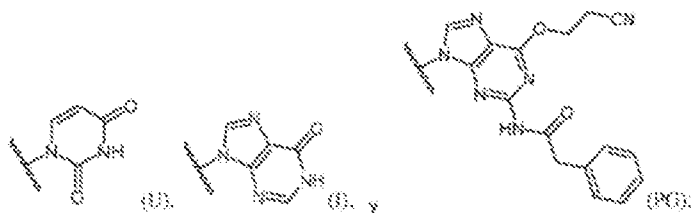


R¹ es un medio de soporte;

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

R⁴ se selecciona entre:





(f) lavar el compuesto de la Fórmula (A5) con un solvente de acoplamiento, en el que el lavado comprende pasar un solvente de acoplamiento a través del recipiente del reactor;

(g) llevar a cabo iteraciones Y de los pasos secuenciales de:

(g1) lavar el producto formado en el paso inmediatamente anterior con un solvente de lavado, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado a través del recipiente del reactor;

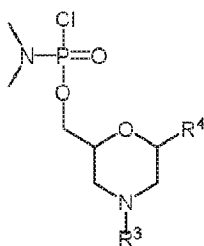
(g2) introducir un agente de desbloqueo en la vasija del reactor de manera que entre en contacto con el producto formado en el paso inmediatamente anterior;

(g3) lavar el producto formado en el paso inmediatamente anterior con un solvente de lavado y un agente neutralizante, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado y un agente neutralizante a través del recipiente del reactor;

(g4) lavar el producto formado en el paso inmediatamente anterior con un solvente de lavado, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado a través del recipiente del reactor;

(g5) lavar el producto formado en el paso inmediatamente anterior con un solvente de acoplamiento, en el que el lavado comprende pasar un solvente de acoplamiento a través del recipiente del reactor;

(g6) introducir en el recipiente del reactor que contiene el producto formado en el paso inmediatamente anterior un ácido de Lewis y un compuesto de la Fórmula (A8):



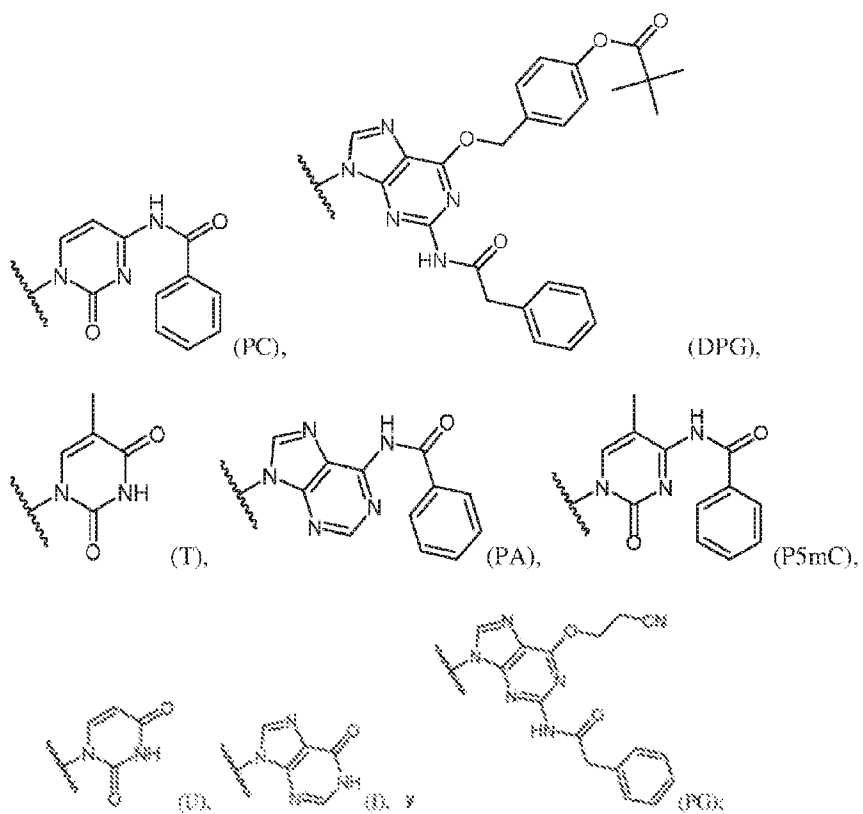
(A8);

en donde

Y es n-1 si R^7 es de la Fórmula (A5a) o Y es n-2 si R^7 es de la Fórmula (A5b);

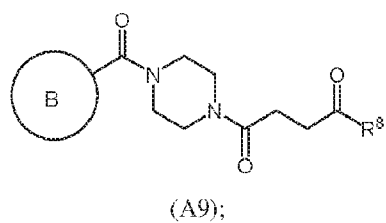
R^3 se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y

R^4 se selecciona, independientemente para cada compuesto de la Fórmula (A8), del grupo que consiste en:



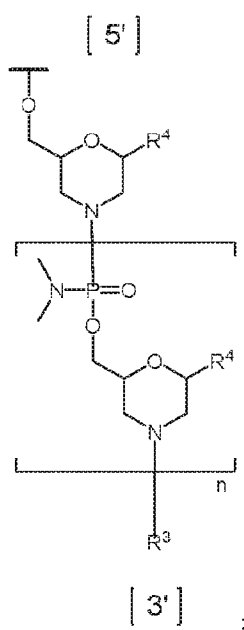
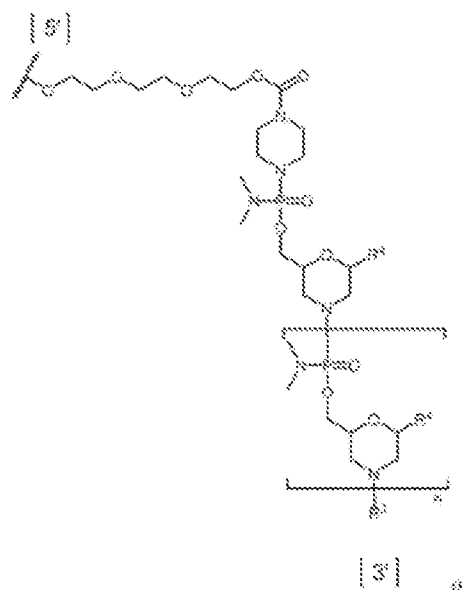
5

de modo que el compuesto de la Fórmula (A8) entra en contacto con el compuesto formado en el paso inmediatamente anterior para formar un compuesto de la Fórmula (A9):



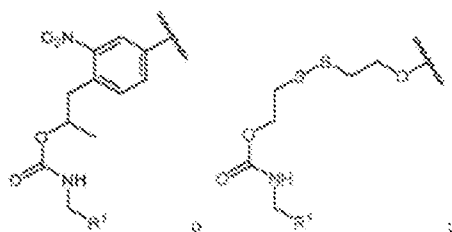
10

en donde R^8 es



5

B es



10

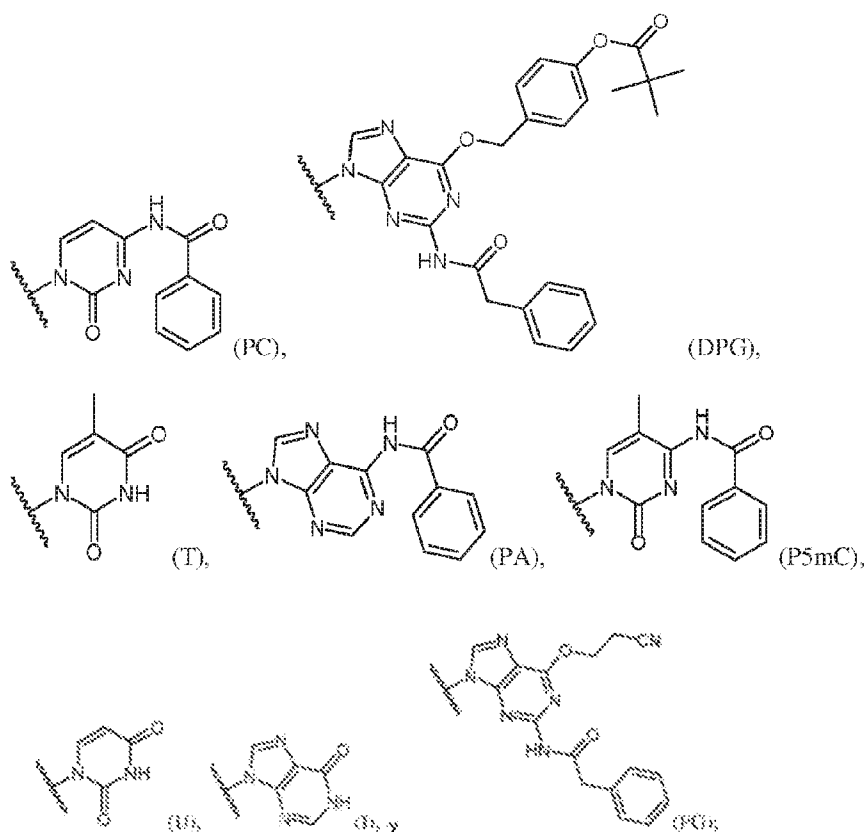
n es un número entero de 9 a 39;

R¹ es un medio de soporte;

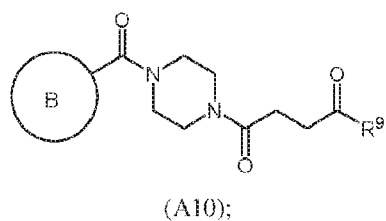
R³ se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y

15

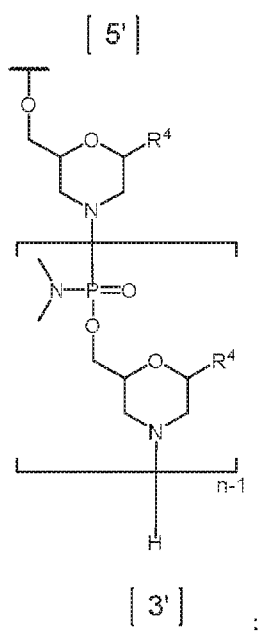
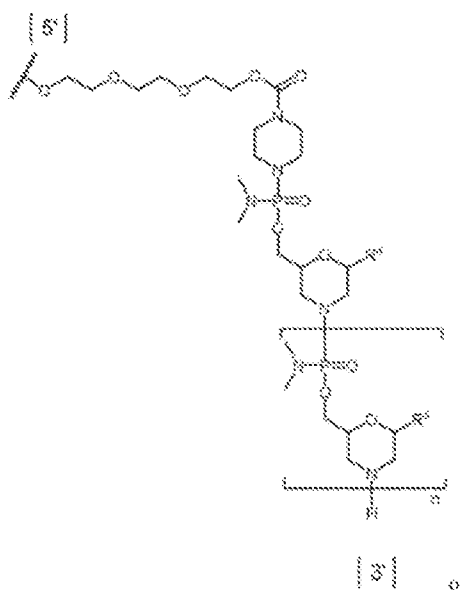
R⁴ se selecciona, independientemente para cada aparición, del grupo que consiste en:



- (h) lavar el compuesto de la Fórmula (A9) con un solvente de acoplamiento para eliminar el compuesto de la Fórmula (A8), en el que el lavado comprende pasar un solvente de acoplamiento a través del recipiente del reactor;
- (i) lavar el compuesto de la Fórmula (A9) con un solvente de lavado para eliminar el solvente de acoplamiento, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado a través del recipiente del reactor;
- (j) poner en contacto un agente de desbloqueo con un compuesto de la Fórmula (A9) en un recipiente de reactor para formar un compuesto de la Fórmula (A10):

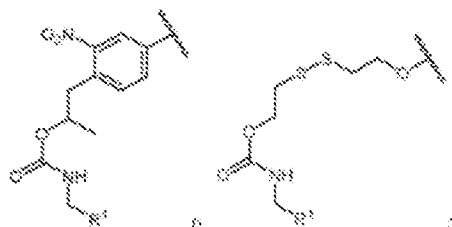


en donde R⁹ es



5

B es

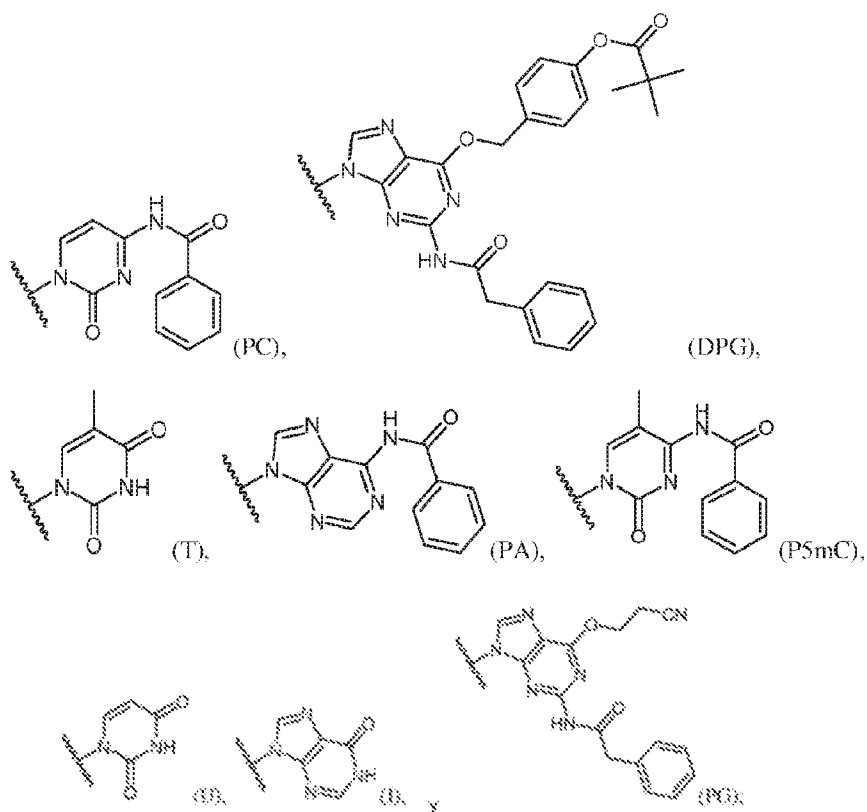


10

n es un número entero de 10 a 40;

R^1 es un medio de soporte; y

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

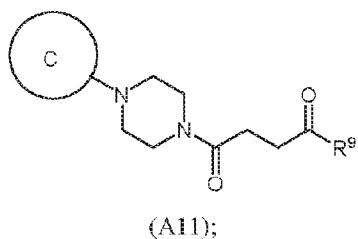


5

y

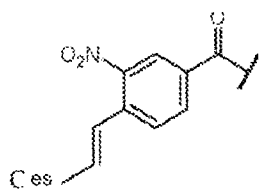
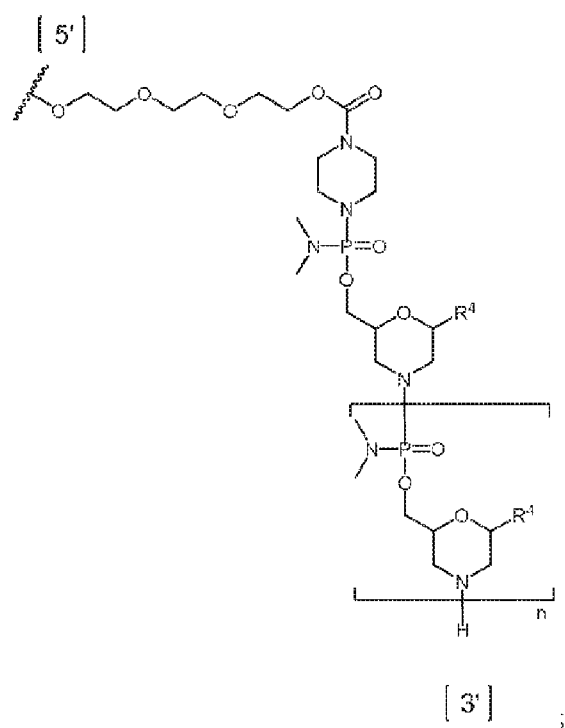
10 (k) poner en contacto un agente de escisión con un compuesto de la Fórmula (10) en un recipiente reactor para formar un compuesto de la Fórmula (A11).

En una realización, en la presente se proporciona un proceso continuo para preparar un compuesto oligomérico de la Fórmula (A11):



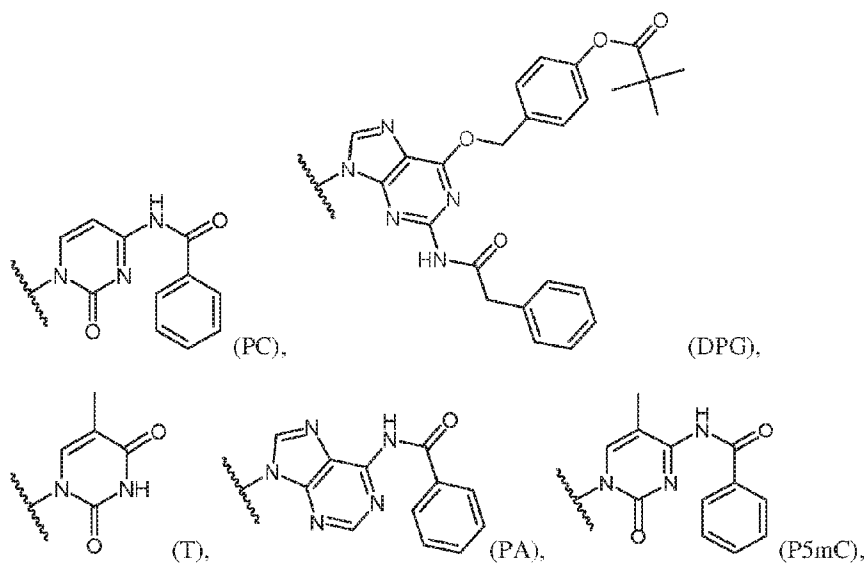
15

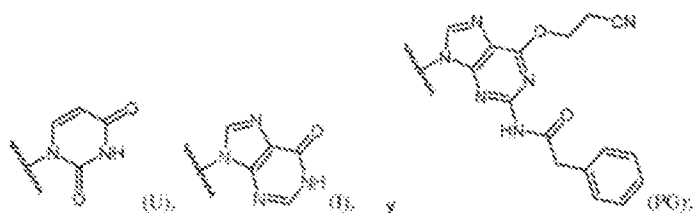
en donde R^9 es



n es un número entero de 9 a 39; y

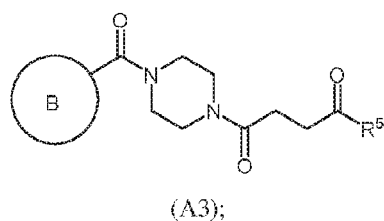
R⁴ se selecciona, independientemente para cada aparición, del grupo que consiste en:



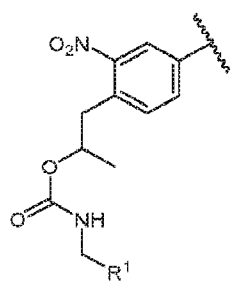


en donde el proceso comprende los pasos secuenciales de:

- 5 (a) poner en contacto un agente de desbloqueo con un compuesto de la Fórmula (A3):

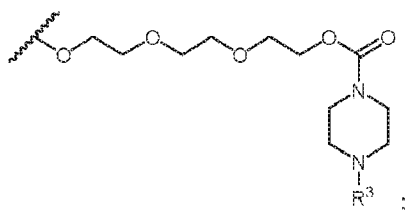


en donde B es



R¹ es un medio de soporte;

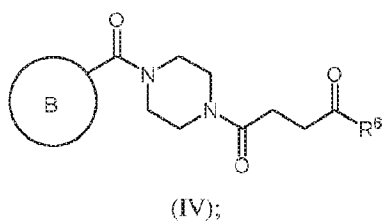
R⁵ es



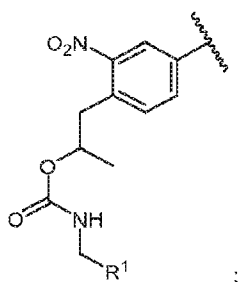
y

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

en un recipiente reactor para formar un compuesto de la Fórmula (IV):

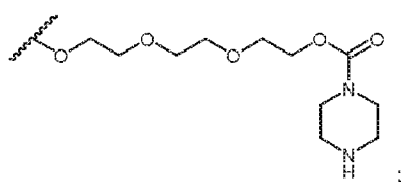


en donde B es



R¹ es un medio de soporte;

R⁶ es

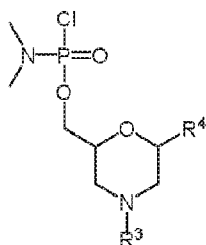


(b) lavar el compuesto de la Fórmula (IV) con un solvente de lavado y un agente neutralizante, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado y un agente neutralizante a través del recipiente del reactor;

(c) lavar el compuesto de la Fórmula (IV) con un solvente de lavado, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado a través del recipiente del reactor;

(d) lavar el compuesto de la Fórmula (IV) con un solvente de acoplamiento, en el que el lavado comprende pasar un solvente de acoplamiento a través del recipiente del reactor;

(e) introducir en la vasija del reactor un ácido de Lewis y un compuesto de la Fórmula (A4):

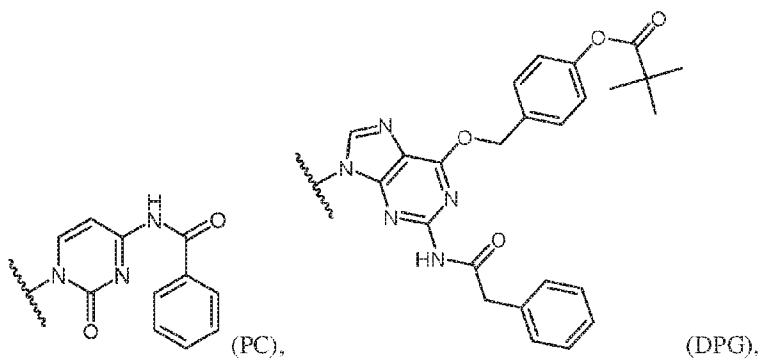


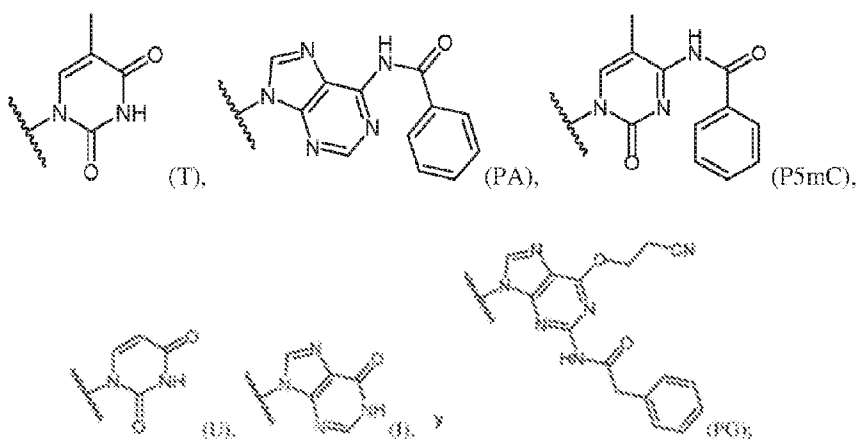
(A4);

en donde

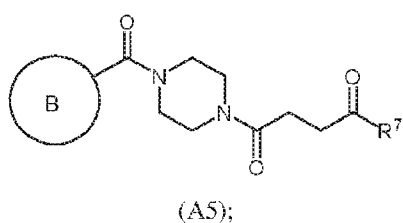
R³ se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y

R⁴ se selecciona del grupo que consiste en:

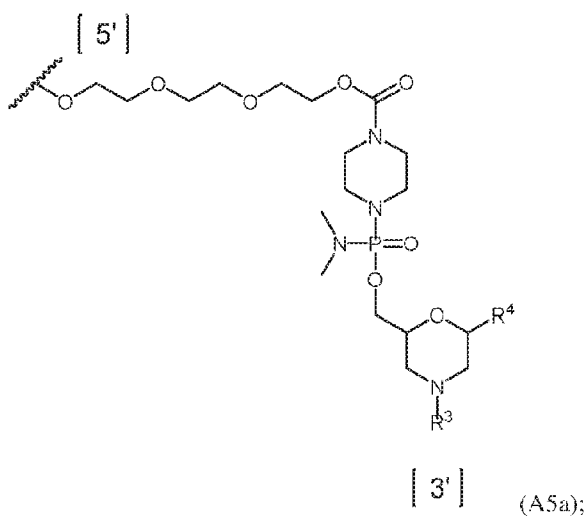




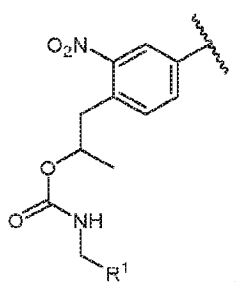
5 de manera que el compuesto de fórmula (A4) entra en contacto con el compuesto de fórmula (IV) para formar un compuesto de fórmula (A5):



10 en la que R⁷ es de la Fórmula (A5a) o Fórmula (A5b):



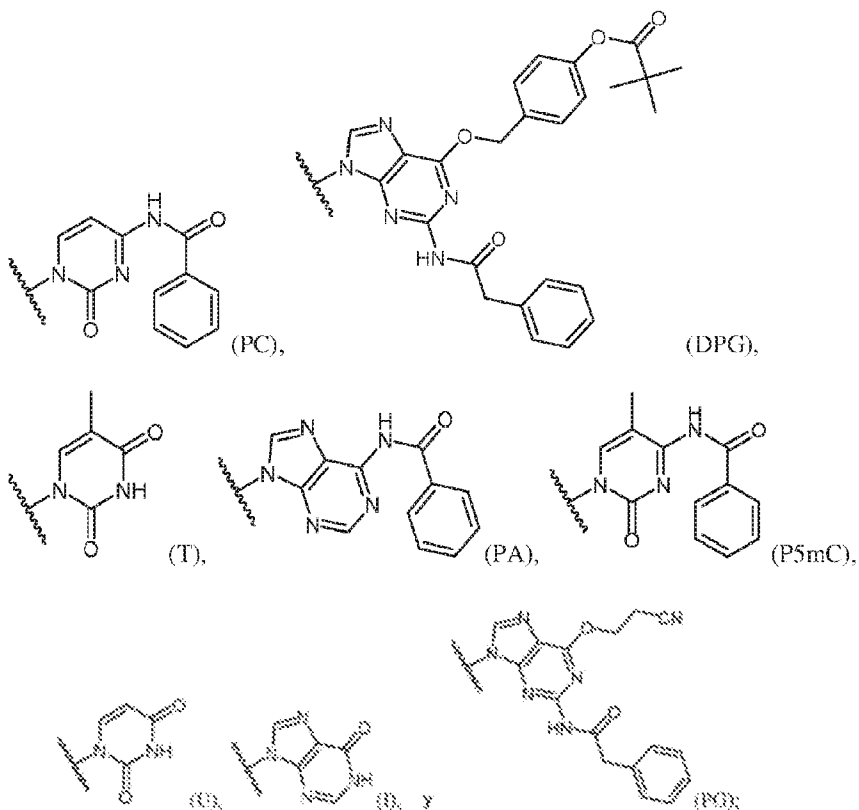
B es



R¹ es un medio de soporte;

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

R⁴ se selecciona entre:



(f) lavar el compuesto de la Fórmula (A5) con un solvente de acoplamiento, en el que el lavado comprende pasar un solvente de acoplamiento a través del recipiente del reactor;

(g) llevar a cabo iteraciones Y de los pasos secuenciales de:

(g1) lavar el producto formado en el paso inmediatamente anterior con un solvente de lavado, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado a través del recipiente del reactor;

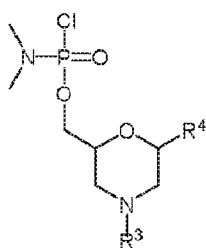
(g2) introducir un agente de desbloqueo en la vasija del reactor de manera que entre en contacto con el producto formado en el paso inmediatamente anterior;

(g3) lavar el producto formado en el paso inmediatamente anterior con un solvente de lavado y un agente neutralizante, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado y un agente neutralizante a través del recipiente del reactor;

(g4) lavar el producto formado en el paso inmediatamente anterior con un solvente de lavado, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado a través del recipiente del reactor;

(g5) lavar el producto formado en el paso inmediatamente anterior con un solvente de acoplamiento, en el que el lavado comprende pasar un solvente de acoplamiento a través del recipiente del reactor;

(g6) introducir en el recipiente del reactor que contiene el producto formado en el paso inmediatamente anterior un ácido de Lewis y un compuesto de la Fórmula (A8):



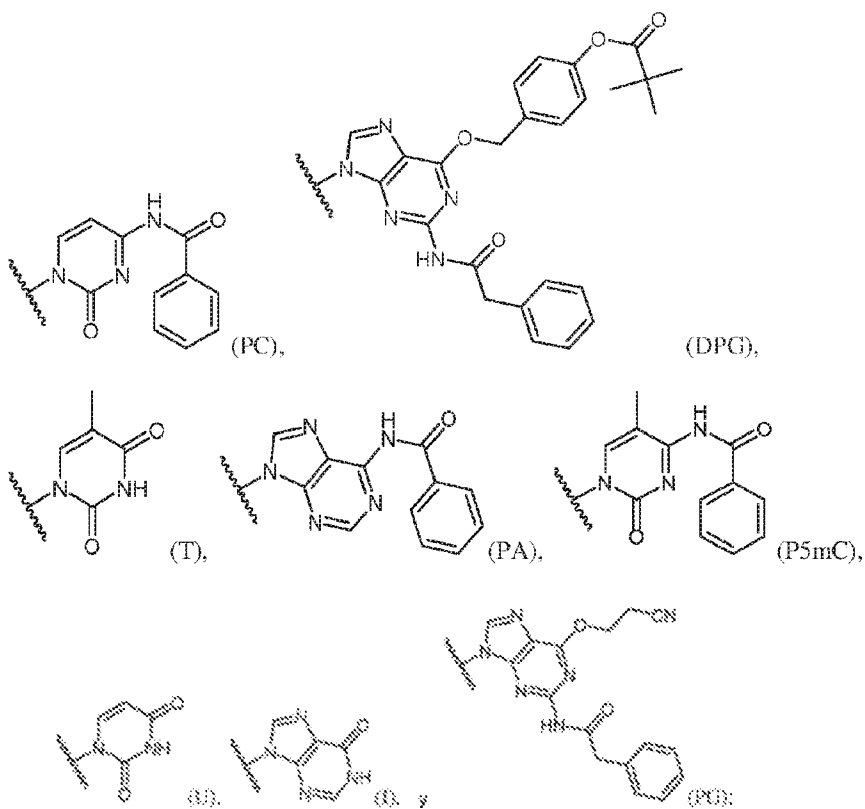
(A8);

en donde

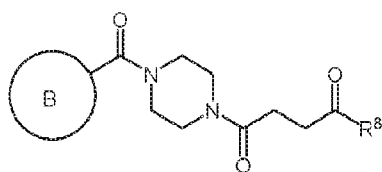
Y es n-1;

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

R⁴ se selecciona, independientemente para cada compuesto de la Fórmula (A8), del grupo que consiste en:

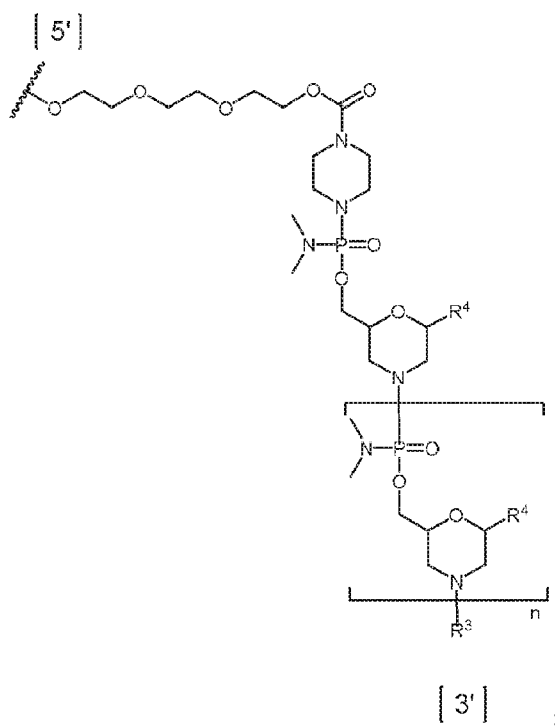


de modo que el compuesto de la Fórmula (A8) entra en contacto con el compuesto formado en el paso inmediatamente anterior para formar un compuesto de la Fórmula (A9):

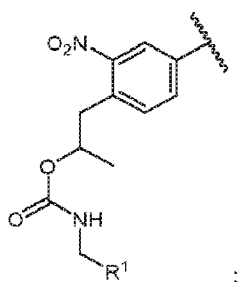


(A9);

en donde R⁸ es



B es

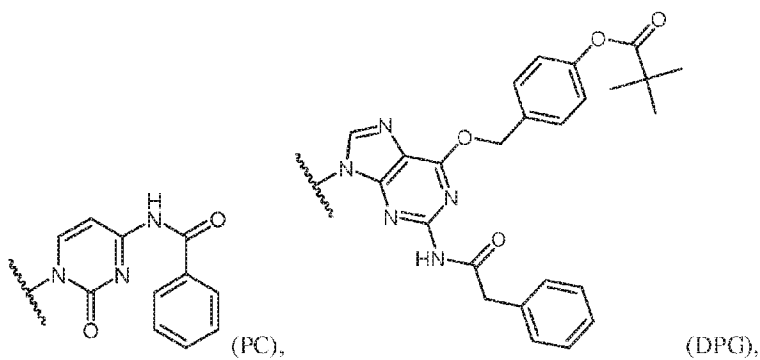


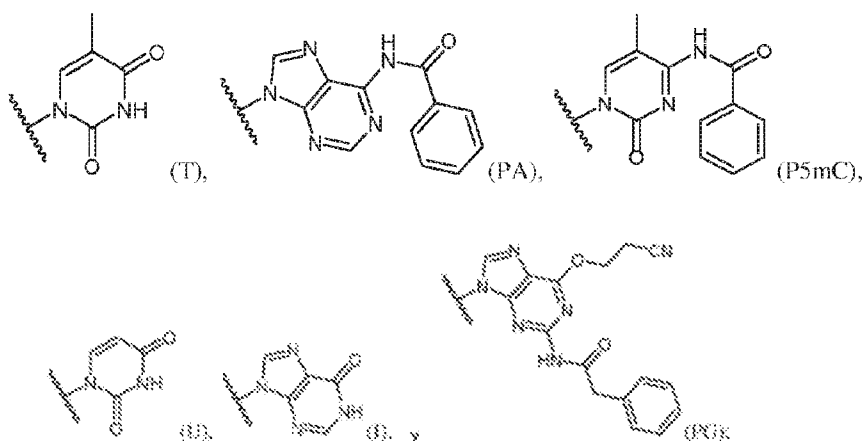
n es un número entero de 9 a 39;

R¹ es un medio de soporte;

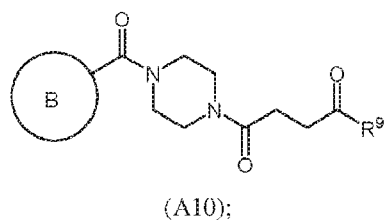
R³ se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y

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

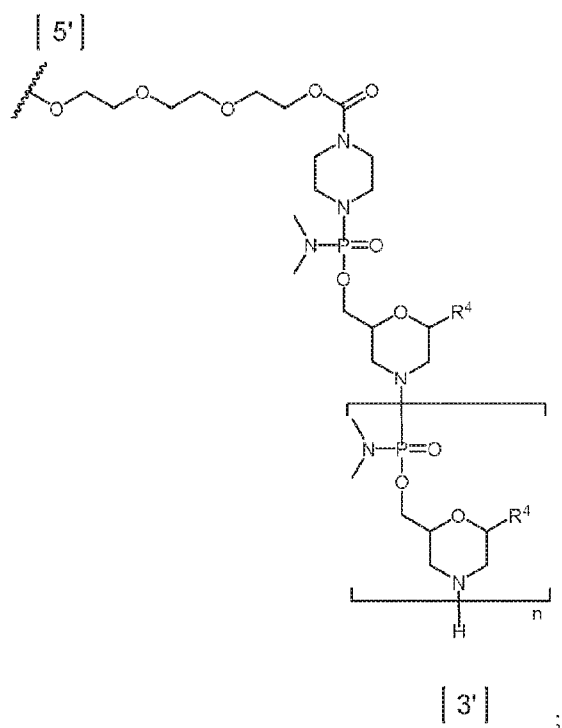


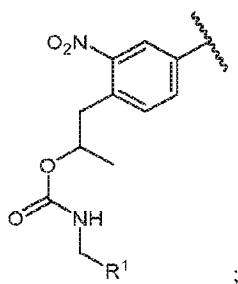


- (h) lavar el compuesto de la Fórmula (A9) con un solvente de acoplamiento para eliminar el compuesto de la Fórmula (A8), en el que el lavado comprende pasar un solvente de acoplamiento a través del recipiente del reactor;
- (i) lavar el compuesto de la Fórmula (A9) con un solvente de lavado para eliminar el solvente de acoplamiento, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado a través del recipiente del reactor;
- (j) poner en contacto un agente de desbloqueo con un compuesto de la Fórmula (A9) en un recipiente de reactor para formar un compuesto de la Fórmula (A10):



en donde R⁹ es

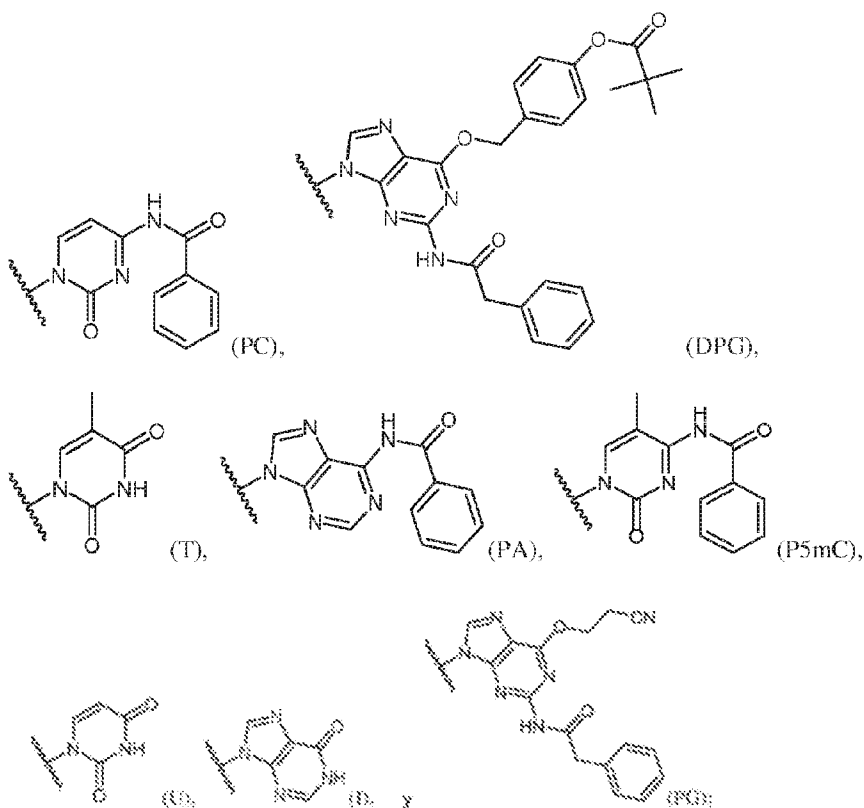




n es un número entero de 9 a 39;

R¹ es un medio de soporte; y

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



y

(k) poner en contacto un agente de escisión con un compuesto de la Fórmula (10) en un recipiente reactor para formar un compuesto de la Fórmula (A11).

En una realización, al menos uno de los pasos (a), (g2) y (j) comprende además poner en contacto el compuesto desbloqueado del paso respectivo con un agente de neutralización.

En otra realización, los pasos (a), (g2) y (j) comprenden además poner en contacto el compuesto desbloqueado de cada paso respectivo con un agente de neutralización.

En una realización, el solvente de lavado es un solvente halogenado.

En otra realización, el solvente de lavado es diclorometano o dicloroetano.

En una realización, el solvente de acoplamiento es 1,3-dimetil-2-imidazolidinona o N-metil-2-pirrolidona.

En una realización, el agente de escisión comprende NH₃.

En otra realización, el agente de división está en una solución acuosa.

En otra realización más, el medio soporte comprende poliestireno con divinilbenceno reticulado al 1%.

5

En una realización, cualquiera de los pasos (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g1), (g2), (g3), (g4), (g5), (g6), (h), (i), (j) y (k) se ejecuta entre 70°C y 90°C.

10

En otra realización, cada una de los pasos (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g1), (g2), (g3), (g4), (g5), (g6), (h), (i), (j) y (k) se ejecuta entre 70°C y 90°C.

En una realización particular, cada una de los pasos (e) y (g6) se lleva a cabo entre 70°C y 90°C.

15

En una realización, cada uno de los pasos (a), (g2) y (j) se lleva a cabo entre 70°C y 90°C; y el agente de desbloqueo usado en cada paso es una solución que comprende 3,5-dimetilpiridina, dicloroetano, ácido trifluoroacético y trifluoroetanol.

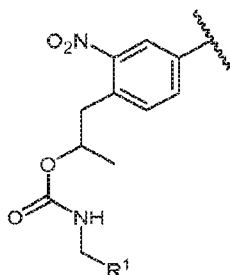
20

En una realización, cada uno de los pasos (a), (g2) y (j) se lleva a cabo entre 70°C y 90°C; y el agente de desbloqueo utilizado en cada paso es una solución que comprende 3,5-dimetilpiridina, diclorometano, ácido trifluoroacético y trifluoroetanol.

En otra realización, cada una de los pasos (a), (g2) y (j) se lleva a cabo entre temperatura ambiente y 70°C; y el agente de desbloqueo usado en cada paso es una solución que comprende 4-cianopiridina, dicloroetano, ácido trifluoroacético y trifluoroetanol.

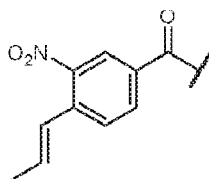
25

En otra realización más, cada una de los pasos (a), (g2) y (j) se lleva a cabo entre temperatura ambiente y 70°C; y el agente de desbloqueo utilizado en cada paso es una solución que comprende 4-cianopiridina, diclorometano, ácido trifluoroacético y trifluoroetanol. En una realización, los pasos (a)-(j), B es



30

y en el paso (k), C es



35

En una realización, cualquiera de los pasos (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g1), (g2), (g3), (g4), (g5), (g6), (h), (i), (j) y (k) se llevan a cabo opcionalmente en un proceso discontinuo.

40

En una realización, el agente de desbloqueo utilizado en cada paso es una solución que comprende un ácido halogenado.

En otra realización, el agente de desbloqueo se selecciona del grupo que consiste en ácido cloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido fluoroacético, ácido difluoroacético y ácido trifluoroacético.

45

En una realización particular, el agente de desbloqueo es ácido trifluoroacético.

En una realización, el ácido de Lewis es soluble en el solvente de acoplamiento.

En otra realización, el ácido de Lewis se selecciona de un grupo que consiste en LiCl, LiBr, Lil y LiOTf.

50

En una realización particular, el ácido de Lewis es LiBr.

En una realización, el agente de neutralización está en una solución que comprende un solvente halogenado y alcohol isopropílico.

5 En otra realización, el solvente halogenado es diclorometano o dicloroetano.

En otra realización más, el agente de neutralización es una monoalquil, dialquil o trialquilamina.

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

10 En otra realización, el agente de neutralización es N-etilmorfolino.

En una realización, el agente de desbloqueo utilizado en cada paso es una solución que comprende 4-cianopiridina, diclorometano, ácido trifluoroacético, trifluoroetanol y agua.

15 En una realización, el agente de desbloqueo utilizado en cada paso es una solución que comprende 4-cianopiridina, dicloroetano, ácido trifluoroacético, trifluoroetanol y agua.

En una realización, el agente de desbloqueo utilizado en cada paso es una solución que comprende 3,5-dimetilpiridina, diclorometano, ácido trifluoroacético, trifluoroetanol y agua.

20 En una realización, el agente de desbloqueo utilizado en cada paso es una solución que comprende 3,5-dimetilpiridina, dicloroetano, ácido trifluoroacético, trifluoroetanol y agua.

25 En una realización del compuesto oligomérico de la Fórmula (A11), n es 30 y R⁴ está en cada posición de 1 a 30 y de 5' a 3' :

Posición No. 5' a 3'	R ⁴	Posición No. 5' a 3'	R ⁴	Posición No. 5' a 3'	R ⁴
1	PC	11	Pensilvania	21	DPG
2	T	12	Pensilvania	22	PC
3	PC	13	DPG	23	Pensilvania
4	PC	14	DPG	24	T
5	Pensilvania	15	Pensilvania	25	T
6	Pensilvania	16	Pensilvania	26	T
7	PC	17	DPG	27	PC
8	Pensilvania	18	Pensilvania	28	T
9	T	19	T	29	Pensilvania
10	PC	20	DPG	30	DPG

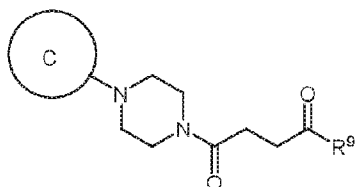
En una realización del compuesto oligomérico de la Fórmula (A11), n es 10 y R⁴ está en cada posición de 1 a 10 y de 5' a 3' :

Posición No. 5' a 3'	R ⁴
1	PC
2	T
3	PC
4	PC
5	Pensilvania
6	Pensilvania
7	PC
8	Pensilvania
9	T
10	PC

Procesos Continuos para Preparar Oligómeros de Morfolino en un Reactor de Flujo Continuo

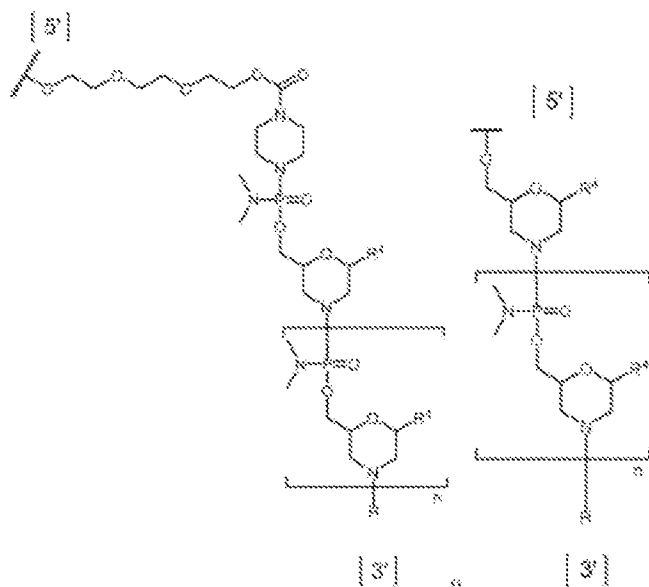
En la presente se proporciona un proceso continuo (de flujo continuo) para preparar oligómeros de morfolino en un reactor de flujo continuo.

Por consiguiente, en un aspecto, se proporciona en la presente un proceso continuo para preparar un compuesto oligomérico de la Fórmula (A11):

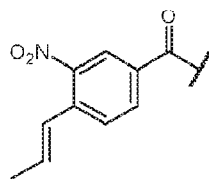


(A11);

en donde R⁹ es



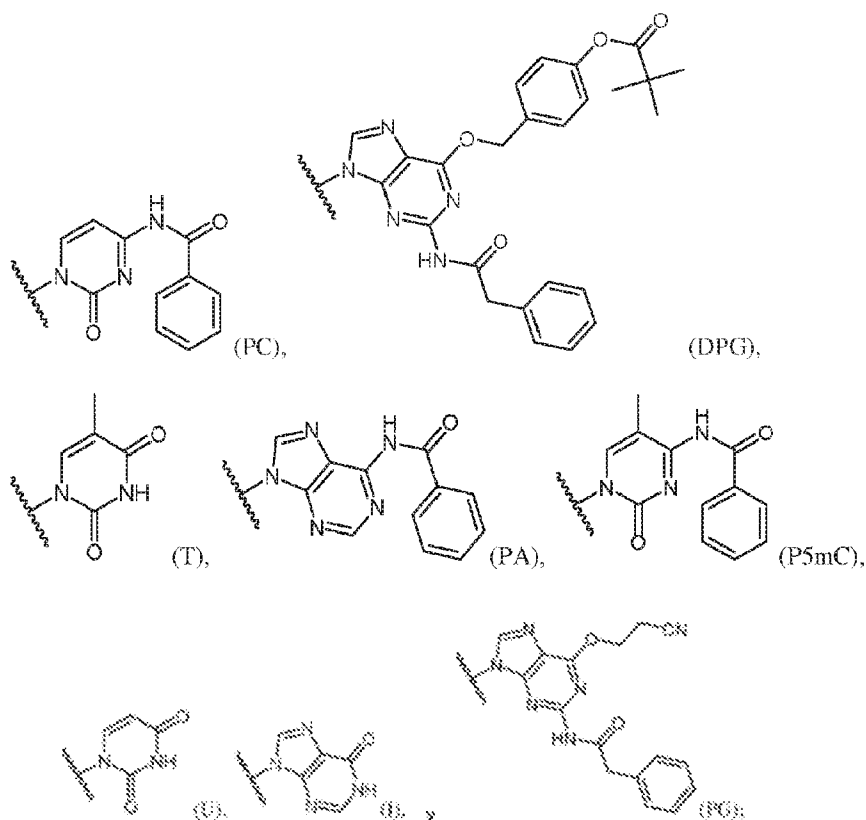
C es



o H;

n es un número entero de 9 a 39; y

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

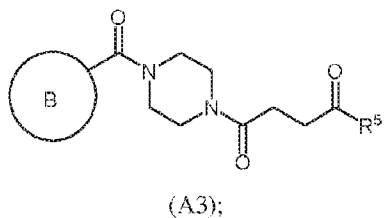


5

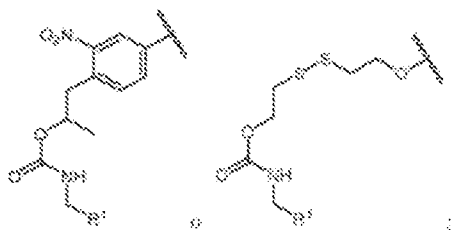
en donde el proceso comprende los pasos secuenciales de:

(a) poner en contacto un agente de desbloqueo con un compuesto de la Fórmula (A3):

10



en donde B es



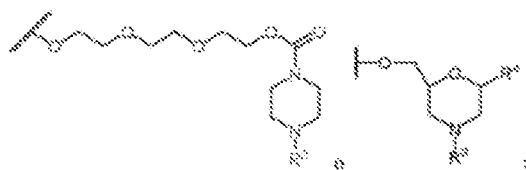
15

R¹ es un medio de soporte;

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

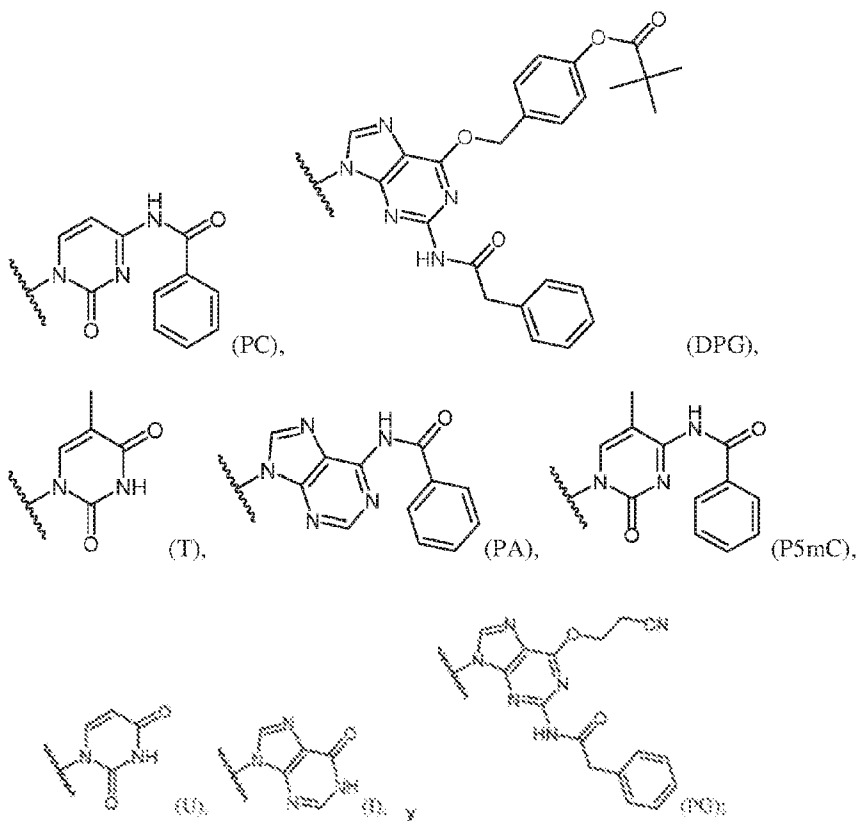
20

R⁵ es

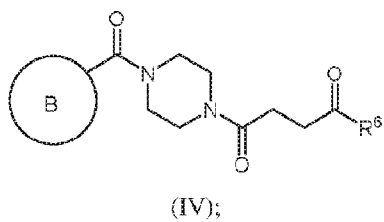


R³ se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y

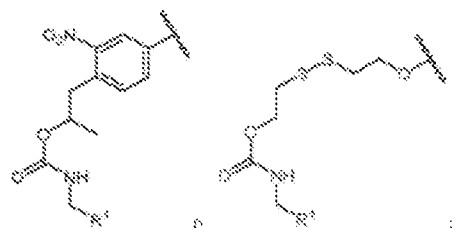
R^4 se selecciona del grupo que consiste en:



en un recipiente reactor para formar un compuesto de la Fórmula (IV):

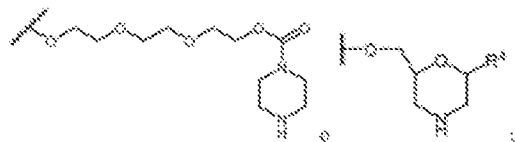


en donde B es



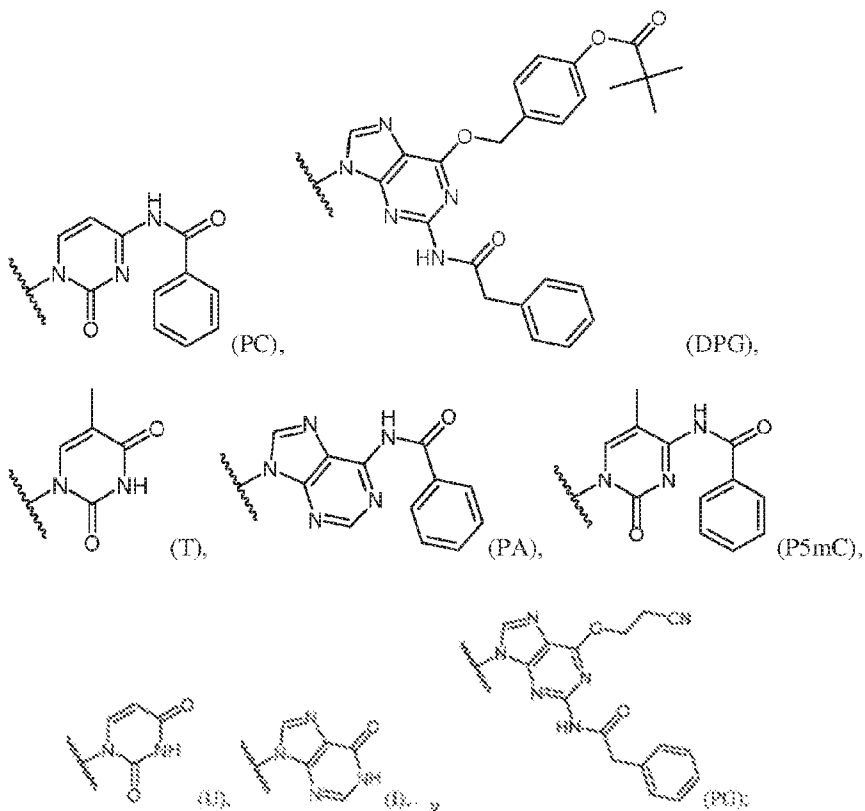
R¹ es un medio de soporte;

R⁶ es

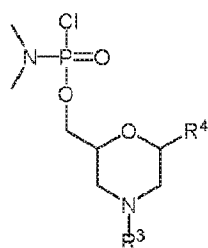


y

R⁴ se selecciona del grupo que consiste en:



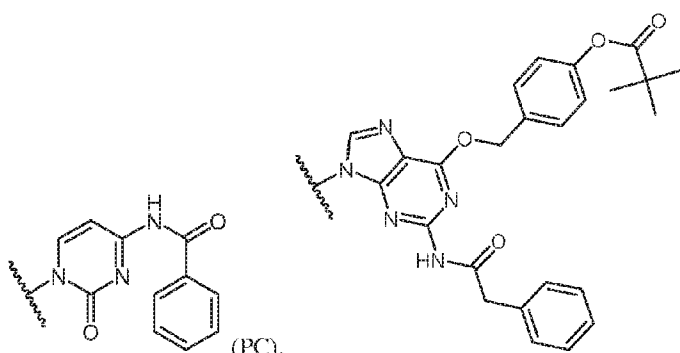
- (b) lavar el compuesto de la Fórmula (IV) con un solvente de lavado y un agente neutralizante, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado y un agente neutralizante a través del recipiente del reactor;
- (c) lavar el compuesto de la Fórmula (IV) con un solvente de lavado, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado a través del recipiente del reactor;
- (d) lavar el compuesto de la Fórmula (IV) con un solvente de acoplamiento, en el que el lavado comprende pasar un solvente de acoplamiento a través del recipiente del reactor;
- (e) introducir en la vasija del reactor un ácido de Lewis y un compuesto de la Fórmula (A4):



(A4);

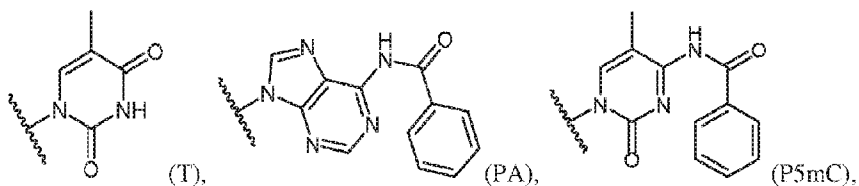
en donde

- 5 R^3 se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y R^4 se selecciona del grupo que consiste en:



(PC),

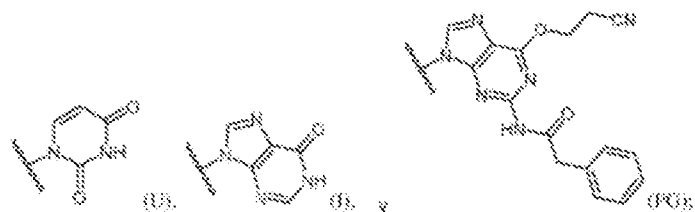
(DPG),



(T),

(PA),

(P5mC),

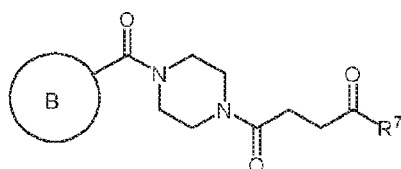


(B),

(B'),

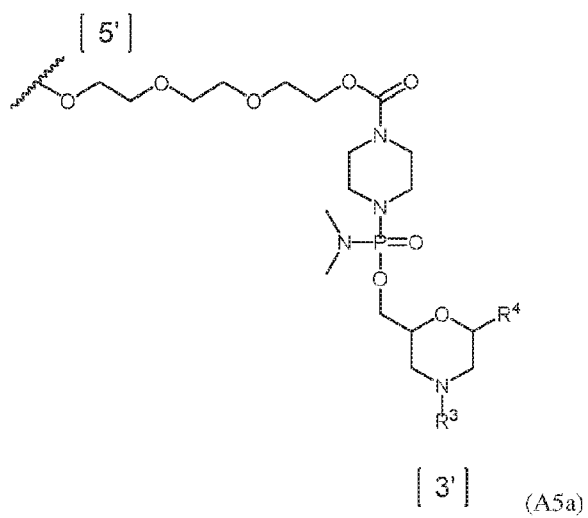
(PG),

- 15 de manera que el compuesto de fórmula (A4) entra en contacto con el compuesto de fórmula (IV) para formar un compuesto de fórmula (A5):

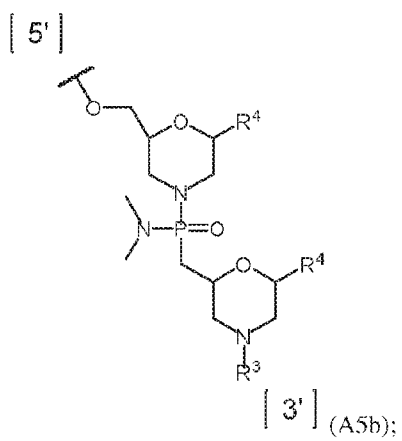


(A5);

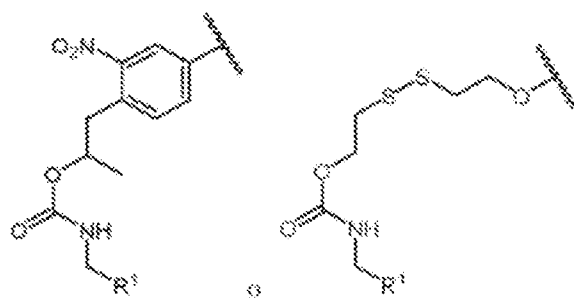
- 20 en la que R^7 es de la Fórmula (A5a) o Fórmula (A5b):



o



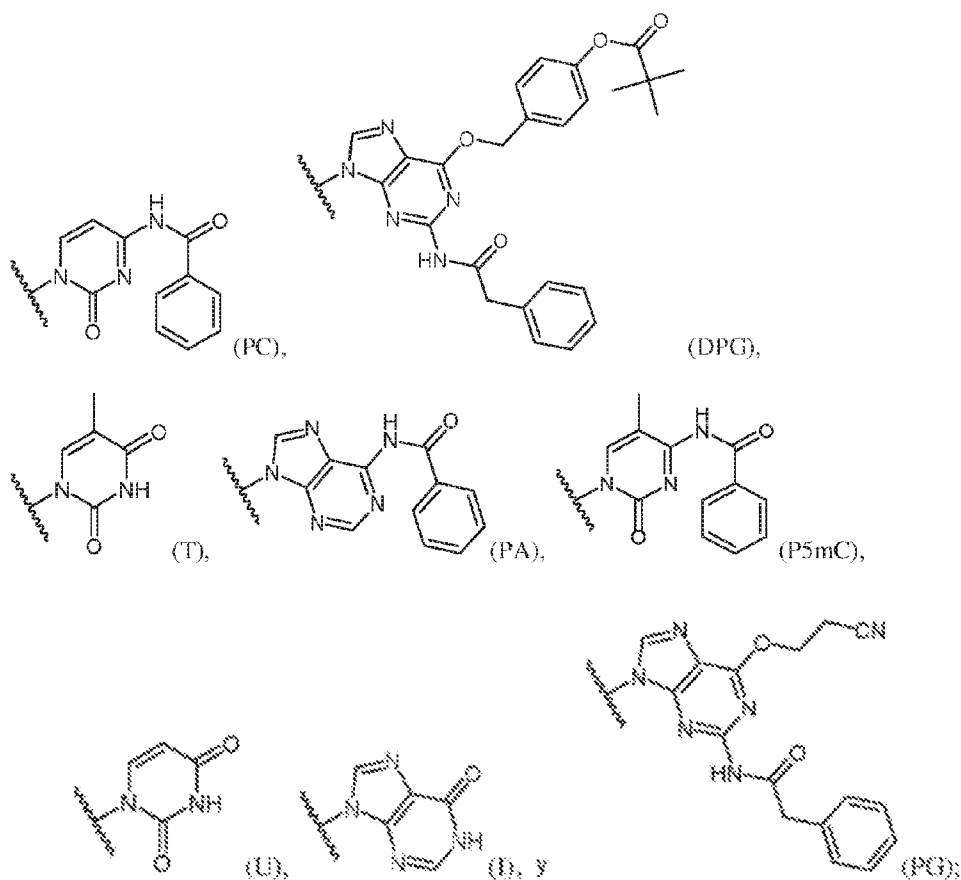
B es



R¹ es un medio de soporte;

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

R⁴ se selecciona entre:



5

(f) lavar el compuesto de la Fórmula (A5) con un solvente de acoplamiento, en el que el lavado comprende pasar un solvente de acoplamiento a través del recipiente del reactor;

10

(g) llevar a cabo iteraciones Y de los pasos secuenciales de:

(g1) lavar el producto formado en el paso inmediatamente anterior con un solvente de lavado, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado a través del recipiente del reactor;

15

(g2) introducir un agente de desbloqueo en la vasija del reactor de manera que entre en contacto con el producto formado en el paso inmediatamente anterior;

20

(g3) lavar el producto formado en el paso inmediatamente anterior con un solvente de lavado y un agente neutralizante, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado y un agente neutralizante a través del recipiente del reactor;

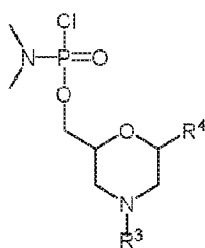
(g4) lavar el producto formado en el paso inmediatamente anterior con un solvente de lavado, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado a través del recipiente del reactor;

25

(g5) lavar el producto formado en el paso inmediatamente anterior con un solvente de acoplamiento, en el que el lavado comprende pasar un solvente de acoplamiento a través del recipiente del reactor;

(g6) introducir en el recipiente del reactor que contiene el producto formado en el paso inmediatamente anterior un ácido de Lewis y un compuesto de la Fórmula (A8):

30



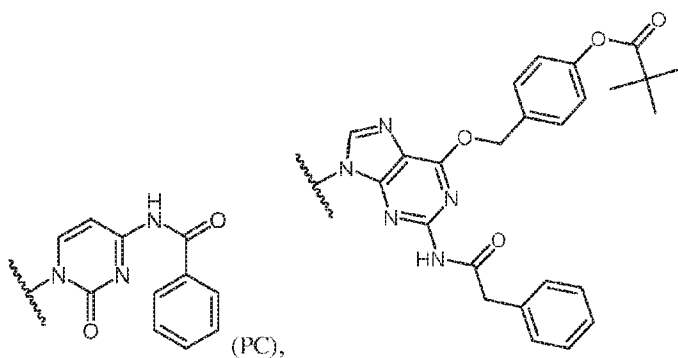
(A8);

en donde

Y es n-1 si R^7 es de la Fórmula (A5a) o Y es n-2 si R^7 es de la Fórmula (A5b);

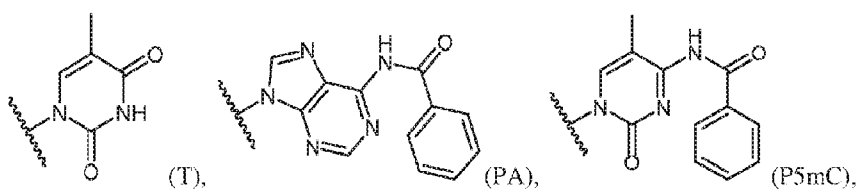
R^3 se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y

R^4 se selecciona, independientemente para cada compuesto de la Fórmula (A8), del grupo que consiste en:



(PC),

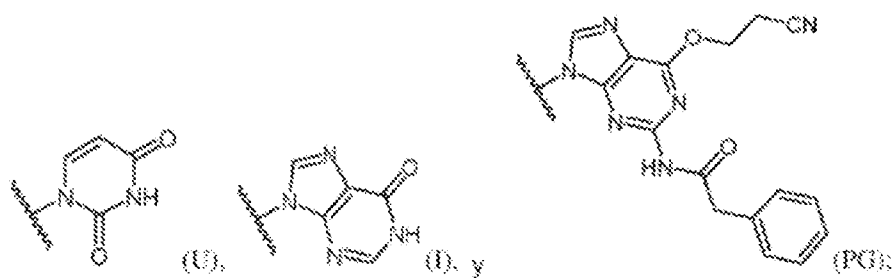
(DPG),



(T),

(PA),

(P5mC),

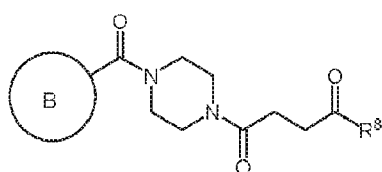


(U),

(I), y

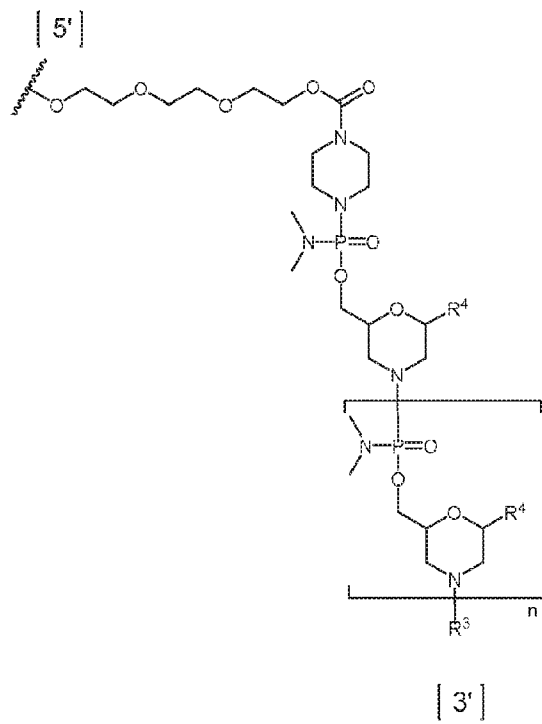
(PG);

de modo que el compuesto de la Fórmula (A8) entra en contacto con el compuesto formado en el paso inmediatamente anterior para formar un compuesto de la Fórmula (A9):



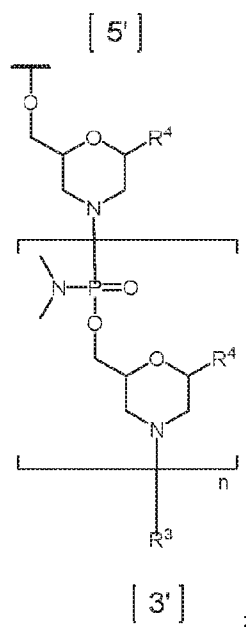
(A9);

en donde R^8 es



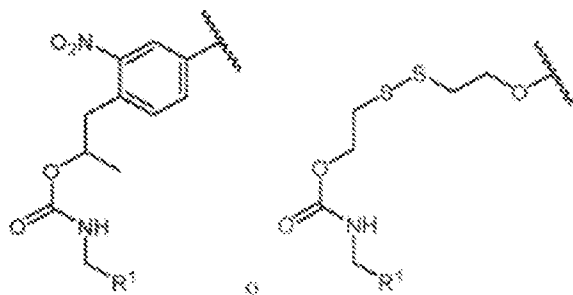
5

o



B es

10

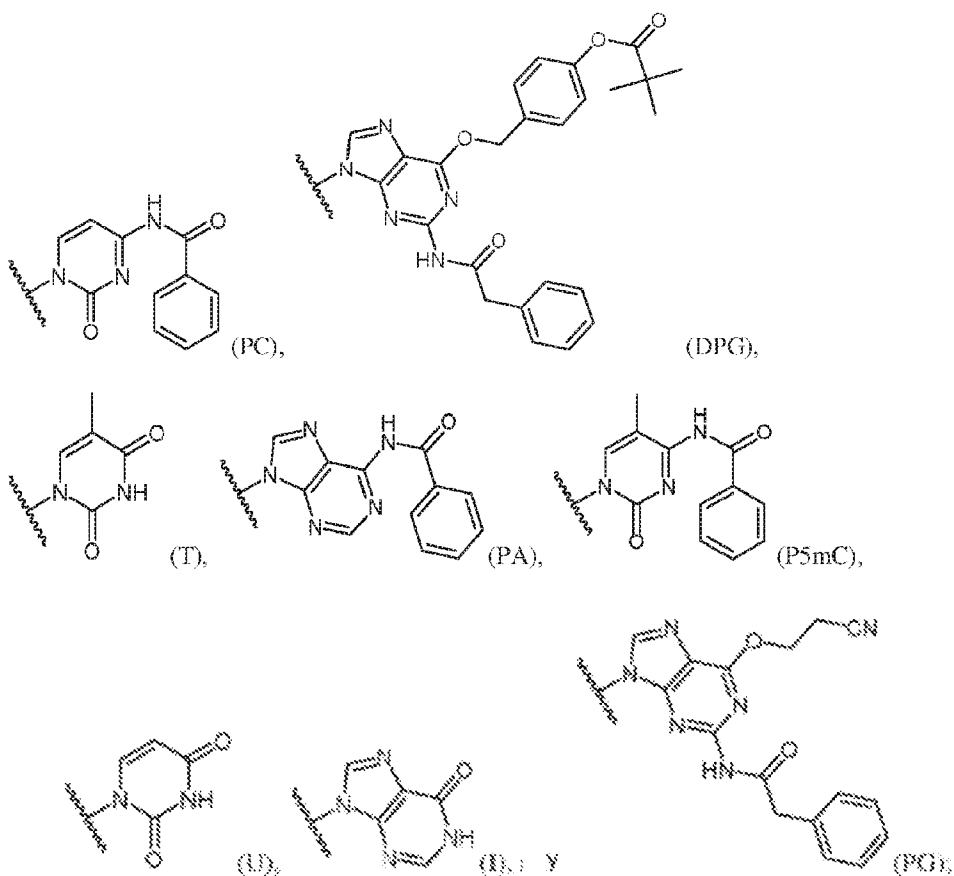


n es un número entero de 9 a 39;

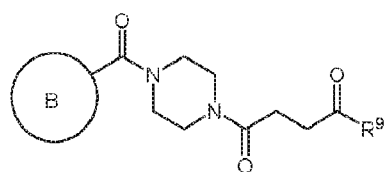
R¹ es un medio de soporte;

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

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

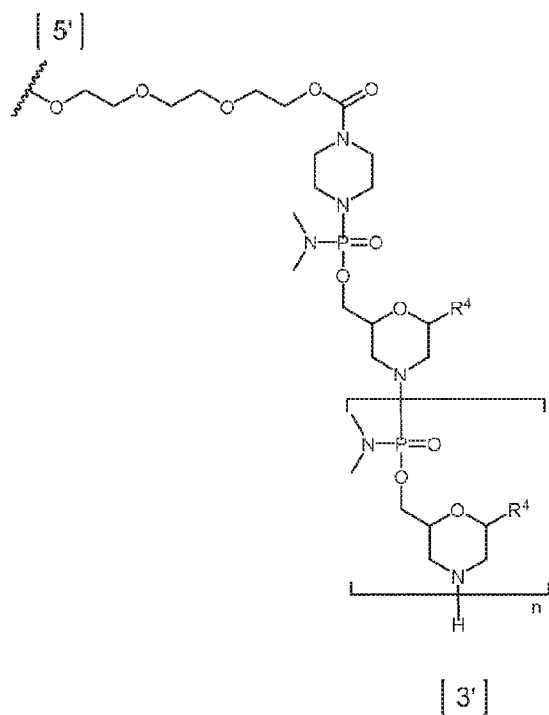


- (h) lavar el compuesto de la Fórmula (A9) con un solvente de acoplamiento para eliminar el compuesto de la Fórmula (A8), en el que el lavado comprende pasar un solvente de acoplamiento a través del recipiente del reactor;
- (i) lavar el compuesto de la Fórmula (A9) con un solvente de lavado para eliminar el solvente de acoplamiento, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado a través del recipiente del reactor;
- (j) poner en contacto un agente de desbloqueo con un compuesto de la Fórmula (A9) en un recipiente de reactor para formar un compuesto de la Fórmula (A10):

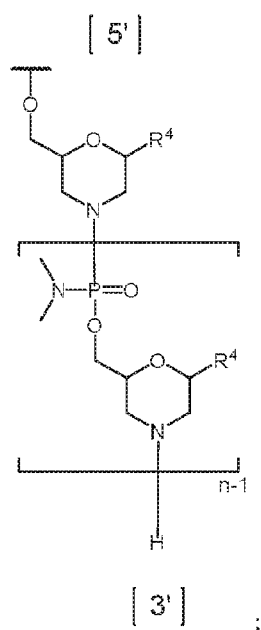


(A10);

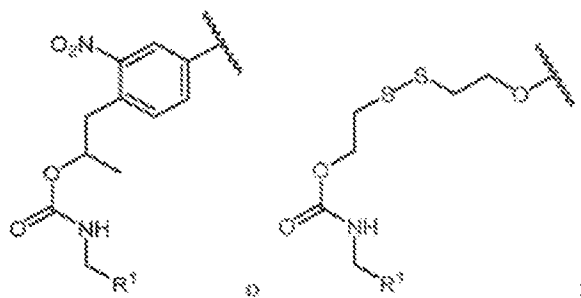
en donde R^9 es



o



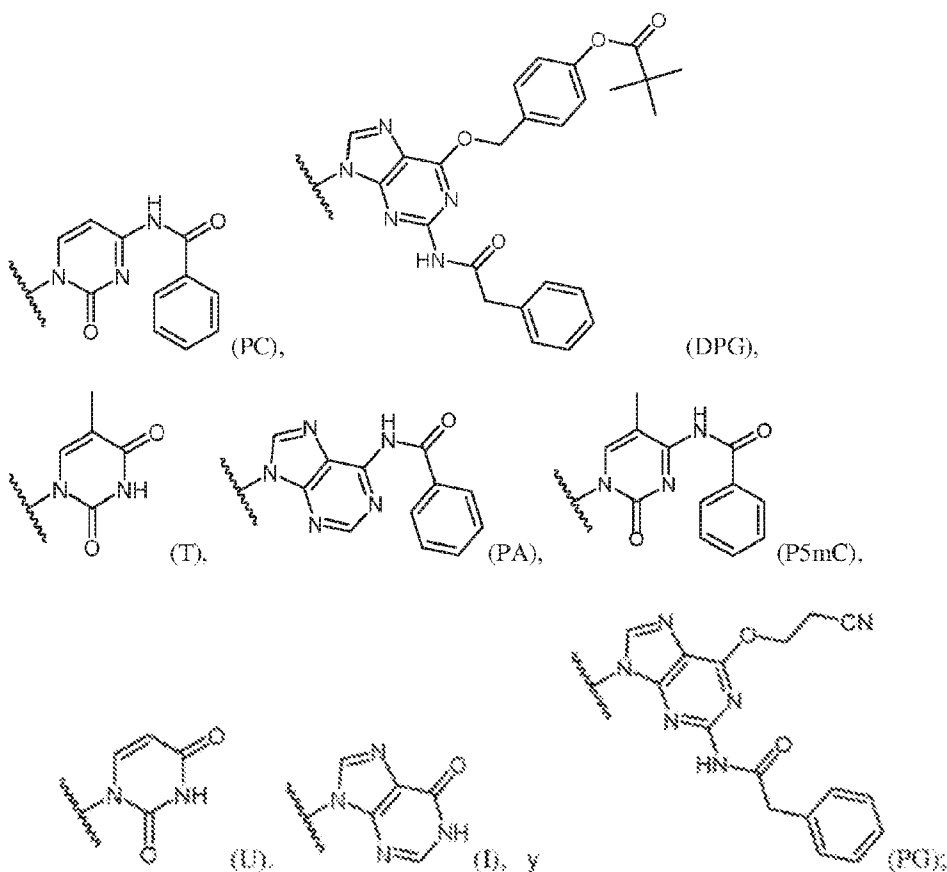
B es



n es un número entero de 10 a 40;

R¹ es un medio de soporte; y

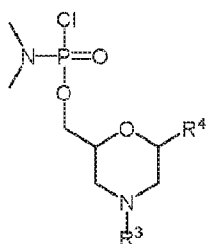
R⁴ se selecciona, independientemente para cada aparición, del grupo que consiste en:



y

(k) poner en contacto un agente de escisión con un compuesto de la Fórmula (10) en un recipiente reactor para formar un compuesto de la Fórmula (A11); en el que el proceso se lleva a cabo en un reactor de flujo continuo, comprendiendo el reactor de flujo continuo al menos:

- (a) una zona de alimentación, en donde la zona de alimentación comprende una o más líneas de alimentación, cada una equipada con una bomba, y en donde las zonas de entrada de las líneas de alimentación están conectadas independientemente a recipientes que comprenden un agente neutralizante, un solvente de acoplamiento, un agente de desbloqueo, un agente de lavado solvente y un compuesto de fórmula (A8):

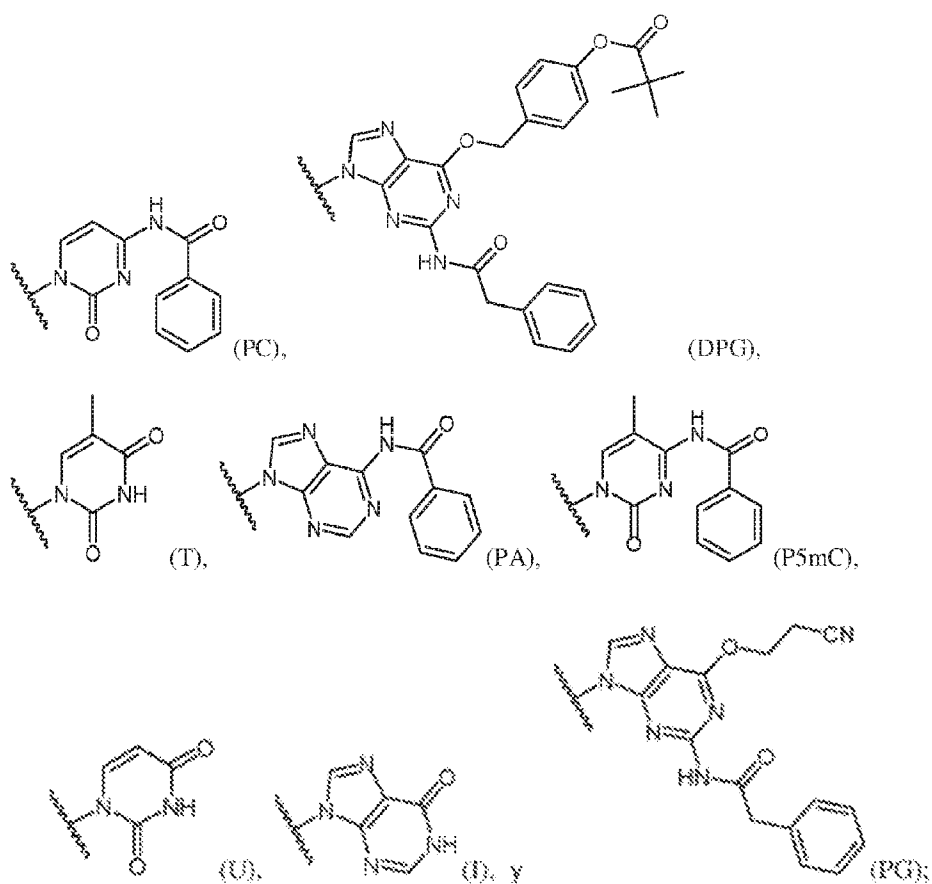


(A8);

en donde

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

10 R^4 se selecciona, independientemente para cada compuesto de la Fórmula (A8), del grupo que consiste en :



15 en el que el compuesto de la Fórmula (A8) se disuelve en un solvente de acoplamiento;

20 (b) una zona de reacción que está conectada a la zona de salida de una o más líneas de alimentación y que contiene una resina de síntesis de PMO;

(c) una zona de salida, mediante la cual el flujo o producto residual se puede recolectar de forma independiente;

25 (d) un dispositivo de control de presión; y

(e) un medio para controlar independientemente la temperatura de la zona de alimentación y la zona de reacción.

En una realización, el reactivo neutralizante es una monoalquil, dialquil o trialquilamina en una solución que comprende un solvente halogenado y alcohol isopropílico.

En otra realización, la monoalquil, dialquil o trialquil amina es N,N-diisopropiletilamina o N-etilmorfolino.

En otra realización más, el solvente halogenado es diclorometano o dicloroetano.

En una realización, el solvente de acoplamiento es bromuro de litio disuelto en 3-dimetil-2-imidazolidinona o N-metil-2-pirrolidona.

En otra realización, el agente de desbloqueo es una solución que comprende 4-cianopiridina, diclorometano, ácido trifluoroacético y trifluoroetanol.

En otra realización más, el agente de desbloqueo es una solución que comprende 4-cianopiridina, dicloroetano, ácido trifluoroacético y trifluoroetanol.

En una realización adicional, el agente de desbloqueo es una solución que comprende 3,5-dimetilpiridina, diclorometano, ácido trifluoroacético y trifluoroetanol.

En una realización, el agente de desbloqueo es una solución que comprende 3,5-dimetilpiridina, dicloroetano, ácido trifluoroacético y trifluoroetanol.

En una realización, el solvente de lavado es dicloroetano o diclorometano.

En otra realización, el compuesto de la Fórmula (A8) está en una solución de 3-dimetil-2-imidazolidinona o N-metil-2-pirrolidona.

En otra realización más, la bomba es una bomba de HPLC o de jeringa.

En una realización adicional, la zona de alimentación y la zona de reacción están conectadas mediante un conector luer lock.

En una realización, la zona de reacción comprende un recipiente reactor y un baño de control de temperatura.

En una realización, la vasija del reactor está equipada con una frita de manera que la resina de síntesis de PMO no se elimina durante el proceso.

En otra realización más, la vasija del reactor está equipada con una frita de 2 µm.

En otra realización, el dispositivo de control de presión es un regulador de contrapresión.

En una realización particular, el reactor de flujo continuo se utiliza para la preparación de Eteplirsén.

Oligómeros

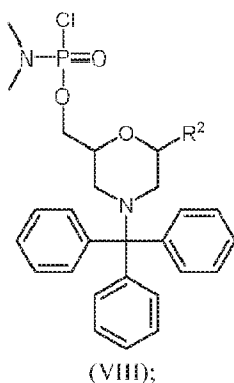
Las propiedades importantes de las subunidades basadas en morfolino incluyen: 1) la capacidad de unirse en forma oligomérica mediante enlaces estructurales estables, sin carga o con carga positiva; 2) la capacidad de soportar una base de nucleótidos (por ejemplo, adenina, citosina, guanina, timidina, uracilo, 5-metilcitosina e hipoxantina) de modo que el polímero formado pueda hibridarse con un ácido nucleico diana de base complementaria, incluido el ARN diana; 3) la capacidad del oligómero para ser transportado activa o pasivamente al interior de células de mamíferos; y 4) la capacidad del oligómero y del oligómero: heterodúplex de ARN para resistir la degradación de ARNasa y ARNasa H, respectivamente.

En algunas realizaciones, los oligómeros antisentido contienen modificaciones o sustituciones de bases. Por ejemplo, se pueden seleccionar ciertas nucleobases para aumentar la afinidad de unión de los oligómeros antisentido descritos en la presente. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico entre 0,6 y 1,2°C y pueden incorporarse a los oligómeros antisentido descritos en la presente. En una realización, al menos una base de pirimidina del oligómero comprende una base de pirimidina sustituida en 5, en la que la base de pirimidina se selecciona del grupo que consiste en citosina, timina y uracilo. En una realización, la base de pirimidina 5-sustituida es 5-metilcitosina. En otra realización, al menos una base purínica del oligómero comprende hipoxantina.

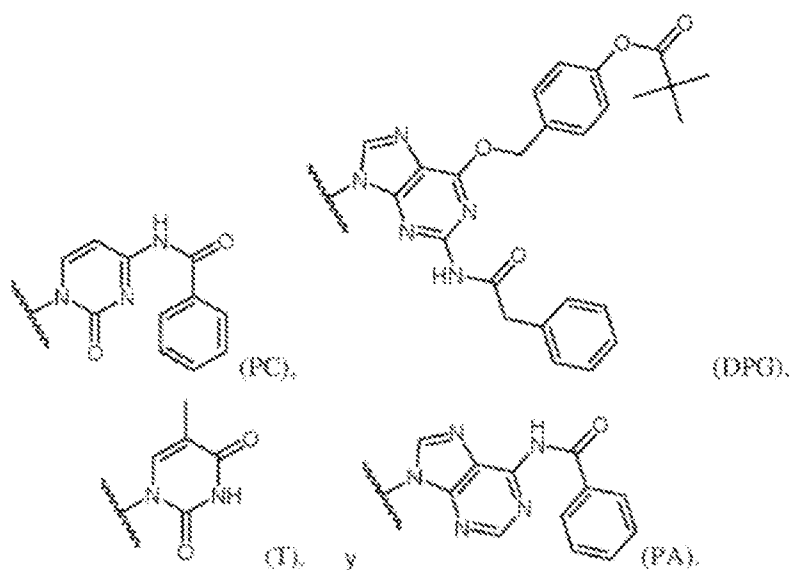
Los oligómeros basados en morfolino (incluidos los oligómeros antisentido) se detallan, por ejemplo, en las patentes estadounidenses números 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.185.444, 5.521.063, 5.506.337, 8.299,2, 06 y 8.076.476, Publicaciones de Solicitudes de Patentes Internacionales Nos. WO /2009/064471 y WO/2012/043730, y Summerton et al.

Los compuestos oligoméricos de la divulgación 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, pages 1119-1190, and March, J., Advanced Organic Chemistry, 3d. Ed., Chap. 4, John Wiley & Sons, Nueva York (1985)), y puede presentarse como racematos, mezclas racémicas y como diastereómeros individuales, con todos posibles isómeros y mezclas de los mismos, incluidos isómeros ópticos. Los compuestos oligoméricos de la divulgación aquí mencionados específicamente, sin ninguna indicación de su estereoquímica, pretenden representar todos los posibles isómeros y mezclas de los mismos.

Específicamente, sin desear quedar limitado a ninguna teoría particular, los compuestos oligoméricos de la divulgación se preparan, como se analiza en la presente, a partir de subunidades de morfolino activadas que incluyen ejemplos no limitantes tales como un compuesto de la Fórmula (VIII):



en la que R² se selecciona, independientemente para cada compuesto de la Fórmula (VIII), del grupo que consiste en:

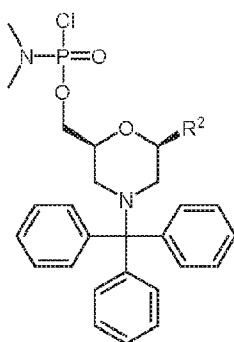


Cada uno de los compuestos de la Fórmula (VIII) mencionados anteriormente se puede preparar, por ejemplo, a partir del correspondiente beta-D-ribofuranosilo como se representa a continuación:



Ver Summerton et al., Antisense & Nucleic Acid Drug Dev. 7:187-195 (1997). Sin estar limitado a ninguna teoría particular, la estereoquímica de los dos carbonos quirales se conserva en condiciones sintéticas tales que se puede producir un número de posibles estereoisómeros de cada subunidad de morfolino basándose en la selección de, por ejemplo, un alfa-L-material de partida ribofuranosilo, alfa-D-ribofuranosilo, beta-L-ribofuranosilo o beta-D-ribofuranosilo.

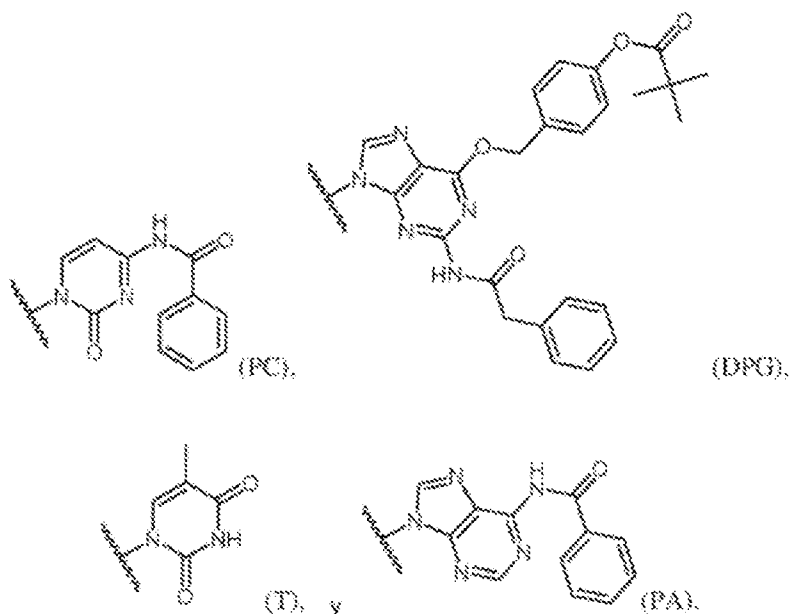
Por ejemplo, en algunas realizaciones, un compuesto de la Fórmula (VIII) de la divulgación puede ser de la Fórmula (VIIIa):



(VIIIa);

5

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



10 Sin estar limitado a ninguna teoría particular, la incorporación de 10 a 40 compuestos de la Fórmula (VIII), por ejemplo, en un compuesto oligomérico de la divulgación puede dar como resultado numerosos estereoisómeros posibles.

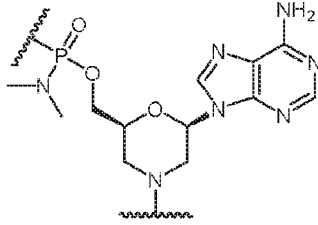
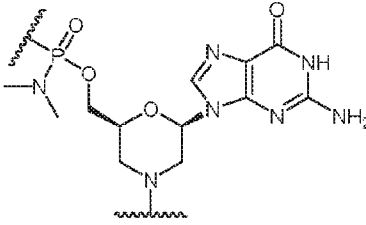
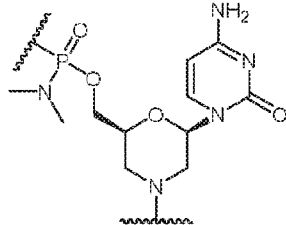
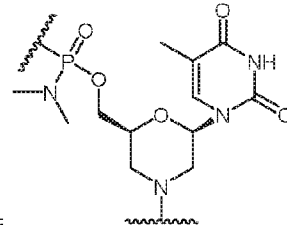
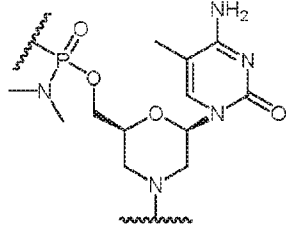
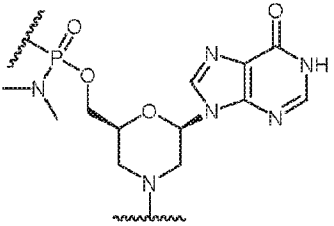
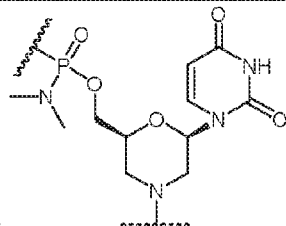
15 Sin desear estar limitado a ninguna teoría particular, los compuestos oligoméricos de la divulgación comprenden uno o más que contienen fósforo. intersubunidades, que crean un centro quiral en cada fósforo, cada uno de los cuales se designa como una configuración "Sp" o "Rp" como se entiende en la técnica. Sin desear estar limitado a ninguna teoría en particular, esta quiralidad crea estereoisómeros, que tienen una composición química idéntica pero una disposición tridimensional diferente de sus átomos.

20 Sin desear estar limitado a ninguna teoría particular, la configuración de cada enlace entre subunidades de fósforo ocurre aleatoriamente durante la síntesis de, por ejemplo, compuestos oligoméricos de la divulgación. Sin desear estar limitado a ninguna teoría particular, el proceso de síntesis genera un número exponencialmente grande de estereoisómeros de un compuesto oligomérico de la divulgación porque los compuestos oligoméricos de la divulgación están compuestos de numerosos enlaces entre subunidades de fósforo, teniendo cada enlace entre subunidades de fósforo un enlace quiral aleatorio. configuración. Específicamente, sin desear estar limitado a ninguna teoría particular, cada enlace entre subunidades de una subunidad morfolino adicional duplica el número de estereoisómeros del producto, de modo que una preparación convencional de un compuesto oligomérico de la divulgación es de hecho una mezcla altamente heterogénea de 2^N estereoisómeros, donde N representa el número de enlaces entre subunidades de fósforo.

De esta manera, a menos que se indique lo contrario, se incluyen todos estos isómeros, incluidas mezclas diastereoméricas y enantioméricas, y enantiómeros y diastereómeros puros, como, por ejemplo, cuando uno o más enlaces de uno o más estereocentros se indican mediante "-" o "~" o su equivalente según se entenderá en el art.

5 La Tabla 1 representa diversas realizaciones de subunidades de morfolino proporcionadas en los procesos descritos en la presente.

Table 1: Various embodiments of morpholino subunits.

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

10

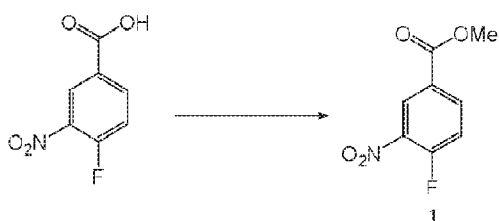
EJEMPLOS

A continuación se exponen ejemplos con fines ilustrativos y para describir ciertas realizaciones específicas de la divulgación. Sin embargo, el alcance de las reivindicaciones no debe verse limitado de ninguna manera por los ejemplos establecidos en la presente. Varios cambios y modificaciones a las realizaciones divulgadas serán evidentes para los expertos en la técnica y dichos cambios y modificaciones, incluidos, entre otros, los relacionados con las estructuras químicas, sustituyentes, derivados, formulaciones o métodos de la divulgación, se pueden llevar a cabo sin apartarse de el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Las definiciones de las variables en las estructuras de los esquemas dla presente son proporcionales a las de las posiciones correspondientes en las fórmulas presentadas en la presente.

Ejemplo 1: Síntesis de Anclaje NCP2

1. Preparación de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo (1)

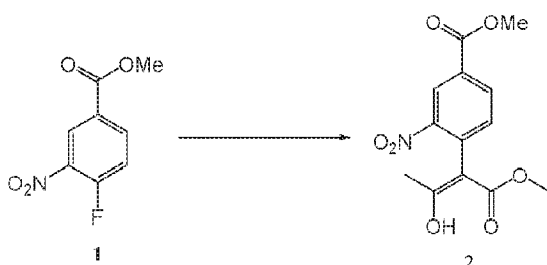
25



En un matraz de 100 litros se cargaron 12,7 kg de ácido 4-fluoro-3-nitrobenzoico, se agregaron 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 durante 4 horas y luego se filtró bajo nitrógeno. Se lavó el matraz de 100 litros y la torta de filtración se lavó con 10 kg de metanol que se había enfriado a 0°C. La torta de filtración sólida se secó en el embudo durante 1 hora, se transfirió a bandejas y se secó en un horno de vacío a temperatura ambiente para un peso constante de 13,695 kg de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo (100 % de rendimiento; HPLC 99 %).

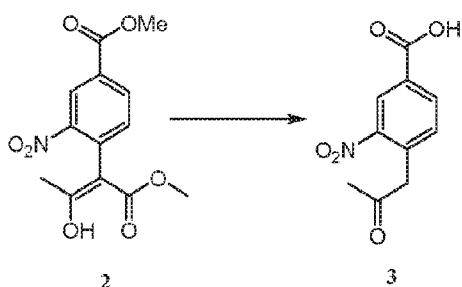
2. Preparación de ácido 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoico

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



En un matraz de 100 litros se cargaron 3,98 kg de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo (1) del paso anterior, 9,8 kg de DMF y 2,81 kg de acetoacetato de metilo. La mezcla se agitó y se enfrió a 0°C. A esto se le agregaron 3,66 kg de DBU durante aproximadamente 4 horas mientras la temperatura se mantenía a 5°C o menos. La mezcla se agitó durante 1 hora más. Al matraz de reacción se le agregó una solución de 8,15 kg de ácido cítrico en 37,5 kg de agua purificada mientras la temperatura de reacción se mantenía a 15°C o menos. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos más y luego se filtró bajo nitrógeno. La torta de filtración húmeda se regresó al matraz de 100 litros junto con 14,8 kg de agua purificada. La suspensión se agitó durante 10 minutos y luego se filtró. La torta húmeda se regresó nuevamente al matraz 1001, se suspendió con 14,8 kg de agua purificada durante 10 minutos y se filtró hasta (Z)-metil 4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoato.

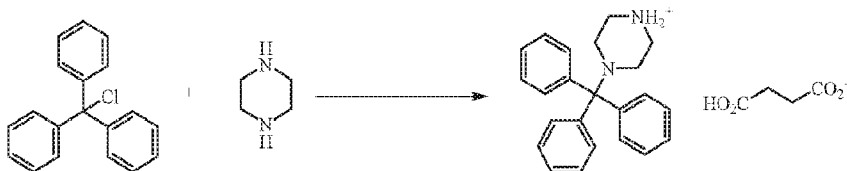
Ácido 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoico



El 4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoato de (Z)-metilo crudo se cargó en un matraz de reacción de 100 litros en atmósfera de nitrógeno. A esto se le agregaron 14,2 kg de 1,4-dioxano y se agitó. A la mezcla se agregó una solución de 16,655 kg de HCl concentrado y 13,33 kg de agua purificada (HCl 6 M) durante 2 horas mientras la temperatura de la mezcla de reacción se mantenía por debajo de 15°C. Cuando se completó la adición, 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 filtración sólida se trituroó con 14,8 kg de agua purificada, se filtró, se trituroó de nuevo con 14,8 kg de agua purificada y se filtró. El sólido se regresó al matraz de 100 litros con 39,9 kg de DCM y se sometió a reflujo con agitación durante 1 hora. Se agregaron 1,5 kg de agua purificada para disolver los sólidos restantes. La capa orgánica del fondo se dividió en un matraz de 72 litros pre-calentado y luego se regresó a un matraz de 100 litros limpio y seco. La solución se enfrió a 0°C, se mantuvo durante 1 hora y luego se filtró. La torta de filtración sólida se lavó dos veces cada una con una solución de 9,8 kg de DCM y 5 kg de heptano y luego se secó en el embudo. El sólido se transfirió a bandejas y se secó hasta un peso

constante de 1,855 kg de ácido 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoico. Rendimiento global 42 % a partir del compuesto 1. HPLC 99,45 %.

3. Preparación de succinato de N-tritilpiperazina (NTP)

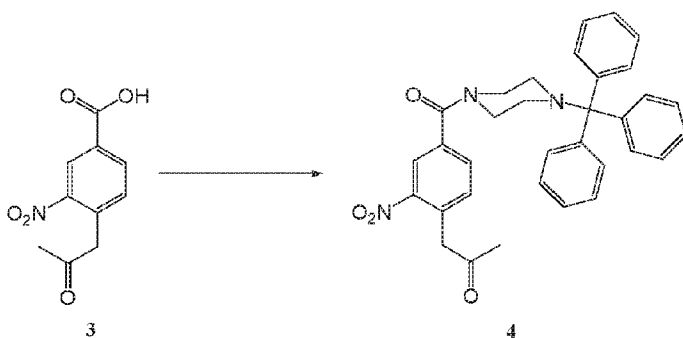


En un matraz con camisa de 72 litros se cargaron bajo nitrógeno 1,805 kg de cloruro de trifenilmetilo y 8,3 kg de tolueno (solución de TPC). La mezcla se agitó hasta que los sólidos se disolvieron. A un matraz de reacción con camisa de 100 litros se agregaron en atmósfera de nitrógeno 5,61 kg de piperazina, 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 mantenía a 10°C o por debajo. La mezcla se agitó durante 1,5 horas a 10°C, luego se dejaron calentar a 14°C. Se cargaron 32,6 kg de agua purificada en el matraz de 72 litros, luego se transfirieron al matraz de 100 litros mientras la temperatura interna del lote se mantenía a 20+/-5°C. Se dejó que las capas se dividieran y se la capa acuosa inferior se separó y 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.

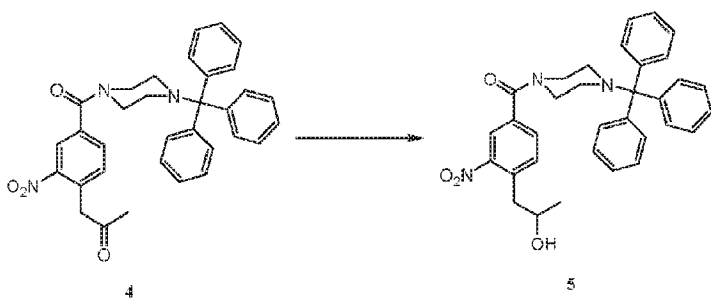
La capa orgánica restante se enfrió a 18°C y se agregó lentamente en porciones a la capa orgánica una solución de 847 g de ácido succínico en 10,87 kg de agua purificada. La mezcla se agitó durante 1,75 horas a 20+/-5°C. La mezcla se filtró y los sólidos se lavaron con 2 kg de TBME y 2 kg de acetona y después se secaron en el embudo. La torta de filtración se trituró dos veces con 5,7 kg cada una de acetona y se filtró y se lavó con 1 kg de acetona entre trituraciones. El sólido se secó en el embudo, luego se transfirió a bandejas y se secó en un horno de vacío a temperatura ambiente hasta un peso constante de 2,32 kg de NTP. Rendimiento 80%.

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

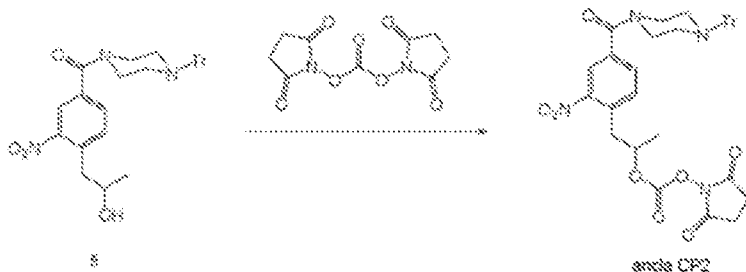
A. Preparación de 1-(2-Nitro-4(4-Tritilpiperazina-1-Carbonil)Fenil)Propan-2-ona



En un matraz con camisa de 100 litros se cargaron bajo nitrógeno 2 kg de ácido 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoico (3), 18,3 kg de DCM, 1,845 kg de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC.HCl). La solución se agitó hasta que se formó una mezcla homogénea. Se agregaron 3,048 kg de NTP durante 30 minutos a temperatura ambiente y se agitaron durante 8 horas. Se agregaron 5,44 kg de agua purificada a la mezcla de reacción y se agitó durante 30 minutos. Se dejó que las capas se separaran y la capa orgánica inferior que contenía el producto se drenó y almacenó. La capa acuosa se extrajo dos veces con 5,65 kg de DCM. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución de 1,08 kg de cloruro sódico en 4,08 kg de agua purificada. Las capas orgánicas se secaron sobre 1,068 kg de sulfato sódico y se filtraron. El sulfato de sodio se lavó con 1,3 kg de DCM. Las capas orgánicas combinadas se suspendieron con 252 g de gel de sílice y se filtraron a través de un embudo filtrante que contenía un lecho de 252 g de gel de sílice. El lecho de gel de sílice se lavó con 2 kg de DCM. Las capas orgánicas combinadas se evaporaron en un rotavapor. Se agregaron 4,8 kg de THF al residuo y luego se evaporaron en el rotavapor hasta que se alcanzaron 2,5 volúmenes de la 1-(2-nitro-4(4-tritilpiperazina-1-carbonil)fenil)propan-2-ona cruda en THF.

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

En un matraz con camisa de 100 litros se cargaron bajo nitrógeno 3600 g de **4** de el paso anterior y 9800 g de THF. La solución agitada se enfrió a $\leq 5^{\circ}\text{C}$. La solución se diluyó con 11525 g de etanol y se agregaron 194 g de borohidruro de sodio durante aproximadamente 2 horas a $\leq 5^{\circ}\text{C}$. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas más a $\leq 5^{\circ}\text{C}$. La reacción se detuvo con una solución de aproximadamente 1,1 kg de cloruro de amonio en aproximadamente 3 kg de agua mediante adición lenta para mantener la temperatura a $\leq 10^{\circ}\text{C}$. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos más, se filtró para eliminar los compuestos inorgánicos, se recargó en un matraz con camisa de 100 litros y se extrajo con 23 kg de DCM. La capa orgánica se separó y la acuosa 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 y luego se secaron sobre 2,7 kg de sulfato de sodio. La suspensión se filtró y la torta de filtración se lavó con 2 kg de DCM. Los filtrados combinados se concentraron hasta 2,0 volúmenes, se diluyeron con aproximadamente 360 g de acetato de etilo y se evaporaron. El producto crudo se cargó en una columna de gel de sílice de 4 kg de sílice rellena con DCM en atmósfera de nitrógeno y se eluyó con 2,3 kg de acetato de etilo en 7,2 kg de DCM. Las fracciones combinadas se evaporaron y el residuo se recolectó en 11,7 kg de tolueno. La solución de tolueno se filtró y la torta de filtración se lavó dos veces con 2 kg de tolueno cada vez. La torta de filtración se secó hasta un peso constante de 2,275 kg de compuesto **5** (46 % de rendimiento del compuesto **3**) HPLC 96,99 %.

5. Preparación de carbonato de 2,5-dioxopirrolidin-1-il (1-(2-nitro-4-(4-trifenilmetilpiperazina-1-carbonil)fenil)propan-2-ilo (anclaje NCP2)

En un matraz con camisa de 100 litros se cargaron bajo nitrógeno 4,3 kg del compuesto **5** (peso ajustado basándose en el tolueno residual mediante ^1H NMR; todos los reactivos a continuación se sellaron en consecuencia) y 12,7 kg de piridina. A esto se cargaron 3,160 kg de DSC (78,91% en peso por ^1H NMR) mientras la temperatura interna se mantenía a $\leq 35^{\circ}\text{C}$. La mezcla de reacción se dejó reposar durante aproximadamente 22 horas a temperatura ambiente y después se filtró. La torta de filtración se lavó con 200 g de piridina. En dos lotes, cada uno de los cuales comprendía la mitad del volumen de filtrado, el lavado del filtrado se cargó lentamente en un matraz con camisa de 100 litros que contenía una solución de aproximadamente 11 kg de ácido cítrico en aproximadamente 50 kg de agua y se agitó durante 30 minutos para permitir la precipitación de sólidos. El sólido se recolectó con un embudo de filtración, se lavó dos veces con 4,3 kg de agua por lavado y se secó en el embudo de filtración al vacío.

Los sólidos combinados se cargaron en un matraz con camisa de 100 litros y se disolvieron en 28 kg de DCM y se lavaron con una solución de 900 g de carbonato potásico en 4,3 kg de agua. Después de 1 hora, se dejó que las capas se separaran y se eliminó la capa acuosa. La capa orgánica se lavó con 10 kg de agua, se separó y se secó sobre 3,5 kg de sulfato sódico. El DCM se filtró, se evaporó y se secó al vacío hasta obtener 6,16 kg de **anclaje NCP2** (rendimiento del 114%).

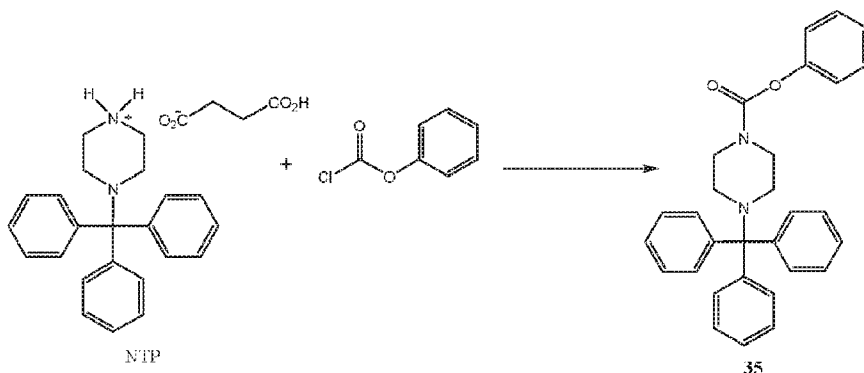
Ejemplo 2: Síntesis de Resina Cargada con Anclaje

En un reactor de síntesis en fase sólida de 75 litros con una llave de paso de teflón se cargaron aproximadamente 52 litros de NMP y 2300 g de resina de aminometilpoliestireno. La resina se agitó en NMP hasta que se hinchara durante aproximadamente 2 horas y luego se drenó. La resina se lavó dos veces con aproximadamente 4L de DCM por lavado, luego dos veces con 39L de solución de neutralización por lavado, luego dos veces con 39L de DCM por lavado. Se agregó lentamente la solución de anclaje NCP2 a la solución de resina en agitación, se agitó durante 24 horas a

temperatura ambiente y se drenó. La resina se lavó cuatro veces con 39L de NMP por lavado y seis veces con 39L de DCM por lavado. La resina se trató y se agitó con la mitad de la solución de protección DEDC durante 30 minutos, se drenó y se trató y se agitó con la segunda mitad de la solución de protección DEDC durante 30 minutos y se drenó. La resina se lavó seis veces con 39L de DCM por lavado y luego se secó en un horno hasta un peso constante de 3573,71 g de resina cargada con anclaje.

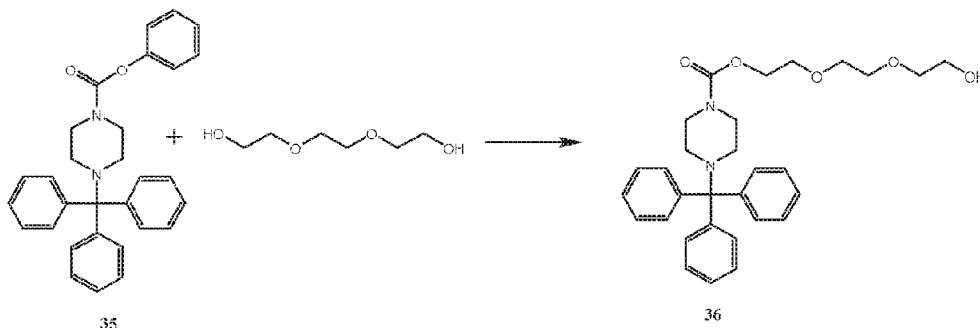
Ejemplo 3: Preparación de la Cola EG3 Activada

1. Preparación de Fenilcarbamato de Tritilo Piperazina 35



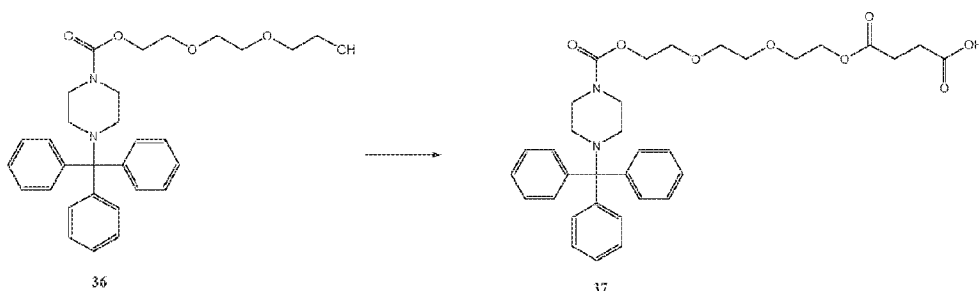
A una suspensión enfriada de NTP en diclorometano (6 ml/g de NTP) se agregó una solución de carbonato de potasio (3,2 eq) en agua (4 ml/g de carbonato de potasio). A esta mezcla de dos fases se agregó lentamente una solución de cloroformiato de fenilo (1,03 eq) en diclorometano (2 g/g de cloroformiato de fenilo). La mezcla de reacción se calentó a 20°C. Una vez completada la reacción (1-2 h), se separaron las capas. La capa orgánica se lavó con agua y se secó sobre carbonato potásico anhidro. El producto 35 se aisló por cristalización en acetonitrilo. Rendimiento = 80%

2. Preparación de Alcohol Carbamato 36



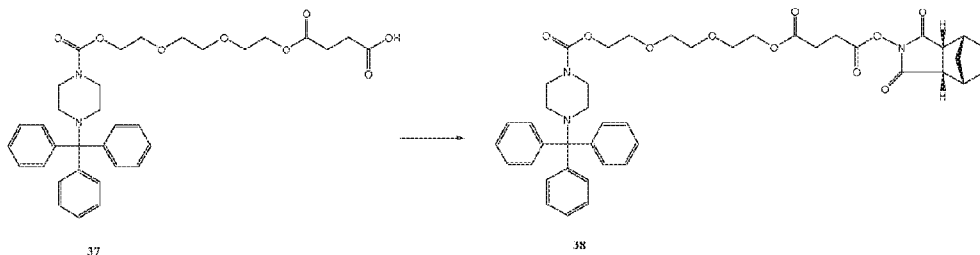
Se suspendió hidruro de sodio (1,2 eq) en 1-metil-2-pirrolidinona (32 ml/g de hidruro de sodio). A esta suspensión se le agregaron trietilenglicol (10,0 eq) y el compuesto 35 (1,0 eq). La suspensión resultante se calentó a 95°C. Una vez completada la reacción (1-2 h), la mezcla se enfrió a 20°C. A esta mezcla se le agregó diclorometano al 30%/éter metil terc-butílico (v:v) y agua. La capa orgánica que contenía el producto se lavó sucesivamente con NaOH acuoso, ácido succínico acuoso y cloruro sódico acuoso saturado. El producto 36 se aisló por cristalización en diclorometano/metil terc-butil éter/heptano. Rendimiento = 90%.

3. Preparación de Ácido de Cola EG3 37



A una solución del compuesto 36 en tetrahidrofurano (7 ml/g de 36) se le agregó anhídrido succínico (2,0 eq) y DMAP (0,5 eq). La mezcla se calentó a 50°C. Una vez completada la reacción (5 h), la mezcla se enfrió a 20 °C y se ajustó a pH 8,5 con NaHCO₃ acuoso. Se agregó metil terc-butil éter y el producto se extrajo en la capa acuosa. Se agregó diclorometano y la mezcla se ajustó a pH 3 con ácido cítrico acuoso. La capa orgánica que contenía el producto se lavó con una mezcla de amortiguador citrato de pH = 3 y cloruro sódico acuoso saturado. Esta solución de diclorometano de 37 se usó sin aislamiento en la preparación del compuesto 38.

4. Preparación de la Cola EG3 Activada 38



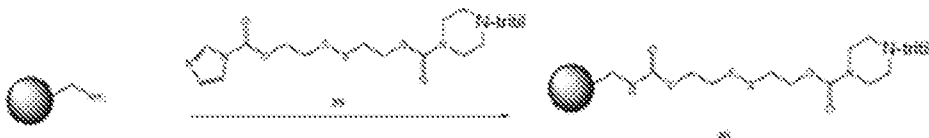
10

15

A la solución del compuesto 37 se le agregó imida del ácido N-hidroxi-5-norbornen-2,3-dicarxílico (HONB) (1,02 eq), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,34 eq), y luego 1-(3-dimetilaminopropil)-clorhidrato de N'-etilcarbodiimida (EDC) (1,1 eq). La mezcla se calentó a 55°C. Una vez completada la reacción (4-5 h), la mezcla se enfrió a 20°C y se lavó sucesivamente con ácido cítrico/salmuera 0,2 M 1:1 y salmuera. La solución de diclorometano se intercambió de solvente por acetona y después por N,N-dimetilformamida, y el producto se aisló por precipitación en acetona/N,N-dimetilformamida en cloruro sódico acuoso saturado. El producto crudo se resuspendió varias veces en agua para eliminar la N,N-dimetilformamida residual y las sales. Rendimiento = 70 % de cola 38 de EG3 activada del compuesto 36.

20

Ejemplo 4: Síntesis de Anclajes Disulfuro



25

30

35

A una resina de aminometilpoliestireno (malla 100-200: -1,0 mmol/g de sustitución de N₂; 75 g, 1 eq, Polymer Labs, Reino Unido, N.º de pieza 1464-X799) en un recipiente peptídico con camisa silanizada se le agregó 1-metil-2-pirrolidinona (NMP; 20 ml/g de resina) y se dejó que la resina se hinchara mezclando durante 1-2 h. Después de la evacuación del solvente hinchable, la resina se lavó con diclorometano (2 x 1-2 min), diisopropiletilamina al 5 % en isopropanol/diclorometano al 25 % (2 x 3-4 min) y diclorometano (2 x 1-2 min). Después de la evacuación del lavado final, la resina se fluidizó con una solución de anclaje disulfuro 34 en 1-metil-2-pirrolidinona (0,17 M; 15 ml/g de resina, -2,5 eq) y la mezcla de resina/reactivo se calentó a 45°C durante 60 h. Una vez completada la reacción, se interrumpió el calentamiento, se evacuó la solución de anclaje y se lavó la resina con 1-metil-2-pirrolidinona (4 x 3-4 min) y diclorometano (6 x 1-2 min). La resina se trató con una solución de dicarbonato de dietilo al 10 % (v/v) en diclorometano (16 ml/g; 2 x 5-6 min) y luego se lavó con diclorometano (6 x 1-2 min). La resina 40 se secó bajo una corriente de N₂ durante 1-3 horas y luego al vacío hasta peso constante ($\pm$ 2%). Rendimiento: 110-150% del peso de resina original.

Ejemplo 5: Síntesis en Fase Sólida de 250 mg de

Sustancia Farmacológica Cruda Eteplirsén

40

1. Materiales

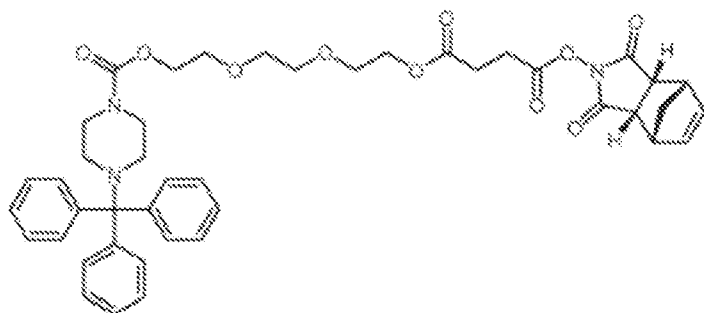
Tabla 2: Materiales de partida

Nombre del material	Nombre químico	Número CAS	Fórmula química	Peso molecular
Activó una subunidad	Ácido fosoramidoclorhídrico, <i>N,N</i> -dimetil-, [6-[6-(benzoilamino)-9H-purin-9-il]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metilo	1155373-30-0	C ₃₈ H ₃₇ ClN ₇ O ₄ P	722,2
Subunidad C activada	Fosoramidoclorhídrico, <i>N,N</i> -dimetil-, [6-[4-(benzoilamino)-2-oxo-1(2H)-pirimidinil]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metilo	1155373-31-1	C ₃₇ H ₃₇ ClN ₅ O ₅ P	698,2

Nombre del material	Nombre químico	Número CAS	Fórmula química	Peso molecular
Subunidad DPG activada	Ácido propanoico, 2,2-dimetil-4-[[[9-[6-[[[cloro(dimetilamino)fosfinil]oxi]metil]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]-2-[(éster de 2-fenilacetil)amino]-9H-purin-6-il]oxi]metil]fenilo	1155309-89-9	C ₅₁ H ₅₃ ClN ₇ O ₇ P	942,2
Subunidad T activada	Ácido fosforamidoclorhídrico, éster de N,N-dimetil-[6-(3,4-dihidro-5-metil-2,4-dioxo-1(2H)-pirimidinil)]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metilo	1155373-34-4	C ₃₁ H ₃₄ ClN ₄ O ₅ P	609,1
Cola EG3 activada	Ácido butanodioico, éster de 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]etilo]	1380600-06-5	C ₄₃ H ₄₇ N ₃ O ₁₀	765,9

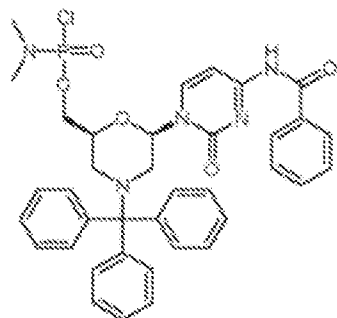
Estructuras Químicas de los Materiales de Partida:

5 A. Cola EG3 activada



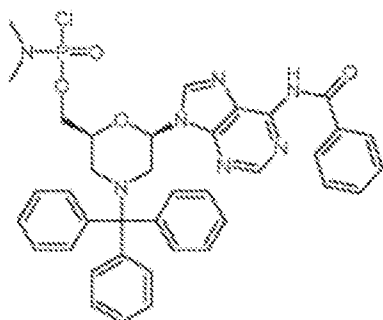
Compuesto (B)

B. Subunidad C activada (para su preparación, ver la patente de los Estados Unidos N° 8.067.571)



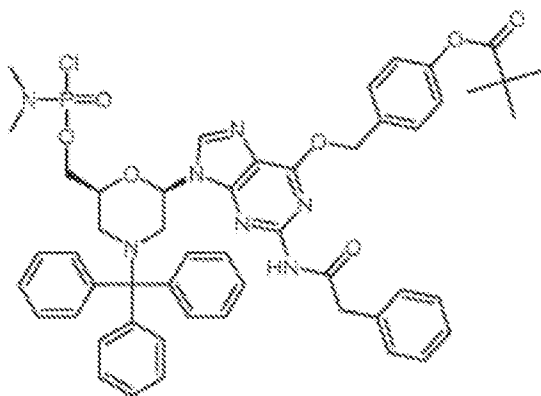
Compuesto (C1)

C. Subunidad A activada (para la preparación, ver la patente de los Estados Unidos N° 8.067.571)



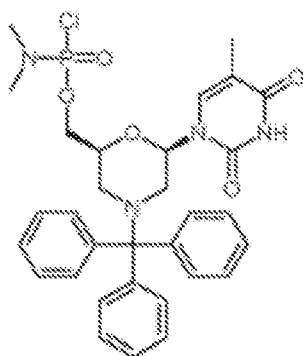
Compuesto (D1)

D. Subunidad DPG activada (para preparación, ver WO 2009/064471)

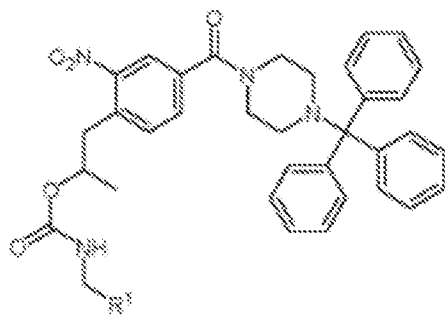


Compuesto (E1)

E. Subunidad T activada (para su preparación, WO 2013/082551)

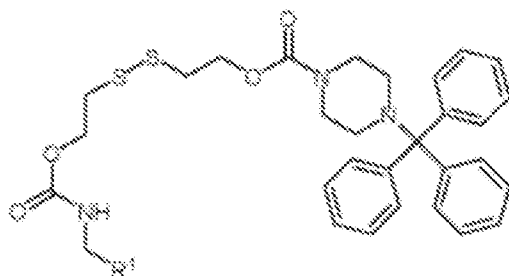


Compuesto (F1)

F. Resina Cargada con Anclaje: NCP2

Fórmula (GI)

donde R¹ es un medio de soporte.

5 G. Resina Cargada con Anclaje Disulfuro

Fórmula (II)

donde R¹ es un medio de soporte.

Tabla 3: Descripción de soluciones para la síntesis de oligómeros en fase sólida del fármaco crudo Eteplirsén

Nombre de la solución	Composición de la solución
Solución de anclaje NCP2	Anclaje NCP2 de 12,5 ml y 430ing
Solución de limitación DEDC	1,4 ml dietilo Dicarbonato (DEDC), 1,2 ml de NEM y 11,2 ml de DCM
Solución CYTFA	667 mg de 4-cianopiridina, 52,6 ml de DCM, 1,2 ml de TFA, 13 ml de TFE y 0,7 ml de agua purificada
Solución de neutralización	11,7 ml de IPA, 2,4 ml de DIPEA y 35,4 ml de DCM
Solución de escisión	509 mg de DTT, 2,3 ml de NMP y 1,0 ml de DBU

2. Síntesis de los Residuos 1-10 de la Sustancia Farmacéutica Cruda Eteplirsén**A. Hinchazón de la resina**

Se cargaron 250 mg de resina cargada con anclaje y NMP en un reactor silanizado y se agitaron durante 3 horas. Se drenó el NMP y la resina cargada con anclaje se lavó dos veces con DCM y cinco veces con TFE/DCM al 30 %.

B. Ciclo 0: Acoplamiento de la Cola EG3

La resina cargada con anclaje se lavó tres veces con TFE/DCM al 30% y se drenó, se lavó con solución de CYTFA durante 15 minutos y se drenó, y se lavó nuevamente con solución de CYTFA durante 15 minutos sin drenar, a lo cual se cargó NEM/DCM 1:1 y la suspensión se agitó durante 2 minutos y se escurrió. La resina se lavó dos veces con solución de neutralización durante 5 minutos y se drenó, luego dos veces con cada uno de DCM y se drenó. Se cargó a la resina una solución de EG3 Tail activado y NEM en DMI y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente y se drenó. La resina se lavó dos veces con solución de neutralización durante 5 minutos por cada lavado y una vez con DCM y se drenó. Se cargó una solución de anhídrido benzoico y NEM en NMP, se agitó durante 15 minutos y se drenó. La resina se agitó con

solución de neutralización durante 5 minutos, después se lavó una vez con DCM y dos veces con TFE/DCM al 30 %. La resina se suspendió en TFE/DCM al 30% y se mantuvo durante 14 horas.

C. Ciclos de Acoplamiento de Subunidades 1-10

i. Tratamientos Previos al Acoplamiento

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

ii. Tratamientos Pos-Acoplamiento

Después de drenar cada solución de subunidad como se describe en la Tabla 4, la resina: 1) se lavó con DCM; y 2) se lavó dos veces con TFE/DCM al 30%. Si la resina se mantuvo durante un período de tiempo antes del siguiente ciclo de acoplamiento, el segundo lavado de TFE/DCM no se drenó y la resina se retuvo en dicha solución de lavado de TFE/DCM. Ver Tabla 4.

III. Ciclos de Acoplamiento de Subunidades Activadas

Los ciclos de acoplamiento se lleva a cabo como se describe en la Tabla 4.

IV. Lavado Final con IPA

Después de llevar a cabo el paso de acoplamiento final como se describe en la Tabla 4, la resina se lavó 8 veces con IPA y se secó al vacío a temperatura ambiente durante aproximadamente 63,5 horas hasta un peso seco de 1,86 g.

D. Escisión

La Sustancia Farmacéutica Cruda Eteplisen unida a resina anterior se dividió en dos lotes, cada lote se trató de la siguiente manera. Un lote de 929 mg de resina: 1) se agitó con NMP durante 2 horas y después se drenó la NMP; 2) tiempos de lavado del árbol con TFE/DCM al 30%; 3) se trató con solución CYTFA durante 15 minutos; y 4) la Solución de CYTFA durante 15 minutos a la que luego se le agregó una solución 1:1 de NEM/DCM y se agitó durante 2 minutos y se drenó. La resina se trató tres veces con solución de neutralización, se lavó seis veces con DCM y ocho veces con NMP. La resina se trató con una solución de escisión de 510 mg de DTT y 992 mg de DBU en 2,3 ml de NMP durante 2 horas para separar el fármaco crudo Eteplisen de la resina. La solución de escisión se drenó y se retuvo en un recipiente separado. El reactor y la resina se lavaron con 1,6 ml de NMP que se combinó con la solución de escisión.

Tabla 4:

Ciclo No.: Subunidad (SU)	Tratamiento Pre-acoplamiento				Ciclo de acoplamiento		Tratamiento Pos-Acoplamiento	
	1	2	3	4	Cantidad de SU NEM DMI LiBr	Tiempo de acoplamiento RT (horas)	1	2
	Lavado con TFE/DCM al 30%	CYTFA Sln.	Solución de neutralización	Lavado con DCM			Lavado con DCM	Lavado con TFE/DCM al 30%
1:C	1,8 ml	a) 1,8 ml b) 1,8 ml, 0,041 ml	3x1,8ml	1,8 ml	179 mg; 0,065 ml de NEM; 1,0 ml de DMI; 111 mg de LiBr	5	1,8 ml	2x1,8ml
2:T	2,3 ml	a) 2,3 ml b) 2,3 ml, 0,053 ml	3x2,3ml	2x2,3ml	156 mg y 0,065 ml de NEM 1,0 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	2,3 ml	2x2,3ml
3:C	2,7 ml.	a) 2,7 ml b) 2,7 ml, 0,061 ml	3 x 2,7 ml,	2x2,7ml	179 mg; 0,065 ml de NEM; 1,0 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	2,7 m de largo	2x2,7 ml:

Ciclo No.: Subunidad (SU)	Tratamiento Pre-acoplamiento				Ciclo de acoplamiento		Tratamiento Pos-Acoplamiento	
	1	2	3	4			1	2
	Lavado con TFE/DCM al 30%	CYTFA Sln.	Solución de neutralización	Lavado con DCM	Cantidad de SU NEM DMI LiBr	Tiempo de acoplamiento RT (horas)	Lavado con DCM	Lavado con TFE/DCM al 30%
4:C	3.0mL	a) 3,0 ml segundo) 3,0 ml, 0,069 ml	3x3.0mL	2x3,0ml	179 mg; 0,065 ml de NEM; 1,0 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	3,0 m de largo	2x3.0mL
5:A	3.2mL	a) 3,2 ml b) 3,2 ml, 0,073 ml	3x3.2mL	2x9,5L	185 mg; 0,064 ml de NEM; 1,1 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	3,2 m de largo	2x3,2 ml
6:A	3.3mL	a) 3,3 ml b) 3,3 ml, 0,078 ml	3x3.3mL	2x3,3 ml	185 mg; 0,064 ml de NEM; 1,1 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	3,3 ml	2 x 3,3 ml
Lavado con TFE/DCM al 30%	CYTFA Sln.	Solución de neutralización	Lavado con DCM	Cantidad SU (g) NEM (L) DMI (L)	Tiempo de acoplamiento RT (horas)	Lavado con DCM	Lavado con TFE/DCM al 30%	
7:C	3.6mL	a) 3,6 ml b) 3,6 ml, 0,085 ml	3x3.6mL	2x3,6m de largo	179 mg; 0,065 ml de NEM; 1,0 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	3,6 m de largo	2x3.6mL
8:A	3.6mL	a) 3,6 ml b) 3,6 ml, 0,085 m 1	3x3.6mL	2x3,6m de largo	185 mg; 0,064 ml de NEM; 1,1 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	3,6 m de largo	2x3.6mL
9:T	3.8mL	a) 3,8 ml b) 3,8 ml 0,089 m 1	3x3.8mL	2x 3,8 ml	156 mg y 0,065 ml de NEM 1,0 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	3,8 m de largo	2x3.8mL
10:C	4.0mL	a) 4,0 ml b) 4,0 ml, 280 ml	3x4.0mL	2x4,0m de largo	179 mg; 0,065 ml de NEM; 1,0 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	4,0 m de largo	2x4.0mL

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

E. Desprotección

5

La solución de escisión combinada y el lavado de NMP se transfirieron a un recipiente a presión al que se agregaron 13,3 ml de NH₄OH (NH₃·H₂O) que se había enfriado a una temperatura de -10° a -25°C en un congelador. El recipiente a presión se selló y se calentó a 45°C durante 16 horas y después se dejó enfriar a 25°C. Esta solución de desprotección que contenía el fármaco crudo Eteplirsén se diluyó 3:1 con agua purificada y se ajustó el pH a 3,0 con ácido fosfórico 2 M, luego a pH 8,03 con NH₄OH.

10

3. Síntesis de la Sustancia Farmacéutica Cruda Eteplirsén

El Eteplirsén se puede sintetizar usando los pasos A-E como se describe en el Ejemplo 5, parte 2, y usando la información proporcionada en la Tabla 5 a continuación.

5 **Tabla 5:**

Ciclo No.: Subunidad (SU)	Tratamiento Pre-acoplamiento				Ciclo de acoplamiento		Tratamiento Pos-Acoplamiento	
	1	2	3	4			1	2
	Lavado con TFE/DCM al 30%	CYTFA Sln. ²	Solución de neutralización	Lavado con DCM	Cantidad de SU NEM DMI LiBr	Tiempo de acoplamiento RT (horas)	Lavado con DCM	Lavado con TFE/DCM al 30%
1:C	1,8 ml	a) 1,8 ml b) 1,8 ml, 0,041 ml	3x1,8ml	1,8 ml	179 mg; 0,065 ml de NEM; 1,0 ml de DMI; 111 mg de LiBr	5	1,8 ml	2x1,8ml
2:T	2,3 ml	a) 2,3 ml b) 2,3 ml, 0,053 ml	3x2,3ml	2x2,3ml	156 mg y 0,065 ml de NEM 1,0 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	2,3 ml	2x2,3ml
3:C	2,7mL	a) 2,7 ml b) 2,7 ml, 0,061 ml	3x2,7 ml,	2x2,7ml	179 mg; 0,065 ml de NEM; 1,0 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	2,7 m de largo	2x2,7mL
4:C	3,0mL	a) 3,0 ml b) 3,0 ml, 0,069 m1	3x3,0mL	2x3,0ml	179 mg; 0,065 ml de NEM; 1,0 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	3,0 m de largo	2x3,0mL
5:A	3,2mL	a) 3,2 ml b) 3,2 ml, 0,073 ml	3x3,2mL	2x9,5L	185 mg; 0,064 ml de NEM; 1,1 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	3,2 m de largo	2x3,2mL
6:A	3,3mL	a) 3,3 ml b) 3,3 ml, 0,078 ml	3x3,3mL	2x3,3ml	185 mg; 0,064 ml de NEM; 1,1 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	3,3 ml	2x3,3mL
Ciclo No.: Subunidad (SU)	Tratamiento Pre-acoplamiento				Ciclo de acoplamiento		Tratamiento Pos-Acoplamiento	
	1	2	3	4			1	2
	Lavado con TFE/DCM al 30%	Solución CYTF A	Solución de neutralización	Lavado con DCM	Cantidad SU (g) NEM (L) DMI (L)	Tiempo de acoplamiento RT (horas)	Lavado con DCM	Lavado con TFE/DCM al 30%
7:C	3,6mL	a) 3,6 ml: b) 3,6 ml, 0,085 m 1	3x3,6mL	2x3,6m de largo	179 mg; 0,065 ml de NEM; 1,0 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	3,6 m de largo	2x3,6mL
8:A	3,6mL	a) 3,6 ml	3x3,6mL			4,25		2x3,6mL

Ciclo No.: Subunidad (SU)	Tratamiento Pre-acoplamiento				Ciclo de acoplamiento		Tratamiento Pos-Acoplamiento	
	1	2	3	4			1	2
	Lavado con TFE/DCM al 30%	CYTFA Sin. ²	Solución de neutralización	Lavado con DCM	Cantidad de SU NEM DMI LiBr	Tiempo de acoplamiento RT (horas)	Lavado con DCM	Lavado con TFE/DCM al 30%
		b) 3,6 ml, 0,085 ml		2x3,6m de largo	185 mg; 0,064 ml de NEM; 1,1 ml de DMI; 111 mg de LiBr		3,6 m de largo	
9:T	3.8mL	a) 3,8 ml b) 3,8 ml, 0,089 m 1	3x3.8mL	2x 3,8 ml	156 mg y 0,065 ml de NEM 1,0 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	3,8 m de largo	2x3.8mL
10:C	4.0mL	a) 4,0 ml b) 4,0 ml, 280 ml	3x4.0mL	2x4,0m de largo	179 mg; 0,065 ml de NEM; 1,0 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	4,0 m de largo	2x4.0mL
11:A	4.5mL	a) 4,5 ml b) 4,5 ml, 0,068 ml	3x4.5mL	2x 4,5 ml	185 mg; 0,064 ml de NEM; 1,1 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	4,5 m de largo	2x4.5mL
12:A	4.5mL	a) 4,5 ml b) 4,5 ml, 0,068 m 1	3x4.5mL	2x 4,5 ml	185 mg; 0,064 ml de NEM; 1,1 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	4,5 m de largo	2x4.5mL

Ciclo No.: Subunidad (SU)	Tratamiento Pre-acoplamiento				Ciclo de acoplamiento		Tratamiento Pos-Acoplamiento	
	1	2	3	4			1	2
	Lavado con TFE/DCM al 30%	Solución CYTF A	Solución de neutralización	Lavado con DCM	Cantidad SU (g) NEM (L) DMI (L)	Tiempo de acoplamiento RT (horas)	Lavado con DCM	Lavado con TFE/DCM al 30%
13:DP G	4.6mL	a) 4,6 ml b) 4,6 ml, 0,072 m 1	3x4,6ml.	2x4,6m de largo	313 mg; 0,084 ml de NEM; 1,3 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	4,6 m de largo	2x4.6mL
14:DP G	4.8mL	a) 4,8 ml b)	3x4.8mL	2x 4,8 ml	313 mg; 0,084 ml de NEM;	4,25	4,8 m de largo	2x4.8mL
Lavado con TFE/DCM al 30%	Solución CYTF A	Solución de neutralización	Lavado con DCM	Cantidad SU (g) NEM (L) DMI (L)	Tiempo de acoplamiento RT (horas)	Lavado con DCM	Lavado con TFE/DCM al 30%	

Ciclo No.: Subunidad (SU)	Tratamiento Pre-acoplamiento				Ciclo de acoplamiento		Tratamiento Pos-Acoplamiento	
	1	2	3	4			1	2
	Lavado con TFE/DCM al 30%	Solución CYTF A	Solución de neutralización	Lavado con DCM	Cantidad SU (g) NEM (L) DMI (L)	Tiempo de acoplamiento RT (horas)	Lavado con DCM	Lavado con TFE/DCM al 30%
		4,8 ml, 0,76 ml			1,3 ml de DMI; 111 mg de LiBr			
15:A	5.2mL	a) 5,2 ml b) 5,2 ml, 0,085 ml	3x5.2mL	2x 5,2 ml	185 mg; 0,064 ml de NEM; 1,1 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	5,2 m de largo	2x5.2mL
16: A	5.2mL	a) 5,2 ml b) 5,2 ml, 0,085 m 1	3x5.2mL	2x 5,2 ml	185 mg; 0,064 ml de NEM; 1,1 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	5,2 m de largo	2x5.2mL
17:DP G	5.3mL	a) 5,3 ml b) 5,3 ml, 0,121 ml	3x5.3mL	2x5,3m de largo	313 mg; 0,084 ml de NEM; 1,3 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,75	5,3 m de largo	2x5.3mL
18:A	5.5mL	a) 5,5 ml b) 5,5 ml, 0,126 m 1	3x5.5mL	2x 5,5 ml	185 mg; 0,064 ml de NEM; 1,1 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	5,5 m de largo	2x5.5mL

Ciclo No.: Subunidad (SU)	Tratamiento Pre-acoplamiento				Ciclo de acoplamiento		Tratamiento Pos-Acoplamiento	
	1	2	3	4			1	2
	Lavado con TFE/DCM al 30%	Solución CYTF A	Solución de neutralización	Lavado con DCM	Cantidad SU (g) NEM (L) DMI (L)	Tiempo de acoplamiento RT (horas)	Lavado con DCM	30% TFE/D CM Lavado
19:T	5.5mL	a)	5.5mL	2x	156 mg	4,25	5.5mL	2x5,5m
Lavado con TFE/DCM al 30%	Solución CYTF A	Solución de neutralización	Lavado con DCM	Cantidad SU (g) NEM (L) DMI (L)	Tiempo de acoplamiento RT (horas)	Lavado con DCM	30% TFE/D CM Lavado	
		5.5mL b) 5,5 ml, 0,126 m 1		5.5mL	y 0,065 ml de NEM, 1,0 ml de DM1; 111 mg de LiBr			L
20:DPG	5.7mL	a) 5,7 ml b) 5,7 ml, 0,130 ml	3x5,7 ml	2x5.7mL	313 mg; 0,084 ml de NEM; 1,3 ml de DM1; 111 mg de LiBr	4,75	5.7mL	2x5,7 m de largo
21:DPG	5.7mL	a) 5,7 ml	3x5.7mL			4,25	5.7mL	2x5,7ml

Ciclo No.: Subunidad (SU)	Tratamiento Pre-acoplamiento				Ciclo de acoplamiento		Tratamiento Pos-Acoplamiento	
	1	2	3	4			1	2
	Lavado con TFE/DCM al 30%	Solución CYTF A	Solución de neutralización	Lavado con DCM	Cantidad SU (g) NEM (L) DMI (L)	Tiempo de acoplamiento RT (horas)	Lavado con DCM	30% TFE/DCM Lavado
		b) 5,7 ml, 0,130 ml		2x5,7 m de largo	313 mg; 0,084 m 1 MLN; 1,3 ml de DM1; 111 mg de LiBr			
22:C	5.8mL	a) 5,8 ml b) 5,8 ml, 0,134 m 1	3x5,8 ml	2x 5,8 ml	179 mg; 0,065 ml de NEM; 1,0 ml de DM1; 111 mg de LiBr	4,75	5.8mL	2x5,8ml
23:A	5.8mL	a) 5,8 ml b) 5,8 ml, 0,134 m 1	3x5,8 ml	2x 5,8 ml	185 mg; 0,064 m 1 NEM; 1,1 ml de DM1; 111 mg de LiBr	4,25	5.8mL	2x5,8ml
24:T	6.0mL	a) 6,0 ml b) 6,0 ml, 0,138 m 1	3x6,0 ml	2x6,0m de largo	156 mg y 0,065 ml NEM 1,0 ml	4,25	6.0mL	2x6,0ml

1	2	3	4			1'	2
Lavado con TFE/DCM al 30%	Solución CYTF A	Solución de neutralización	Lavado con DCM	Cantidad SC (g) NEM (L) DMI (L)	Tiempo de acoplamiento RT (horas)	Lavado con DCM	30% TFE/DCM Lavado
					DM1; 111 mg de LiBr		

Ciclo No.: Subunidad (SU)	Tratamiento Pre-acoplamiento				Ciclo de acoplamiento Tratamiento post-acoplamiento			
	1	2	3	4			1	2
	Lavado con TFE/DCM al 30%	Solución CYTF A	Solución de neutralización	Lavado con DCM	Cantidad SU (g) NEM (L) DMI (L)	Tiempo de acoplamiento RT (horas)	Lavado con DCM	Lavado con TFE/DCM al 30%
25:T	6.0mL	a) 6,0 ml b) 6,0 ml, 0,138 m 1	3x6.0mL	2x6,0m de largo	156 mg y 0,065 ml de NEM 1,0 ml de DM1; 111 mg de LiBr	4,25	6,0 m de largo	2x6.0mL
26:T	6.2mL	a) 6,2 ml b) 6,2 ml, 0,141 m 1	3x6.2mL	2x 6,2 ml	156 mg y 0,065 ml de NEM 1,0 ml de DM1; 111 mg de LiBr	4,25	6,2 m de largo	2x6.2mL
27:C	6.2mL	a) 6,2 ml	6.2mL	2x 6,2 ml		4,25		2x6.2mL

1	2	3	4			1'	2	
Lavado con TFE/DCM al 30%	Solución CYTF A	Solución de neutralización	Lavado con DCM	Cantidad SC (g) NEM (L) DMI (L)	Tiempo de acoplamiento RT (horas)	Lavado con DCM	30% TFE/DCM Lavado	
		b) 6,2 ml, 0,141 m 1			179 mg; 0,065 ml de NEM; 1,0 ml de DMI; 111 mg de LiBr		6,2 m de largo	
28:T	6.3mL	a) 6,3 ml b)	3x6.3mL	2x6,3m de largo	156 mg y 0,065	4,25	6,3 m de largo	2x6,3ml

Ciclo No.: Subunidad (SU)	Tratamiento Pre-acoplamiento				Ciclo de acoplamiento		Tratamiento Pos-Acoplamiento	
	1	2	3	4			1	2
	Lavado con TFE/DCM al 30%	Solución CYTF A	Solución de neutralización	Lavado con DCM	Cantidad SU (g) NEM (L) DMI (L)	Tiempo de acoplamiento RT (horas)	Lavado con DCM	Lavado con TFE/DCM al 30%
		6,3 ml, 0,146 m 1			ml de NEM 1,0 ml de DMI; 111 mg de LiBr			
29:A	6.3mL	a) 6,3 ml b) 6,3 ml, 0,146 m 1	3x6.3mL	2x6,3m de largo	185 mg; 0,064 ml de NEM; 1,1 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,25	6,3 m de largo	2x6.3mL
30:DP G	6.5mL	a) 6,5 ml b) 6,5 ml, 0,15 ml	3x6.5mL	2x 6,5 ml	313 mg; 0,084 ml de NEM; 1,3 ml de DMI; 111 mg de LiBr	4,75	6,5 m de largo	2x6.5mL

² ml indica la cantidad de 1:1 NEM/DCM

Ejemplo 6: Diseño del Sintetizador de Flujo

5

10

15

El sintetizador de flujo PMO se muestra en (Fig.4). Los depósitos de reactivo fueron botellas de medio con rosca GL45 equipadas con una tapa para mantener una presión positiva de nitrógeno seco y permitir la transferencia anhidra de solventes. Cada depósito de reactivo se conectó a uno de los cuatro puertos seleccionables en una válvula selectora manual Swagelok SS-43ZFS2 de cuatro posiciones. El puerto común se conectó a la bomba de HPLC a través de una conexión rápida de cierre Swagelok (SS-QM2-B-200KR y SS-QM2-S-200) que se podía desconectar cuando no estaba en uso para evitar el sifón de los solventes presurizados. La bomba de HPLC fue una Varian 210 con un cabezal de bomba de acero inoxidable de 25 ml/min. La tubería de baja presión (lado de entrada) fue de PFA de 3,18 mm (1/8") de diámetro exterior y 1,59 mm (1/16") de diámetro interior. La salida de la bomba de HPLC se conectó a un regulador de contrapresión de 40 psi (P-785) y a una conexión rápida de bloqueo de leur macho (Idex P-655) utilizando un tubo de PFA de 1,59 mm (1/16") de diámetro exterior y 0,76 mm (0,030") de diámetro interior. Cuando la bomba HPLC estaba en uso, esta conexión rápida se acopló a la conexión rápida hembra Leur Lock en la línea de entrada del reactor. Cuando la bomba de HPLC no estaba en uso, la línea de entrada del reactor se conectó a una jeringa de reactivo de acoplamiento en la bomba de jeringa (Harvard Apparatus PhD 3000).

20

La línea de entrada del reactor constaba de una conexión rápida leur lock hembra (Idex P-658) y una válvula de retención (Idex CV-3316) unidas con aproximadamente 45,72 cm (18 pulgadas) de tubo de PFA de 1,59 mm (1/16") de diámetro exterior a un bucle de pre-calentamiento de acero inoxidable de 5.49 metros (5 pies) (1,59 mm (1/16") OD, 0,76 mm (0,030") ID, Idex U-107) a través de una unión Swagelok (SS-100-6). Este bucle de pre-calentamiento se conectó a un

reactor idéntico al descrito anteriormente para la síntesis de péptidos. La salida del reactor se conectó a un regulador de contrapresión de 250 psi (Idex P-788), que se podía evitar abriendo una válvula de derivación (Idex P-733). La vía del fluido de derivación se reincorporaba a la salida del regulador de contrapresión en una T (P-632), pasaba a través de una válvula de retención (Idex P-788) y seis pulgadas de tubo antes de llegar al ácido metanosulfónico T (Swagelok SS-100-3). En este punto, se infundió opcionalmente 20% de Me_2SO_4 en DCM con un HPLC Knauer smartline. bomba con un cabezal de titanio de 50 ml/min para regenerar el catión tritilo para el control UV de la desprotección. Luego, el fluido mezclado se pasó a través de un detector UV (Agilent G1315D), un regulador de contrapresión de 20 psi (Idex P-791) y se desechó.

Cuando no se describe, el tubo corriente abajo de la bomba de HPLC y la jeringa fue de PFA de 1,59 mm (1/16") de diámetro exterior y 0,76 mm (0,030") de diámetro interior. Todos los accesorios de fondo plano de 6,35 mm (1/4)-28 fueron Idex super sin bridas (XP-131 y XP-141).

Depósitos de reactivo

Los depósitos de reactivo estaban provistos de adaptadores mecanizados para su uso con tapas GL-45 con orificios (Chemglass). Estos adaptadores tenían tres puertos roscados de 6,35 mm (1/4)-28 (Fig.7). Dos puertos tenían orificios pasantes de 3,18 mm (1/8"); el tercero tenía un orificio pasante de 1,59 mm (1/16"). El primer orificio se utilizó para una línea de retirada de reactivo. El segundo se usó como puerto de llenado y el tercero se usó para el suministro de gas nitrógeno (4 psi). La línea de extracción de reactivo fue una línea de 3,18 mm (1/8") insertada en el fondo del depósito de reactivo y sellada en su lugar con un conector super sin bridas (Idex XP-131). El gas nitrógeno se suministraba mediante una línea de 3,18 mm (1/8") asentada contra el orificio pasante de 1,59 mm (1/16") y sellado con un conector super sin brida. El puerto de llenado consistió de un tubo de acero inoxidable de pared delgada de 3,18 mm (1/8") de diámetro exterior y 2,54 mm (0,1") de diámetro interior insertado justo debajo de la parte inferior del adaptador mecanizado y sellado en su lugar con un accesorio super sin bridas. El lado libre estaba equipado con una conexión rápida de cierre (Swagelok SS-QM2-B-200KR) que estaba sellada cuando no estaba en uso pero que podía usarse para llenar el depósito desde un segundo depósito de solvente anhidro ligeramente debajo. presión más alta. Los segundos depósitos fueron de un diseño similar y se usó argón de 10 psi para transferir el solvente seco. Durante el llenado, se permitió que el sistema de nitrógeno se ventilara a través de un regulador de contrapresión de 5 psi y un burbujeador de aceite.

Ejemplo 7: Procedimiento general para síntesis de flujo.

Se utilizó el siguiente procedimiento para la síntesis de flujo. Se cargó resina en el reactor, el reactor se conectó a la bomba de HPLC y se suministró solvente de lavado halogenado a 10 ml/min para eliminar el aire. Se detuvo el flujo y se dejó que la resina se hinchara durante 10 minutos. El protocolo de flujo se inició con un lavado inicial con solvente halogenado a 10 ml/min durante 60 segundos. La detritilación se llevó a cabo con 100 mM de trifluoroacetato de piridina durante 120 segundos al mismo caudal. El paso de detritilación también se puede llevar a cabo usando colidona, lutidina o 4-cianopiridina (Fig. 3A, Fig. 3B, Fig. 3C y Fig. 3D). Después de un lavado con solvente halogenado de 30 segundos, se llevó a cabo la neutralización con DIEA o NEM al 5 % durante 60 segundos. Luego se lavó la resina con el solvente halogenado y DMI durante 60 segundos cada uno a 10 ml/min. Luego se detuvo la bomba de HPLC para el paso de acoplamiento. Se colocó solución de acoplamiento (subunidad 0,2 M, DIEA o NEM 0,4 M y LiBr 0,21 M en DMI seco) en una jeringa de 10 ml y se administró mediante una bomba de jeringa a 3 ml/min durante 1 minuto (0,5 mmol de monómero) o 2 minutos (1 mmol de monómero). Se determinó que los monómeros fueron estables a temperaturas entre 90 °C y 110 °C en presencia de Bromuro de Litio (Fig.1). Cuando se entregó toda la solución, la bomba de HPLC entregó DMI a 3 ml/min durante tres minutos. Este protocolo se repitió para cada residuo hasta que se completó la síntesis. La resina terminada se retiró del reactor, se lavó 5 veces con DCM en una jeringa fritada (Torviq) y se secó al vacío. La escisión se llevó a cabo como anteriormente.

Para los pasos a temperatura elevada, el reactor y el circuito de pre-calentamiento se colocaron en un baño de agua termostatzado.

Para la purificación por HPLC, la resina se escindió en condiciones suaves (etanol/hidróxido de amonio 4:1) y luego se aisló mediante extracción en fase sólida (SPE). Antes de la escisión utilizando dichas condiciones suaves, el PMO unido a resina fue estable en una variedad de condiciones de reacción (Fig.2). Inicialmente, la resina escindida se filtró y se lavó 4 veces con metanol. La solución de escisión y los deseos se recogieron y concentraron hasta sequedad usando un evaporador rotatorio. El residuo se disolvió en 10 ml de agua Milli-Q antes de la SPE. Por separado, se prepararon y acondicionaron columnas SPE utilizando el siguiente procedimiento. Se cargaron columnas Econo-Pac de 20 ml de Bio-Rad con 3-4 ml de resina Amberchrome CG-300M y se sellaron con una fritada. Luego se agregaron a la columna 8 ml de las siguientes soluciones, en orden, y se drenaron antes de agregar la siguiente solución: ACN al 80% en NH_4OH al 1%, NaOH 0.5 M en EtOH al 20%, agua Milli-Q, H_3PO_4 al 50mM in ACN al 80%, agua Milli-Q, NaOH 0.5 M en EtOH al 20%, agua Milli-Q, NH_4OH al 1%. Cuando se completó el acondicionamiento, la columna se almacenó en 8 ml de NH_4OH al 1% a temperatura ambiente hasta su uso. La columna se enjuagó dos veces con 12 ml de agua Milli-Q antes de cargar el PMO en la columna. Luego, la columna se enjuagó una vez con 3 ml de NaCl 1 M, seguido de tres enjuagues con 12 ml de agua Milli-Q y una vez con 3 ml de acetonitrilo al 10 % en agua. Luego se eluyó el PMO con dos enjuagues de 3 ml de acetonitrilo al 50 % en agua. El eluyente del lavado con acetonitrilo al 50 % se recolectó en un tubo de centrífuga cónico

de 50 ml previamente pesado y se liofilizó para producir el PMO crudo como un polvo blanco adecuado para análisis LC/MS y/o purificación HPLC preparativa.

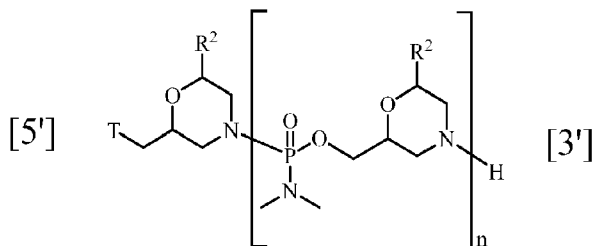
Se purificaron varios PMO en un sistema de purificación dirigida a masas que consta de un HPLC cuaternario Agilent 1260 Infinity acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo único Agilent 6130 (Fig. 5A, Fig. 5B, Fig. 5C, Fig. 5D, Fig. 5E, Fig. 6A, Fig. 6B, Fig. 6C, Fig. 6D y Fig. 6E). Las mezclas de solventes utilizadas para la purificación fueron las siguientes: A = NH₄OAc 5 mM (pH =8), B = acetonitrilo al 90% + NH₄OAc 5 mM al 10% (pH =8). La purificación se llevó a cabo utilizando las siguientes condiciones: Columna: Zorbax 300-SB C3 (5 µm, 21,2 x 100 mm); Caudal: 20 ml/min; Gradiente: 0-2 min B al 2%, 2-60 min B al 2-60%, 60-70 min B al 75%.

Tabla 6. Acrónimos

Acrónimo	Nombre
DBU	1,8-diazabicyclodec-7-eno
MCD	Diclorometano
DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina
DMI	1,3-dimetil-2-imidazolidinona
TDT	Ditiotreitol
API	Alcohol isopropílico
Megavatio	Peso molecular
NEM	N-etilmorfolino
NMP	N-Metil-2-pirrolidona
RT	Temperatura ambiente
TFA	Ácido 2,2,2-trifluoroacético
TFE	2,2,2-Trifluoroetanol

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar un compuesto oligomérico de la Fórmula (I):

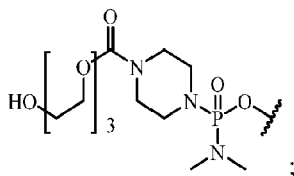


(I);

en donde

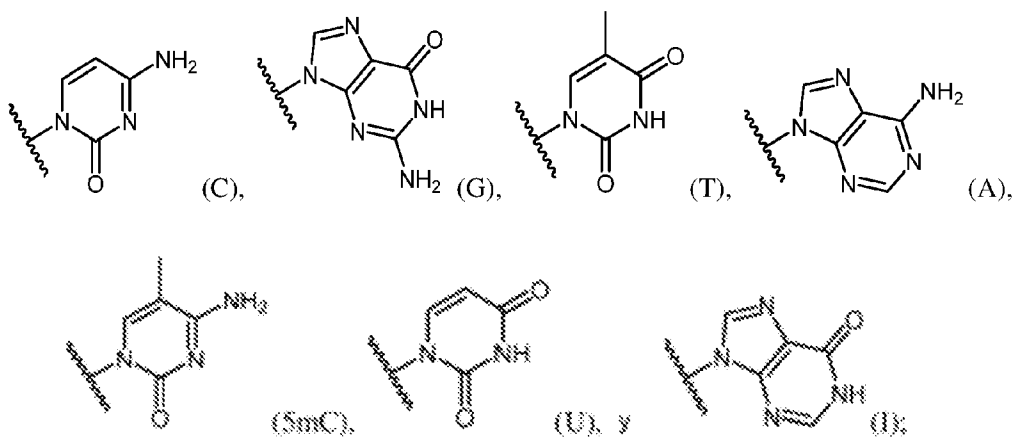
n es un número entero de 9 a 39;

T es OH o



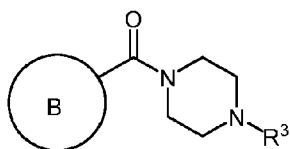
y

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



en donde el proceso comprende los pasos secuenciales de:

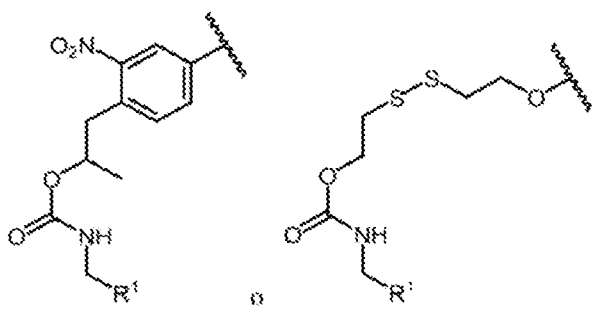
(a) poner en contacto un compuesto de la Fórmula (A1):



(A1);

en donde

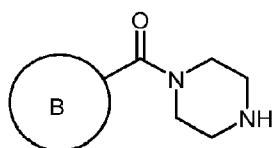
B es



R1 es un medio de soporte; y

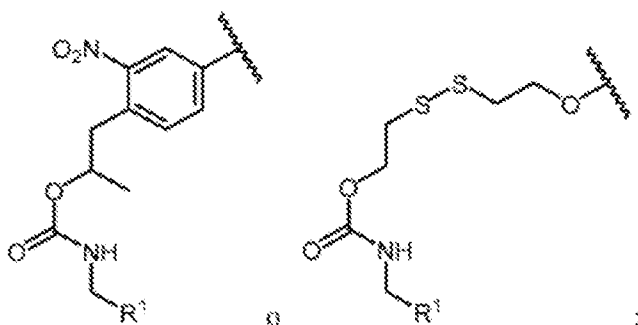
R3 se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo;

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



(II);

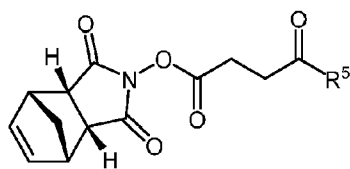
en donde B es



y

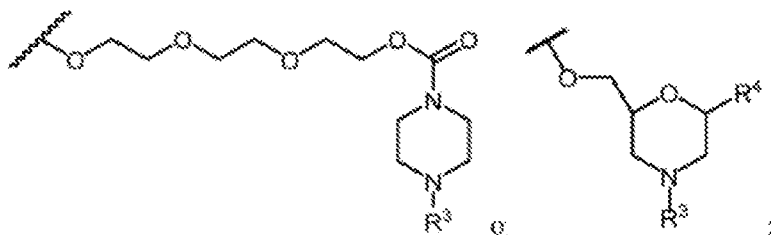
R1 es un medio de soporte;

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



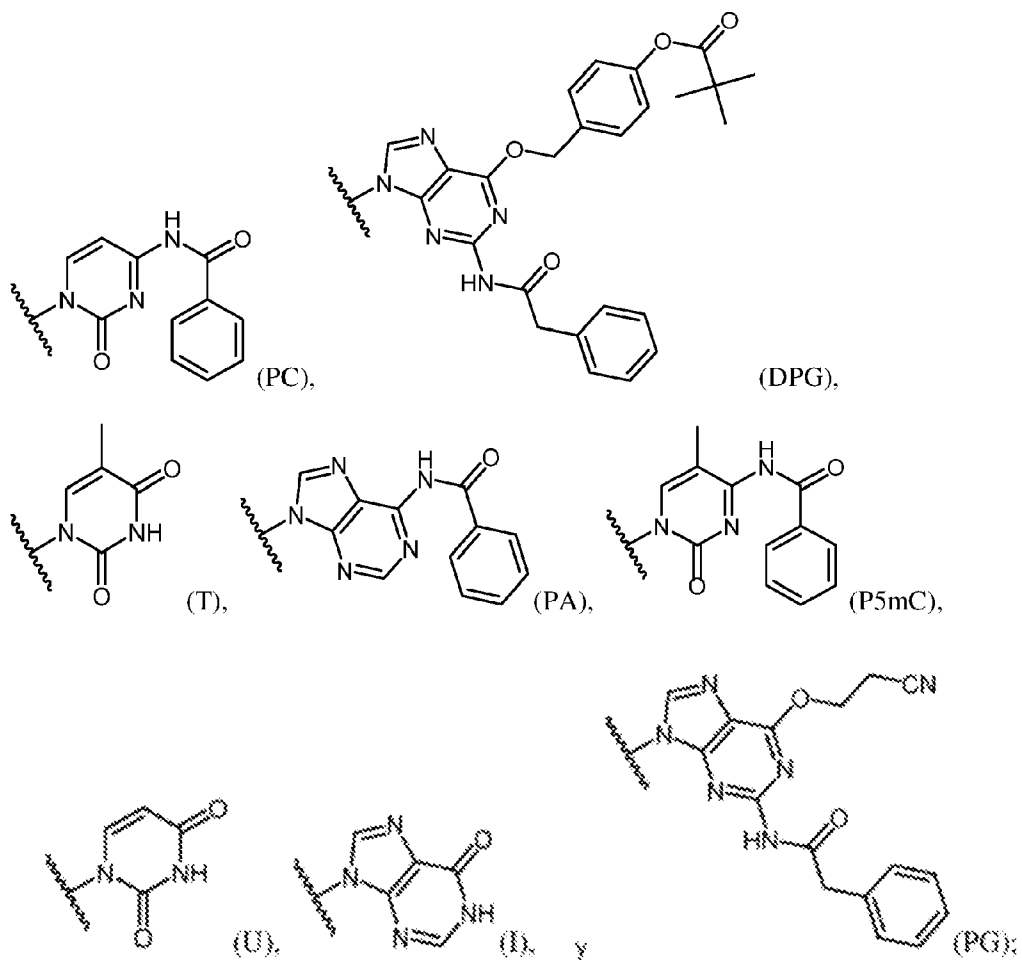
(A2);

donde R5 es

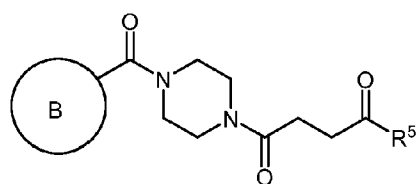


R3 se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y

5 R4 se selecciona del grupo que consiste en:

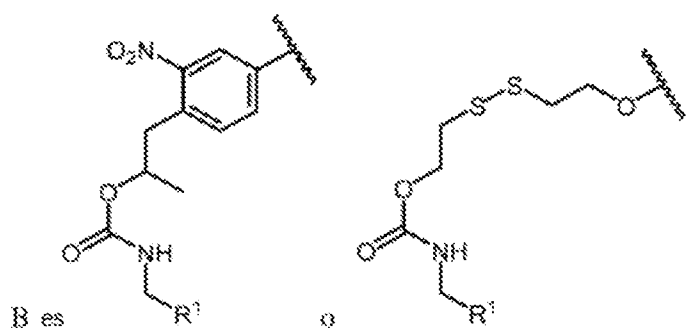


para formar un compuesto de la Fórmula (A3):

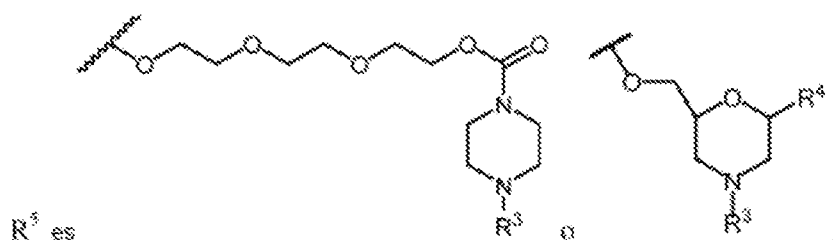


(A3);

en donde



R1 es un medio de soporte;

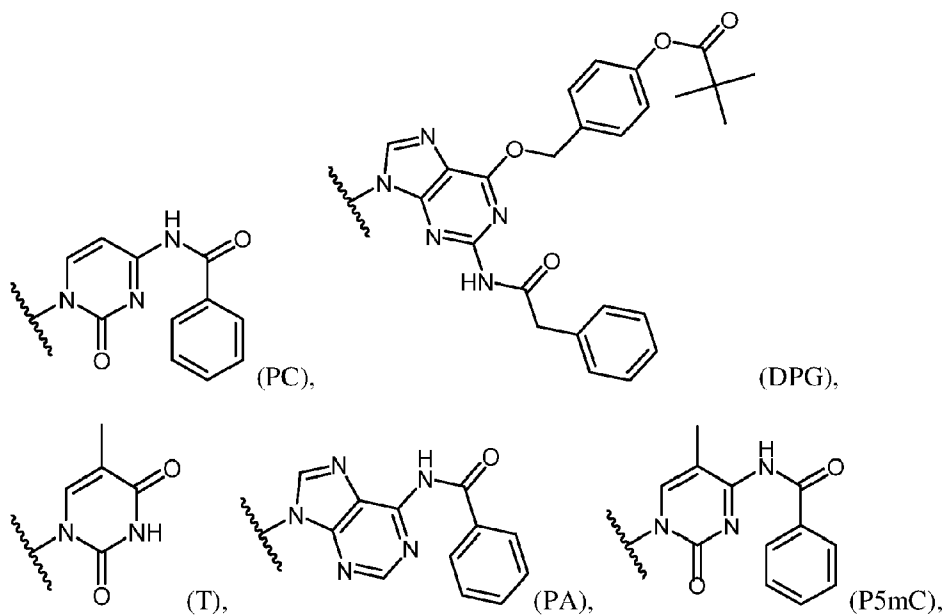


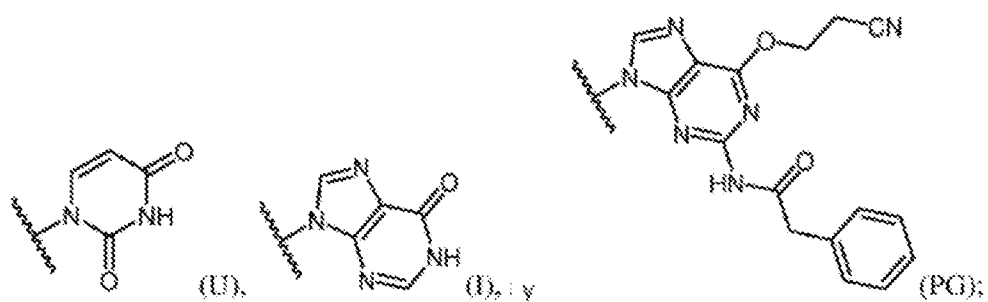
5

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

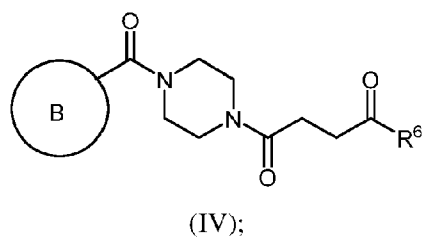
R4 se selecciona del grupo que consiste en:

10

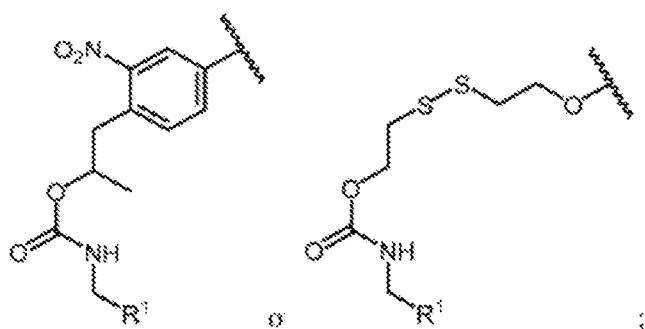




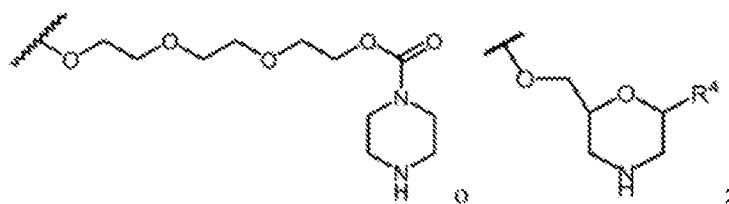
(c) poner en contacto el compuesto de la Fórmula (A3) con un agente de desbloqueo para formar un compuesto de la Fórmula (IV):



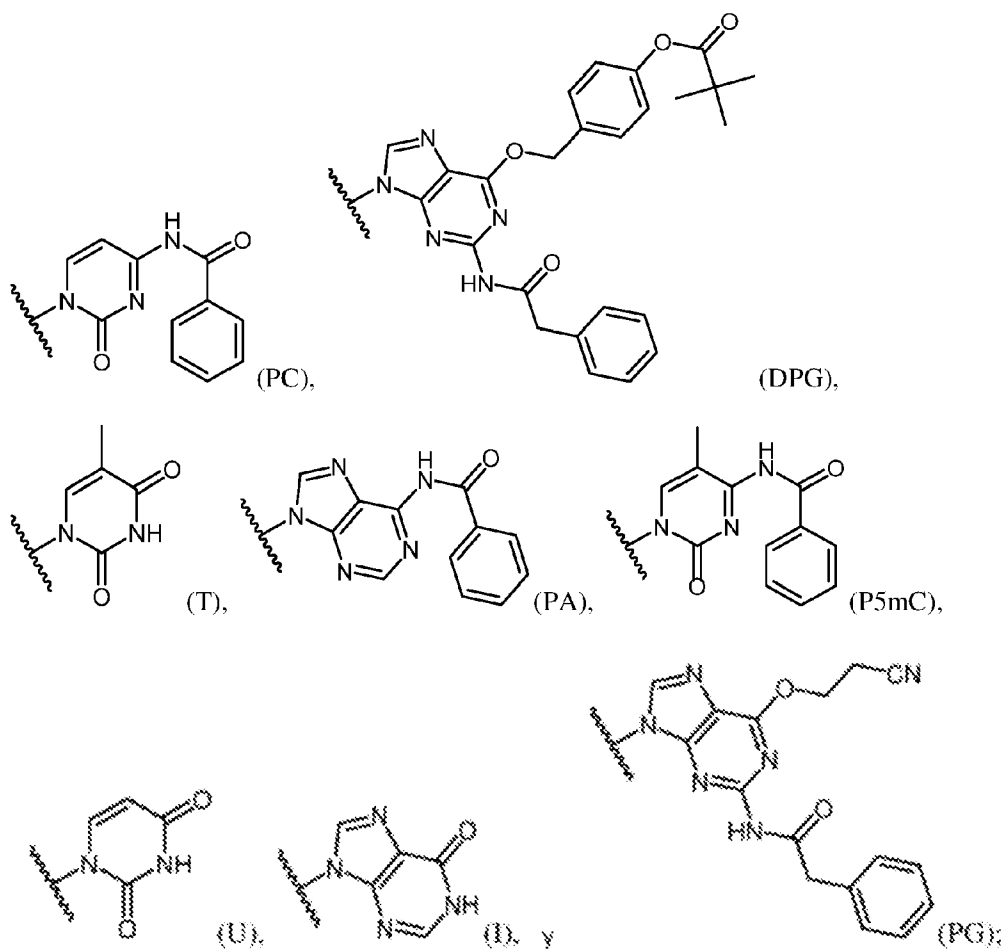
en donde B es



R1 es un medio de soporte;
R6 es

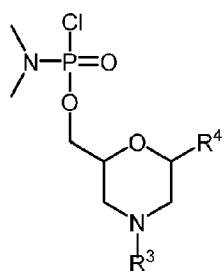


y
R4 se selecciona del grupo que consiste en:



5

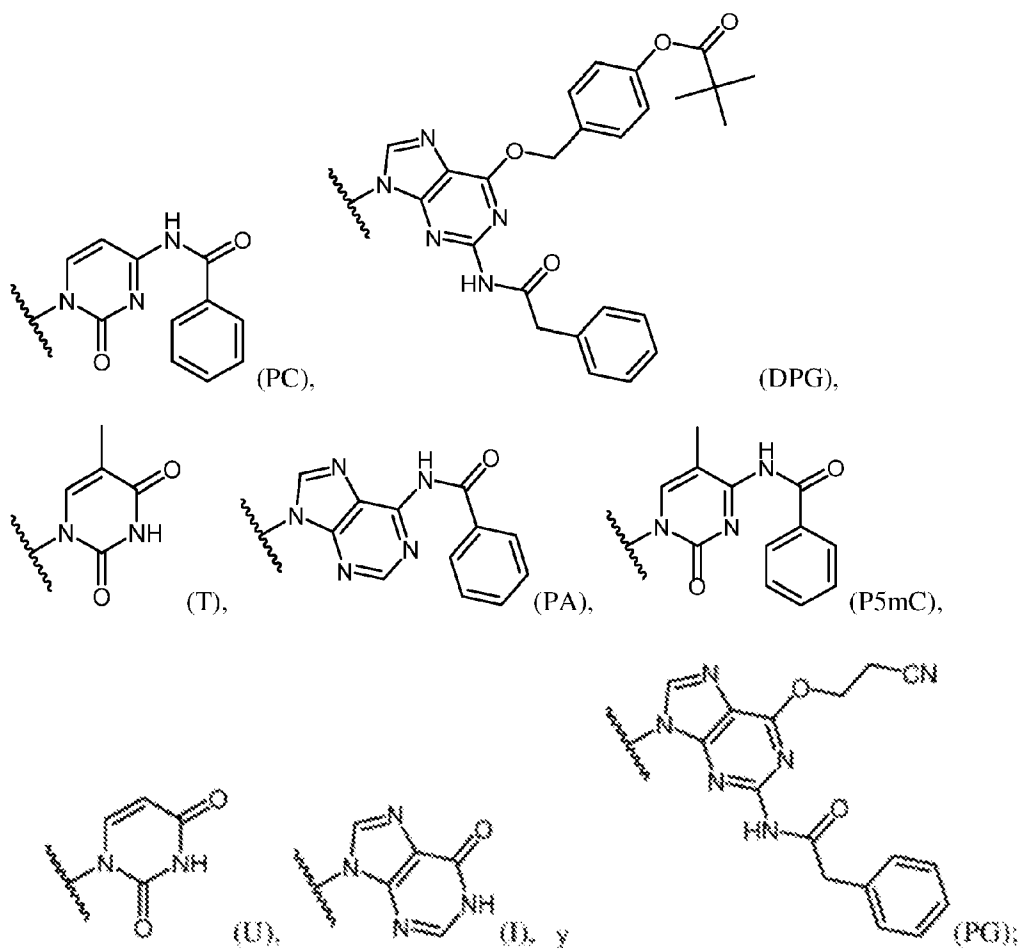
(d) poner en contacto el compuesto de la Fórmula (IV) con un compuesto de la Fórmula (A4):



(A4)

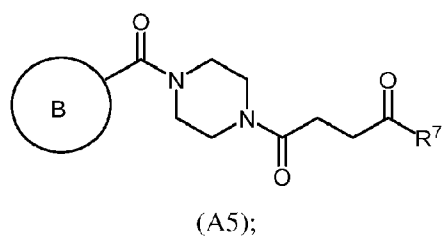
10

en presencia de un catalizador ácido de Lewis;
 en donde
 R³ se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo,
 dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y
 15 R⁴ se selecciona del grupo que consiste en:



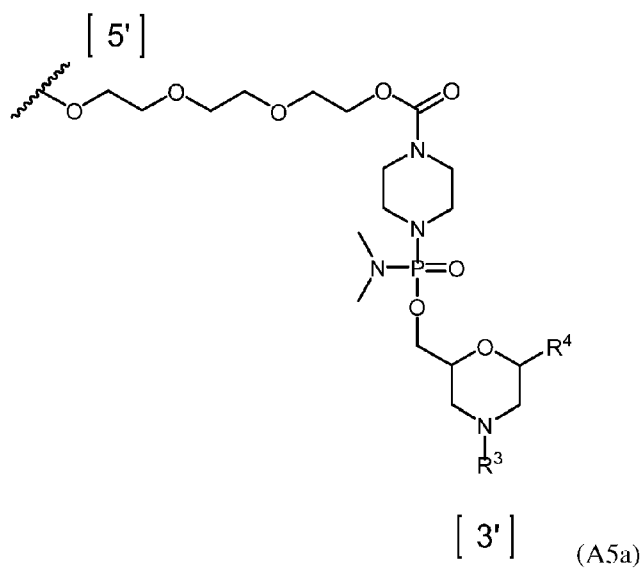
5

para formar un compuesto de la Fórmula (A5):

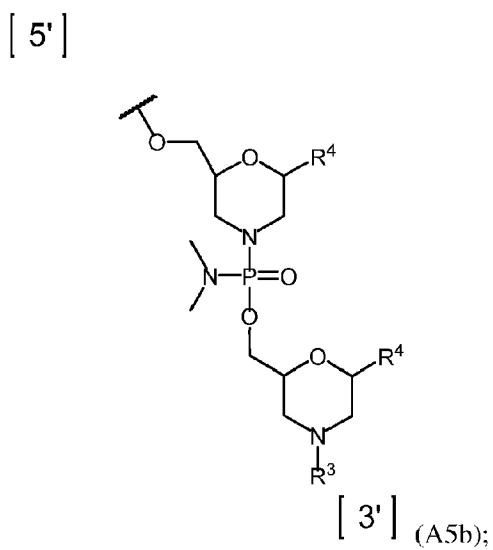


10

en la que R⁷ es de la Fórmula (A5a) o Fórmula (A5b):

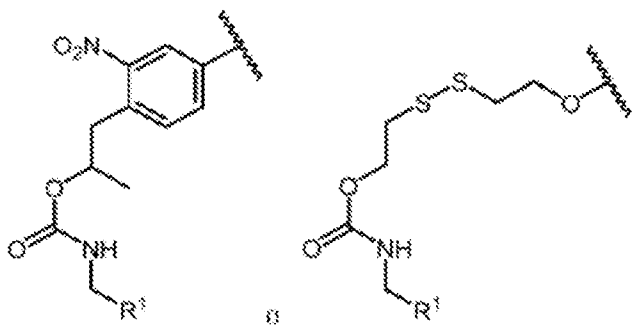


o



5

B es

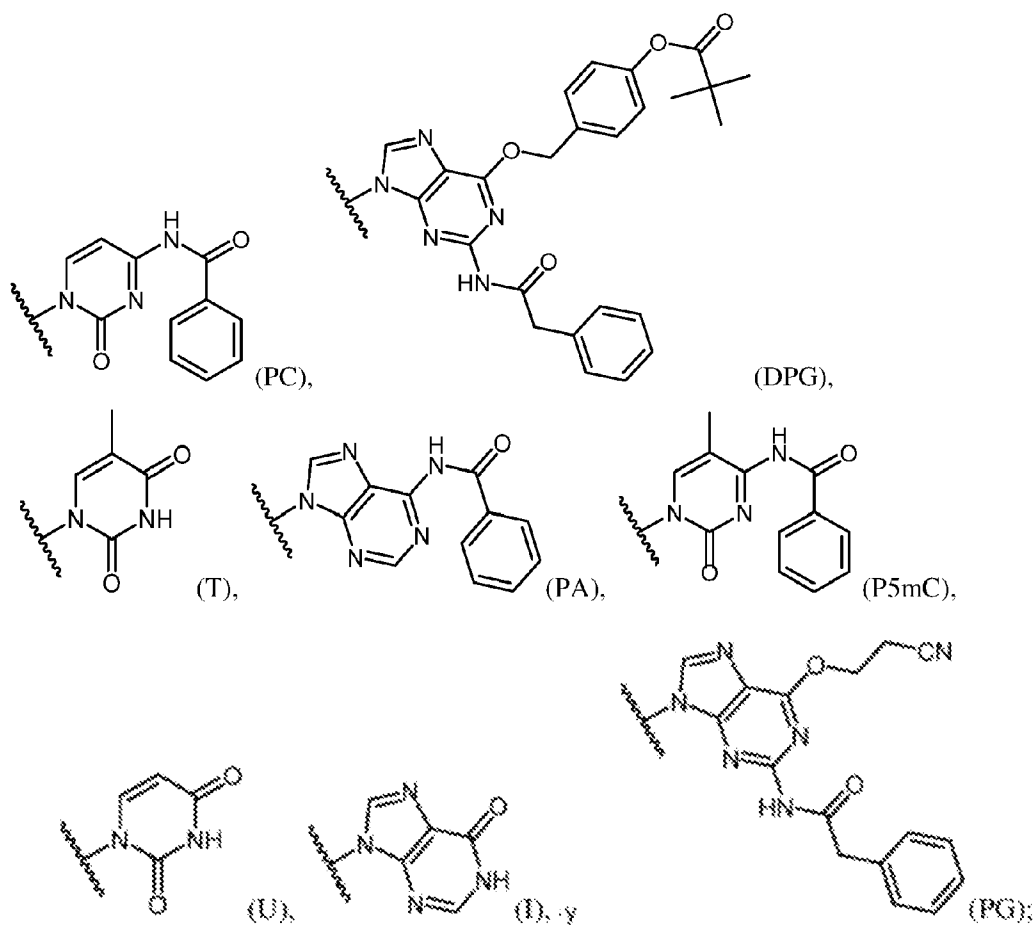


10

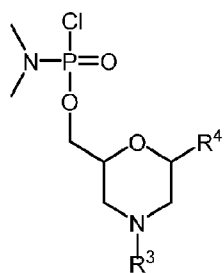
R¹ es un medio de soporte;

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

R⁴ se selecciona entre:



- 5 (e) llevar a cabo iteraciones Y de los pasos secuenciales de:
 (e1) poner en contacto el producto formado en el paso inmediatamente anterior con un agente de desbloqueo; y
 (e2) poner en contacto el compuesto formado en el paso inmediatamente anterior con un compuesto de la Fórmula (A8):

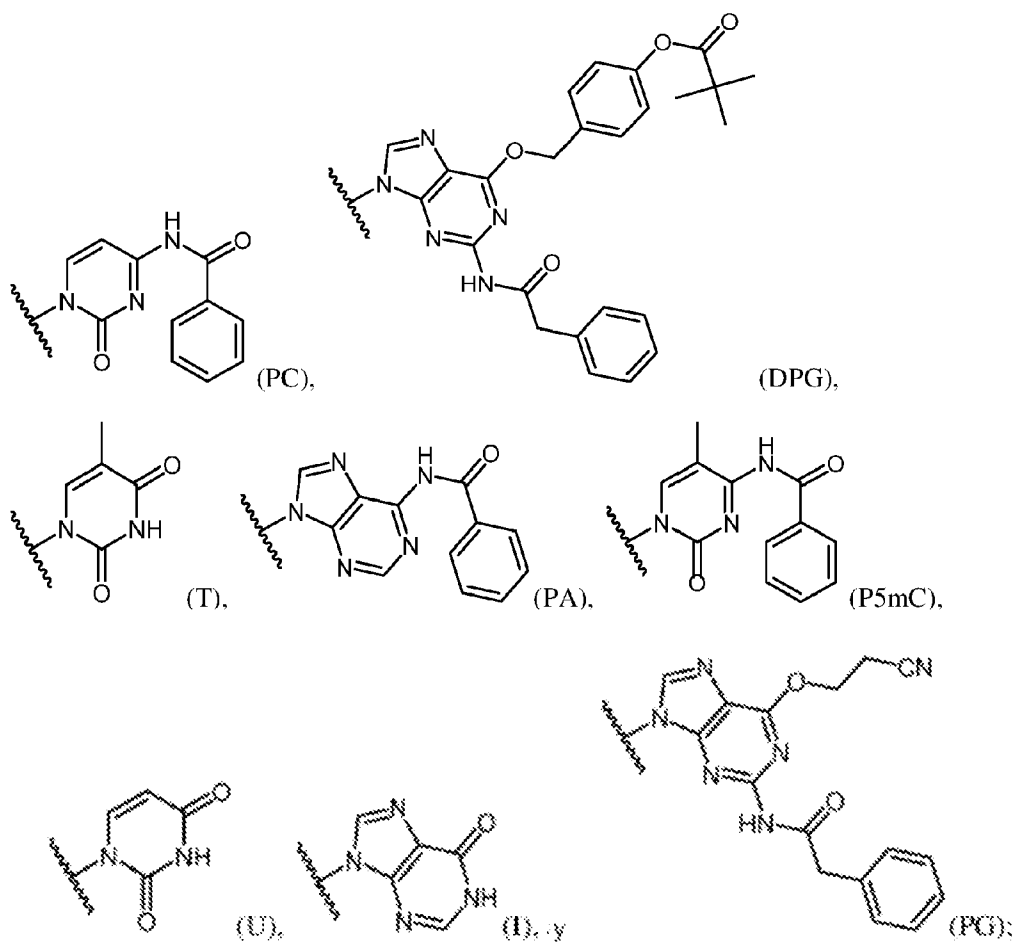


(A8)

10

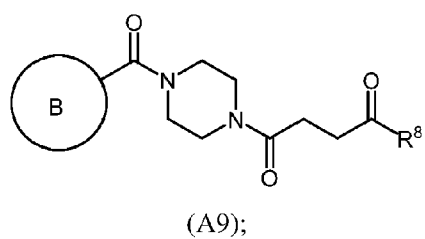
15

en presencia de un catalizador ácido de Lewis; donde
 Y es n-1 si R7 es de la Fórmula (A5a) o Y es n-2 si R7 es de la Fórmula (A5b);
 R3 se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y
 R4 se selecciona, independientemente para cada compuesto de la Fórmula (A8), del grupo que consiste en:



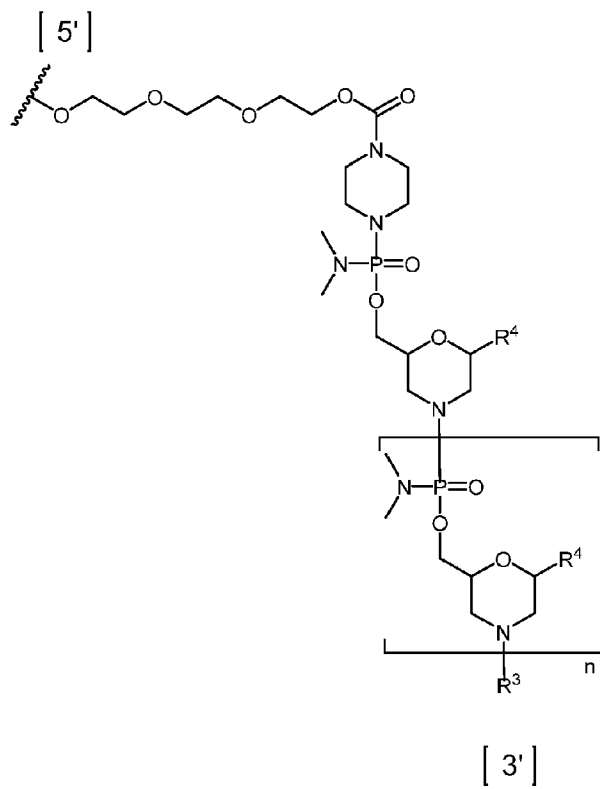
5

para formar un compuesto de la Fórmula (A9):

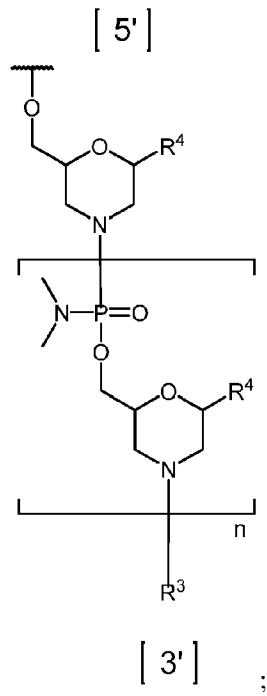


10

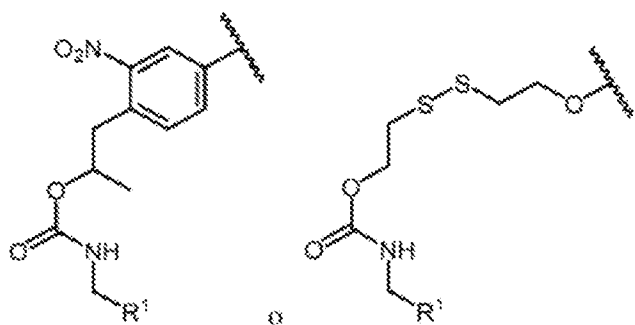
donde R8 es



0



B es

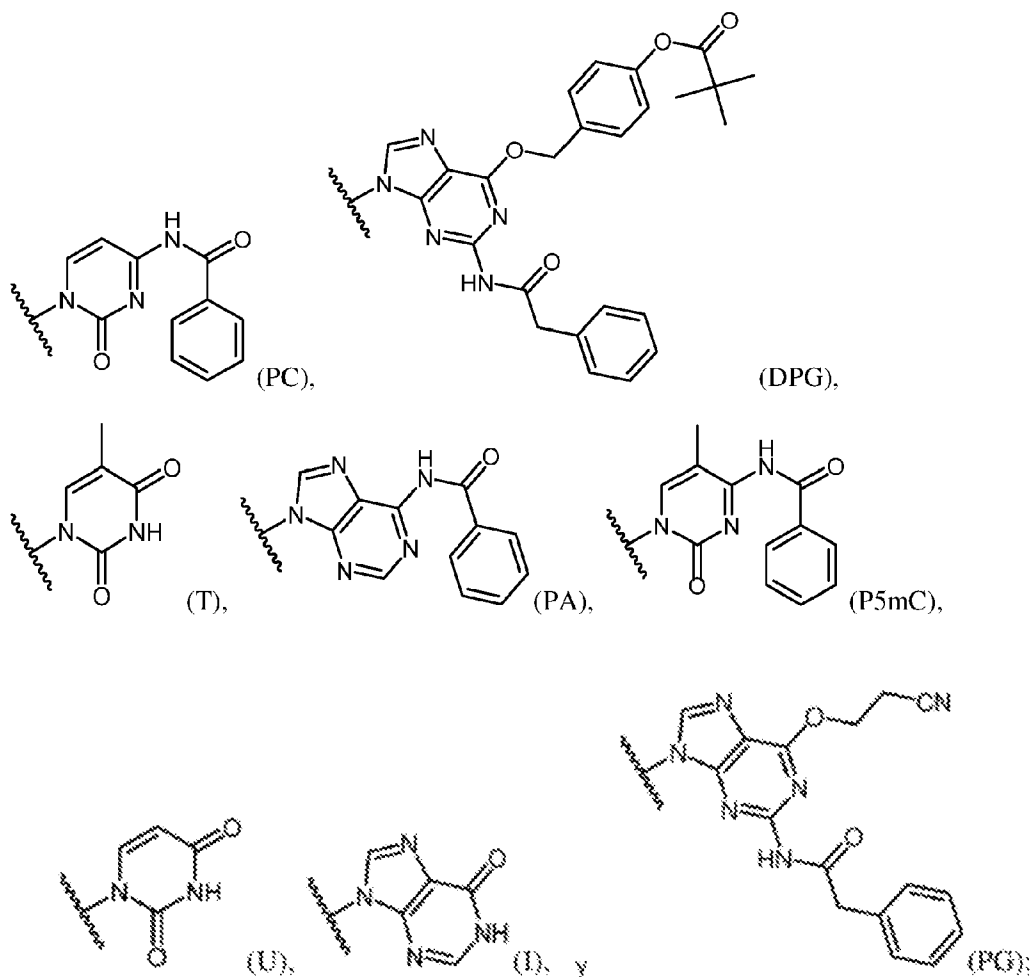


n es un número entero de 9 a 39;

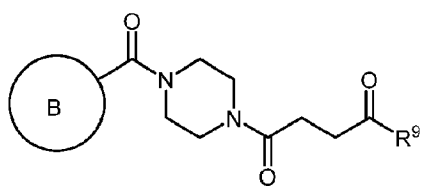
R1 es un medio de soporte;

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

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

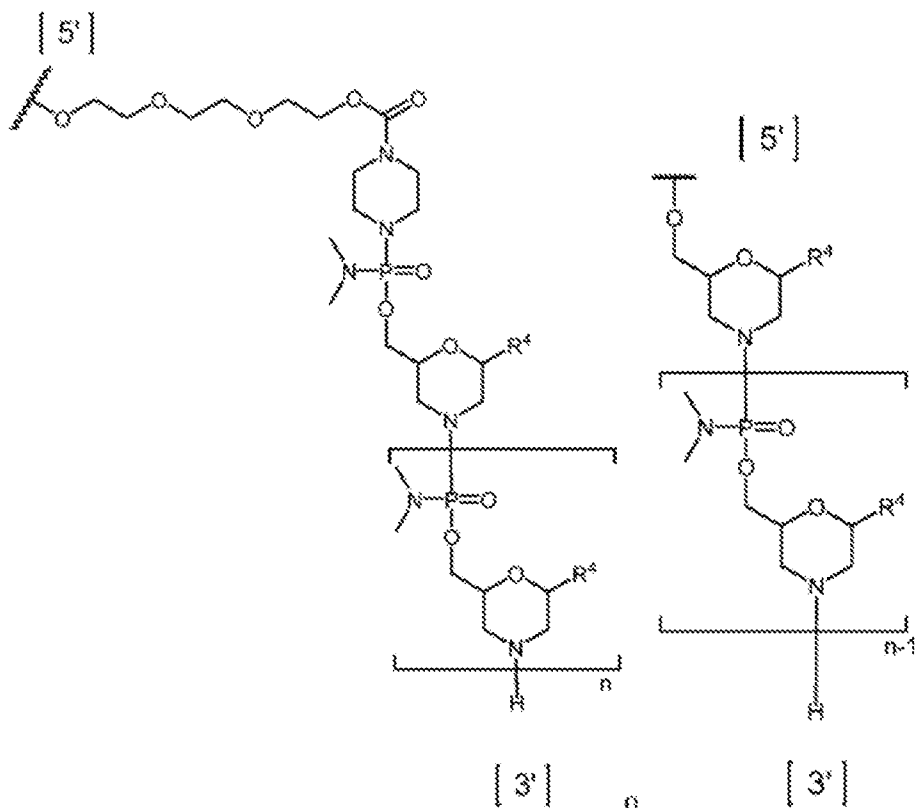


15 y
(f) poner en contacto el compuesto de la Fórmula (A9) con un agente de desbloqueo para formar un compuesto de la Fórmula (A 10):



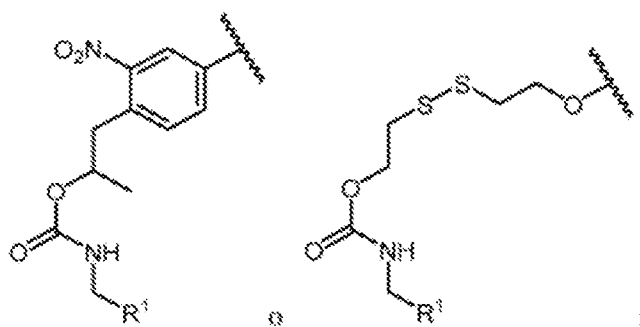
(A10);

donde R9 es



5

B es

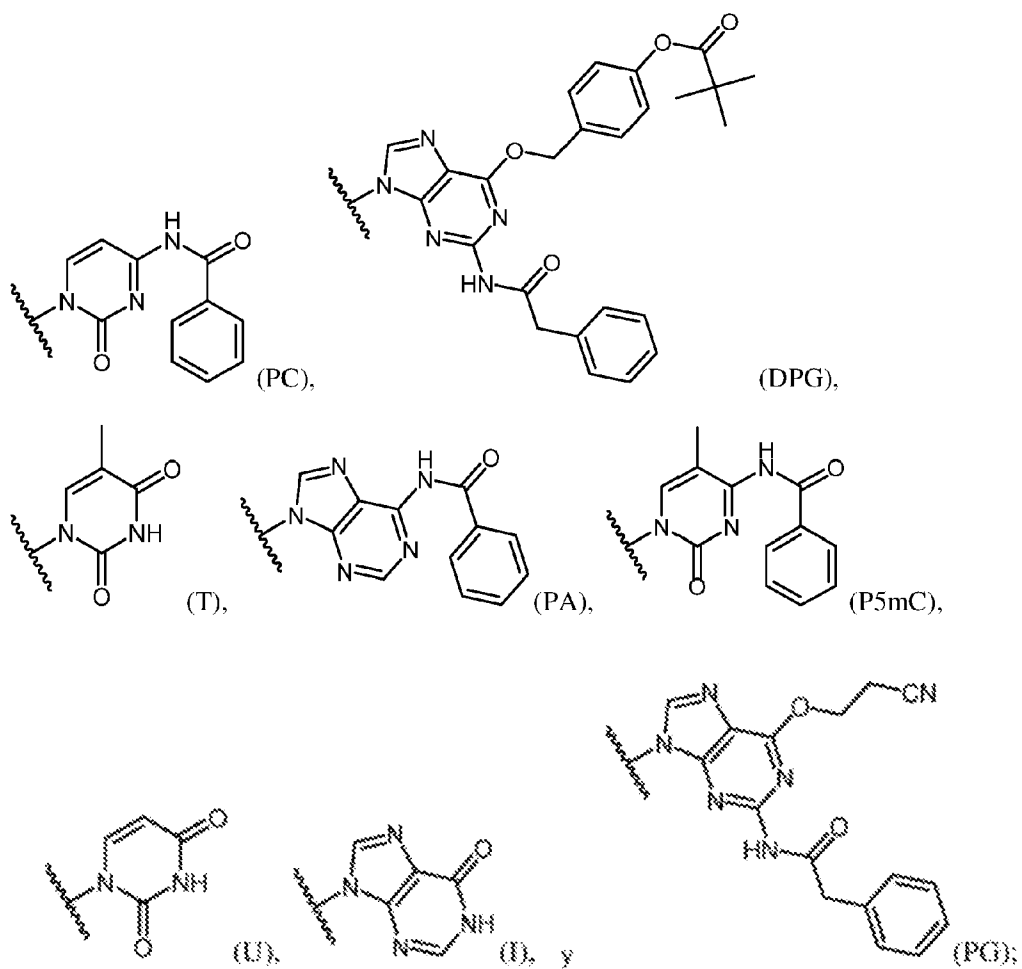


10

n es un número entero de 9 a 39;

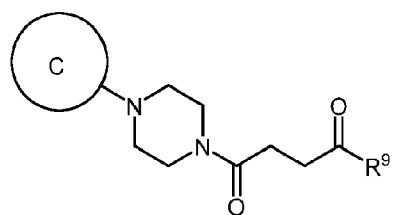
R1 es un medio de soporte; y

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



5

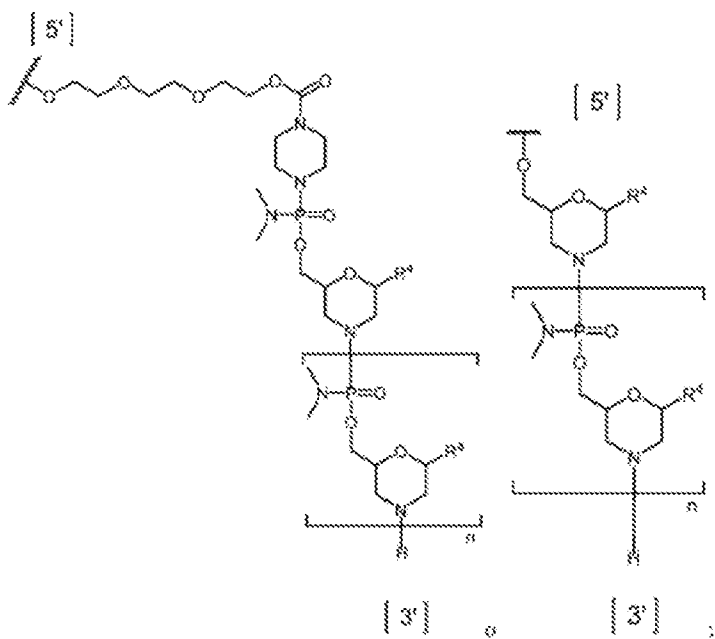
(g) poner en contacto el compuesto de la Fórmula (A10) con un agente de escisión para formar un compuesto de la Fórmula (A11):



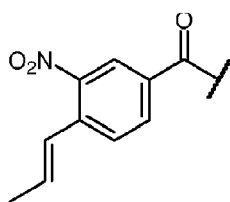
(A11);

10

en donde
R⁹ es



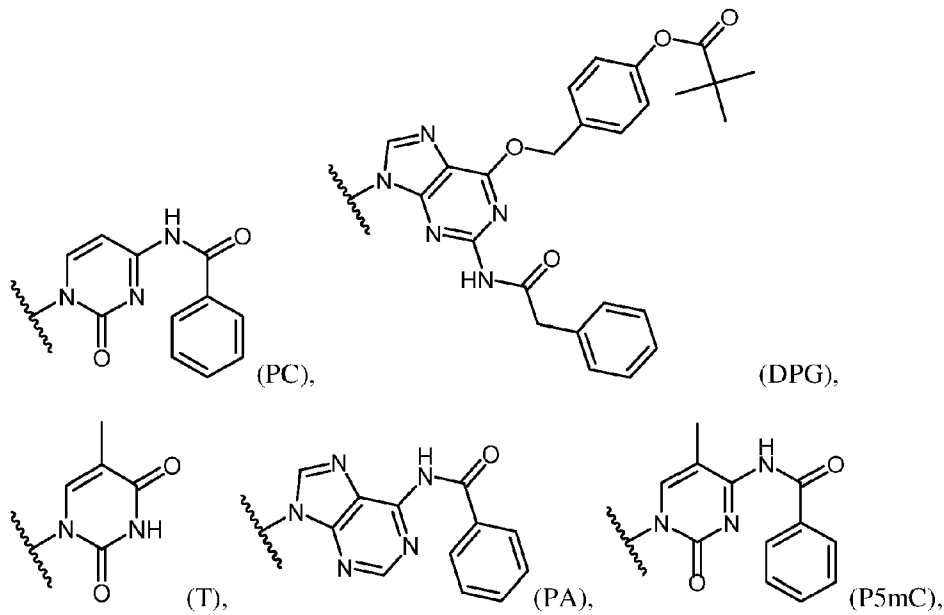
C es

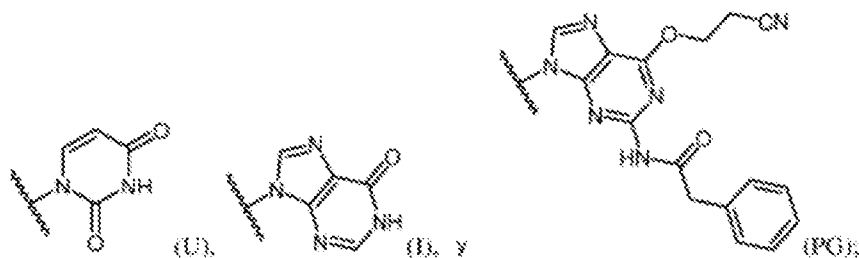


o H;

n es un número entero de 9 a 39; y

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





y

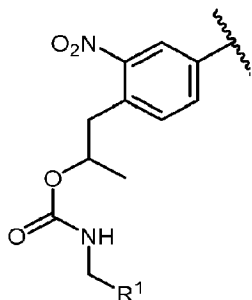
(h) poner en contacto el compuesto de la Fórmula (A11) con un agente desprotector para formar el compuesto oligomérico de la Fórmula (I).

2. El proceso de la reivindicación 1, en el que uno de los pasos (d) o (e2) comprende además poner en contacto el compuesto formado en el paso inmediatamente anterior con un agente de protección, y de manera preferente en el que los pasos (a), (c), (e1) y (f) comprender además poner en contacto el compuesto desbloqueado de cada paso con un agente de neutralización.

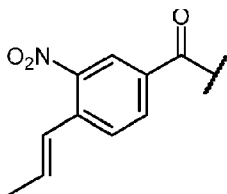
3. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que los compuestos de la Fórmula (A4) y Fórmula (A8) están cada uno, independientemente, en una solución que comprende N-etilmorfolino y dimetilimidazolidinona.

4. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el agente de escisión comprende ditiotretol y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno.

5. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que para los pasos (a)-(g), B es

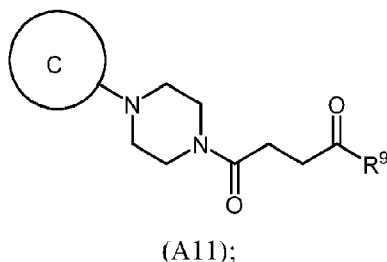


y para el paso (h), C es

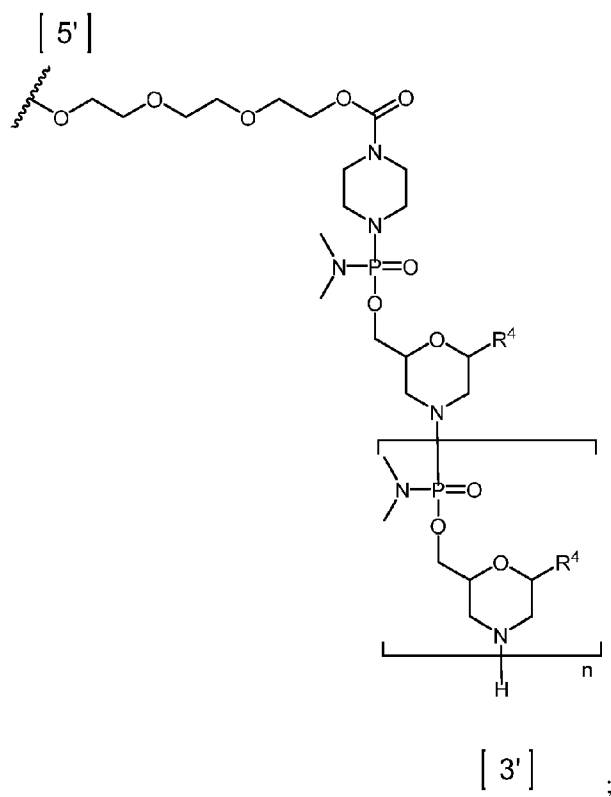


6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que cualquiera de los pasos (a), (b), (c), (d), (e1), (e2), (f), (g) o (h) se lleva a cabo, en una síntesis por lotes o en una síntesis continua.

7. Un proceso continuo para preparar un compuesto oligomérico de la Fórmula (A11):

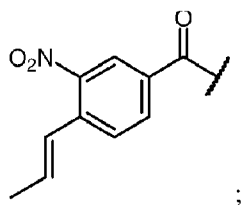


en donde R^9 es



5

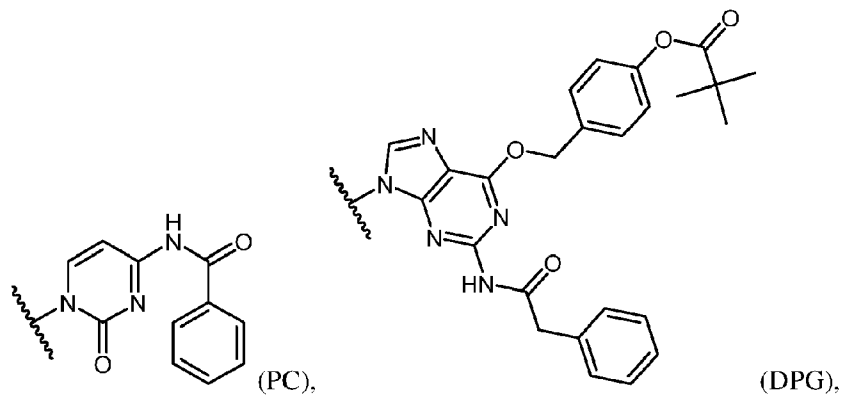
C es

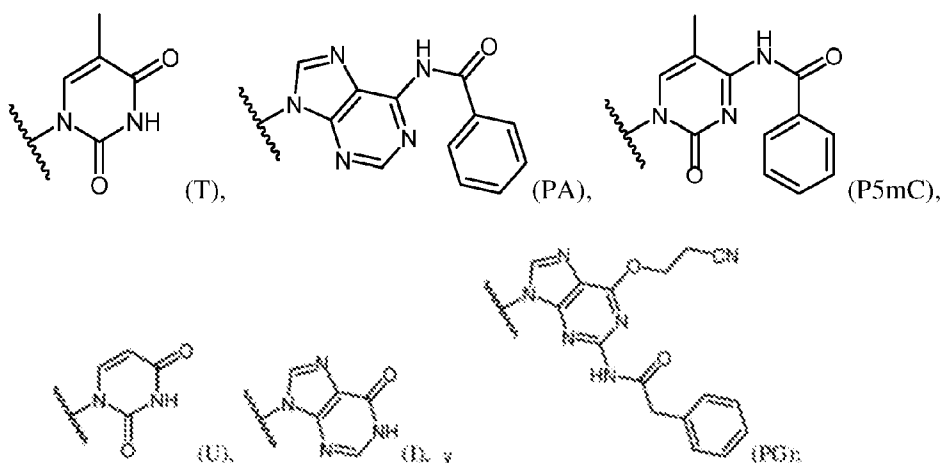


10

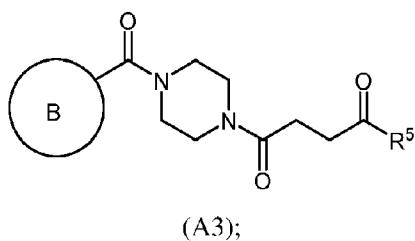
n es un número entero de 9 a 39; y

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

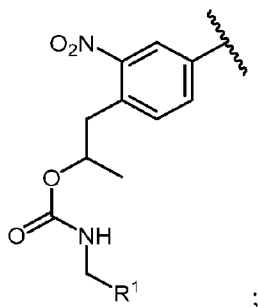




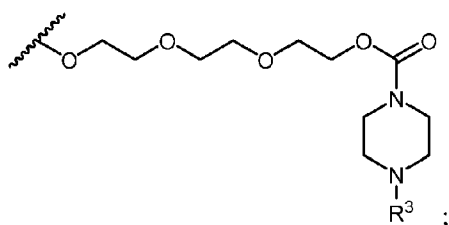
- 5 en donde el proceso comprende los pasos secuenciales de:
 (a) poner en contacto un agente de desbloqueo con un compuesto de la Fórmula (A3):



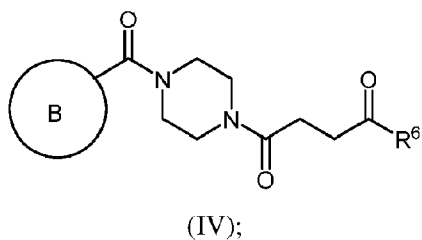
- 10 en donde B es



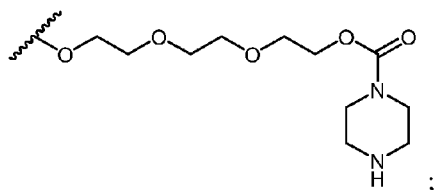
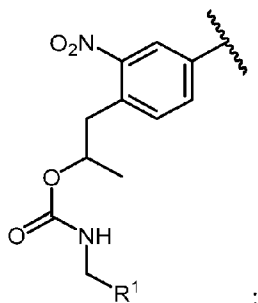
- 15 R1 es un medio de soporte;
 R5 es



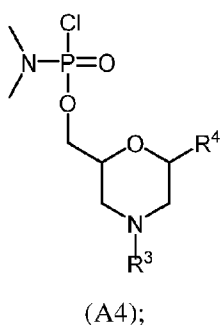
- 20 y
 R3 se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo;
 en un recipiente reactor para formar un compuesto de la Fórmula (IV):



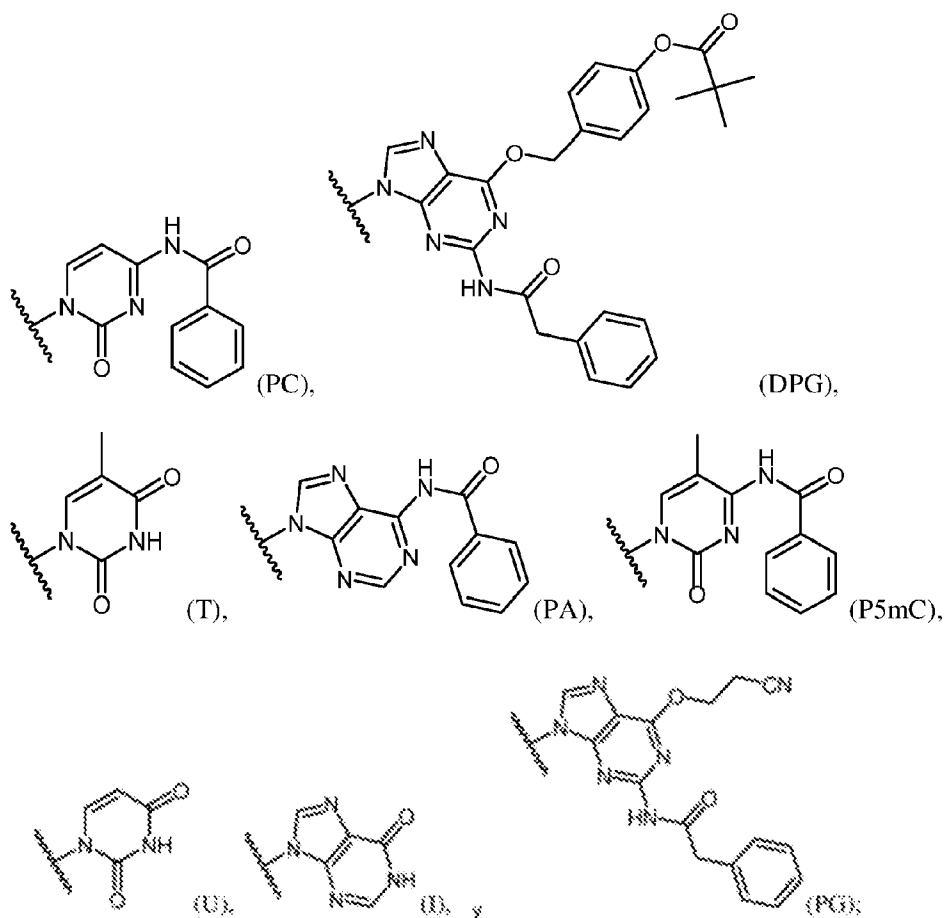
en donde B es



- (b) lavar el compuesto de la Fórmula (IV) con un solvente de lavado y un agente neutralizante, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado y un agente neutralizante a través del recipiente del reactor;
 (c) lavar el compuesto de la Fórmula (IV) con un solvente de lavado, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado a través del recipiente del reactor;
 (d) lavar el compuesto de la Fórmula (IV) con un solvente de acoplamiento, en el que el lavado comprende pasar un solvente de acoplamiento a través del recipiente del reactor;
 (e) introducir en la vasija del reactor un ácido de Lewis y un compuesto de la Fórmula (A4):

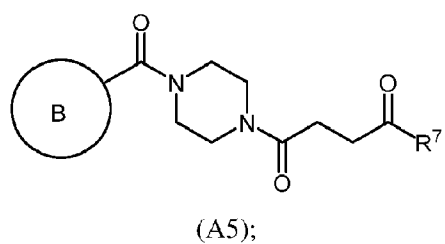


- en donde
 R^3 se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y
 R^4 se selecciona del grupo que consiste en:



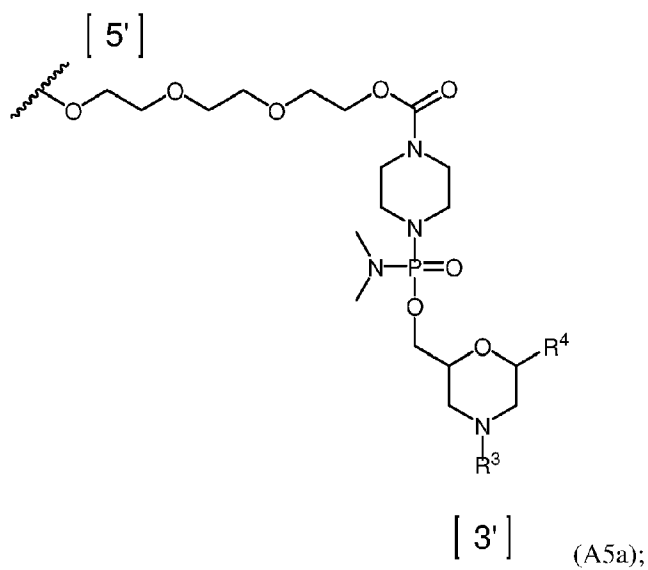
5

de manera que el compuesto de fórmula (A4) entra en contacto con el compuesto de fórmula (IV) para formar un compuesto de fórmula (A5):

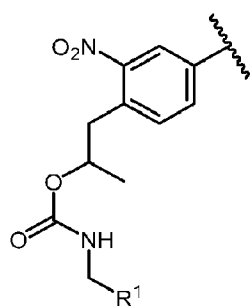


10

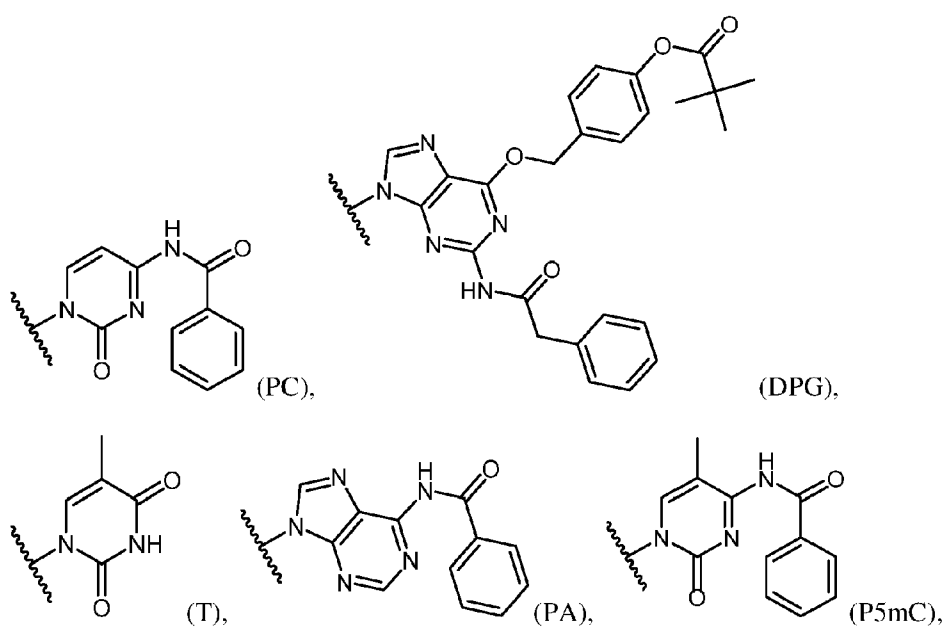
en la que R⁷ es de la Fórmula (A5a) o Fórmula (A5b):

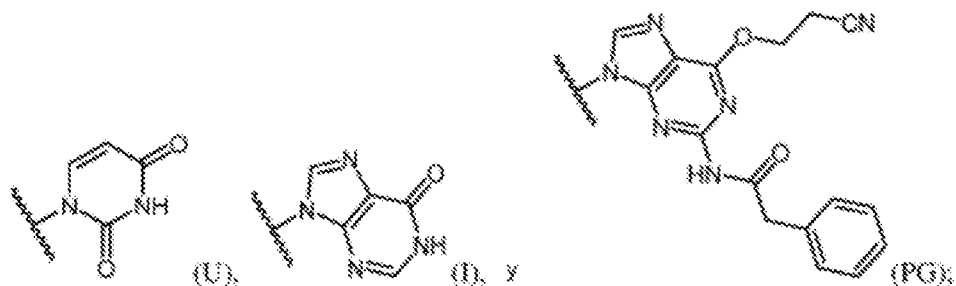


B es



R1 es un medio de soporte;
 R3 se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo,
 dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y
 R4 se selecciona de:





(f) lavar el compuesto de la Fórmula (A5) con un solvente de acoplamiento, en el que el lavado comprende pasar un solvente de acoplamiento a través del recipiente del reactor;

(g) llevar a cabo iteraciones Y de los pasos secuenciales de:

(g1) lavar el producto formado en el paso inmediatamente anterior con un solvente de lavado, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado a través del recipiente del reactor;

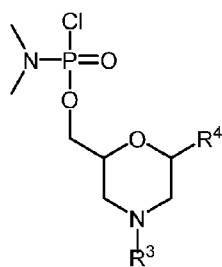
(g2) introducir un agente de desbloqueo en la vasija del reactor de manera que entre en contacto con el producto formado en el paso inmediatamente anterior;

(g3) lavar el producto formado en el paso inmediatamente anterior con un solvente de lavado y un agente neutralizante, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado y un agente neutralizante a través del recipiente del reactor;

(g4) lavar el producto formado en el paso inmediatamente anterior con un solvente de lavado, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado a través del recipiente del reactor;

(g5) lavar el producto formado en el paso inmediatamente anterior con un solvente de acoplamiento, en el que el lavado comprende pasar un solvente de acoplamiento a través del recipiente del reactor;

(g6) introducir en el recipiente del reactor que contiene el producto formado en el paso inmediatamente anterior un ácido de Lewis y un compuesto de la Fórmula (A8):



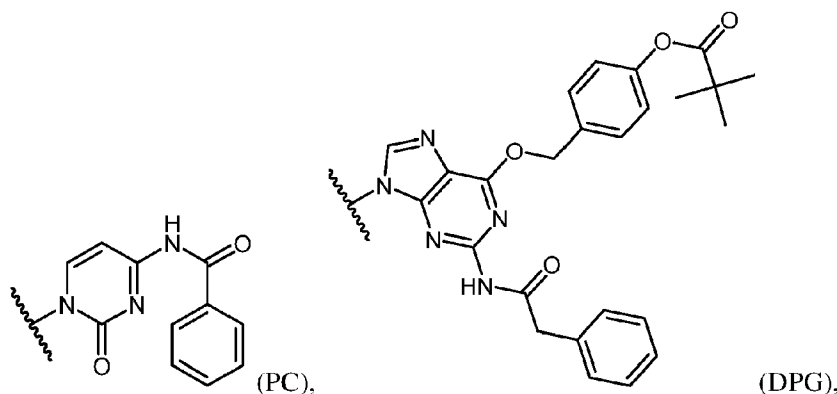
(A8);

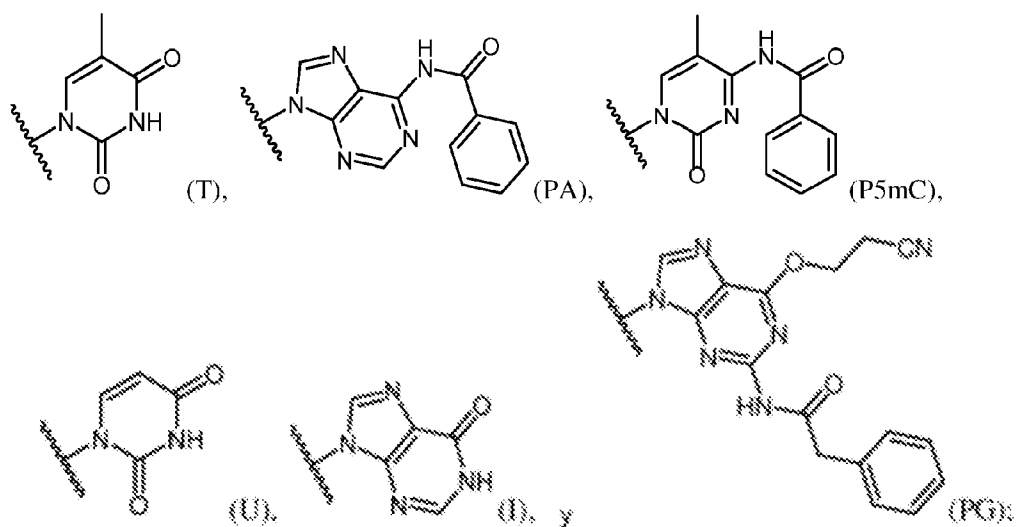
en donde

Y es n-1;

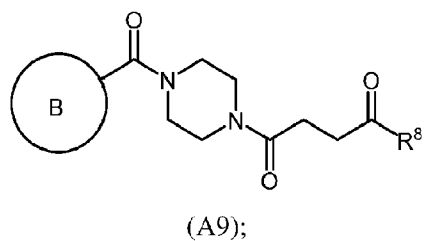
R3 se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y

R4 se selecciona, independientemente para cada compuesto de la Fórmula (A8), del grupo que consiste en:

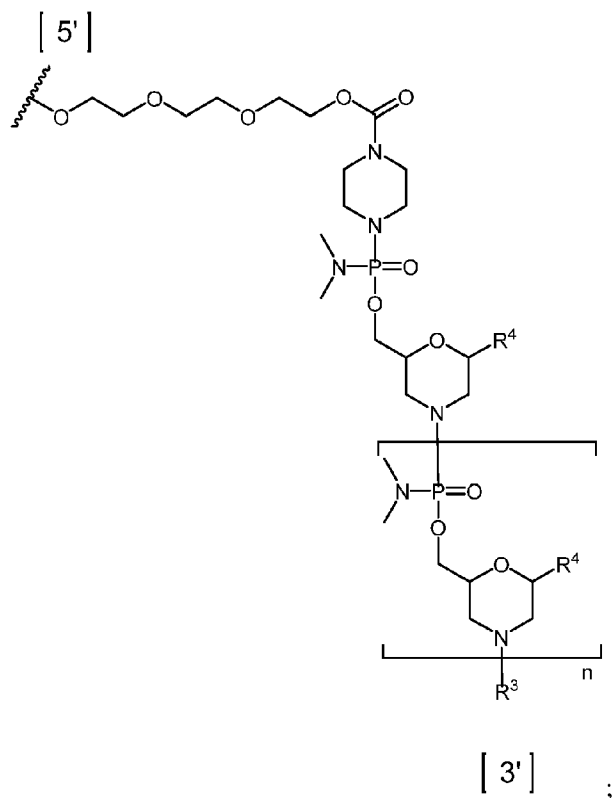




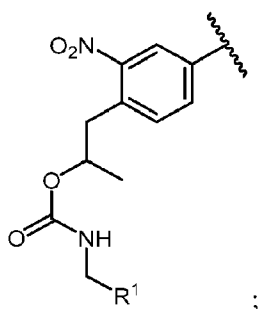
5 de modo que el compuesto de la Fórmula (A8) entra en contacto con el compuesto formado en el paso inmediatamente anterior para formar un compuesto de la Fórmula (A9):



10 en donde R⁸ es



B es



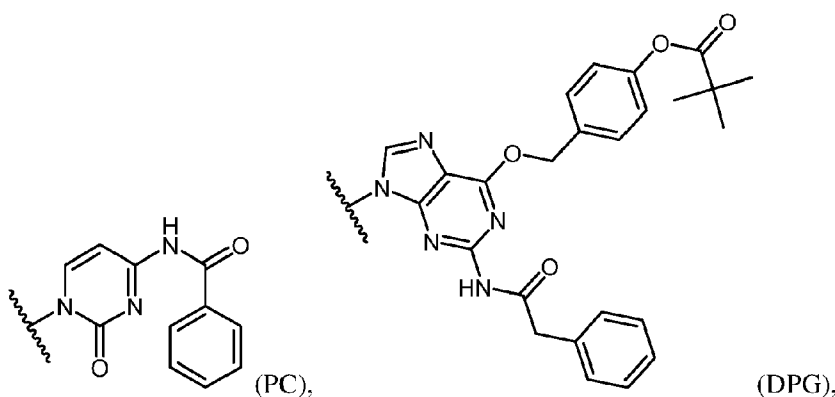
;

n es un número entero de 9 a 39;

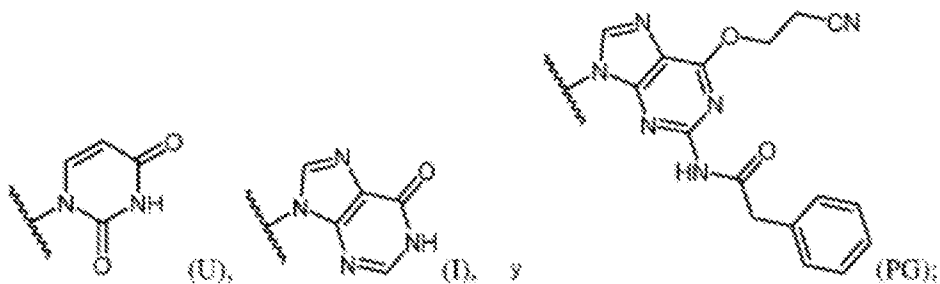
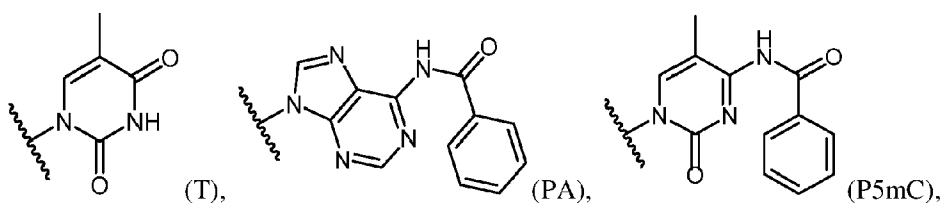
5 R1 es un medio de soporte;

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

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



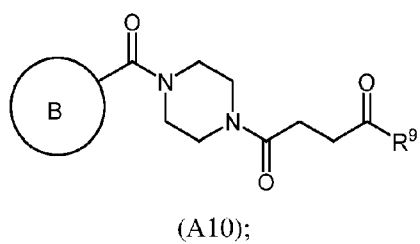
10



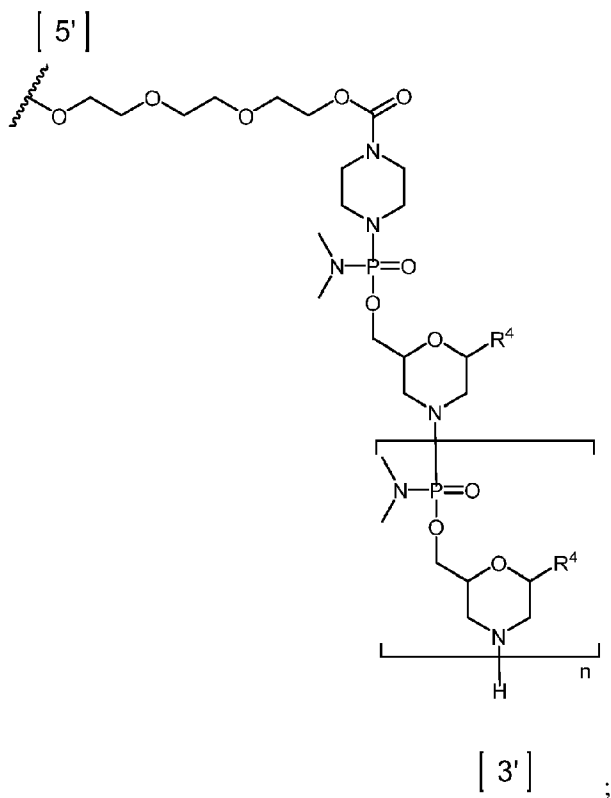
15 (h) lavar el compuesto de la Fórmula (A9) con un solvente de acoplamiento para eliminar el compuesto de la Fórmula (A8), en el que el lavado comprende pasar un solvente de acoplamiento a través del recipiente del reactor;

(i) lavar el compuesto de la Fórmula (A9) con un solvente de lavado para eliminar el solvente de acoplamiento, en el que el lavado comprende pasar un solvente de lavado a través del recipiente del reactor;

20 (j) poner en contacto un agente de desbloqueo con un compuesto de la Fórmula (A9) en un recipiente de reactor para formar un compuesto de la Fórmula (A10):

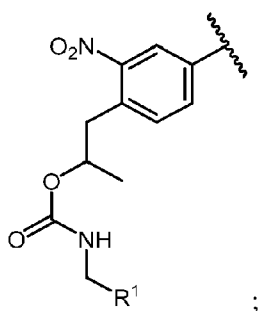


en donde R^9 es



5

B es

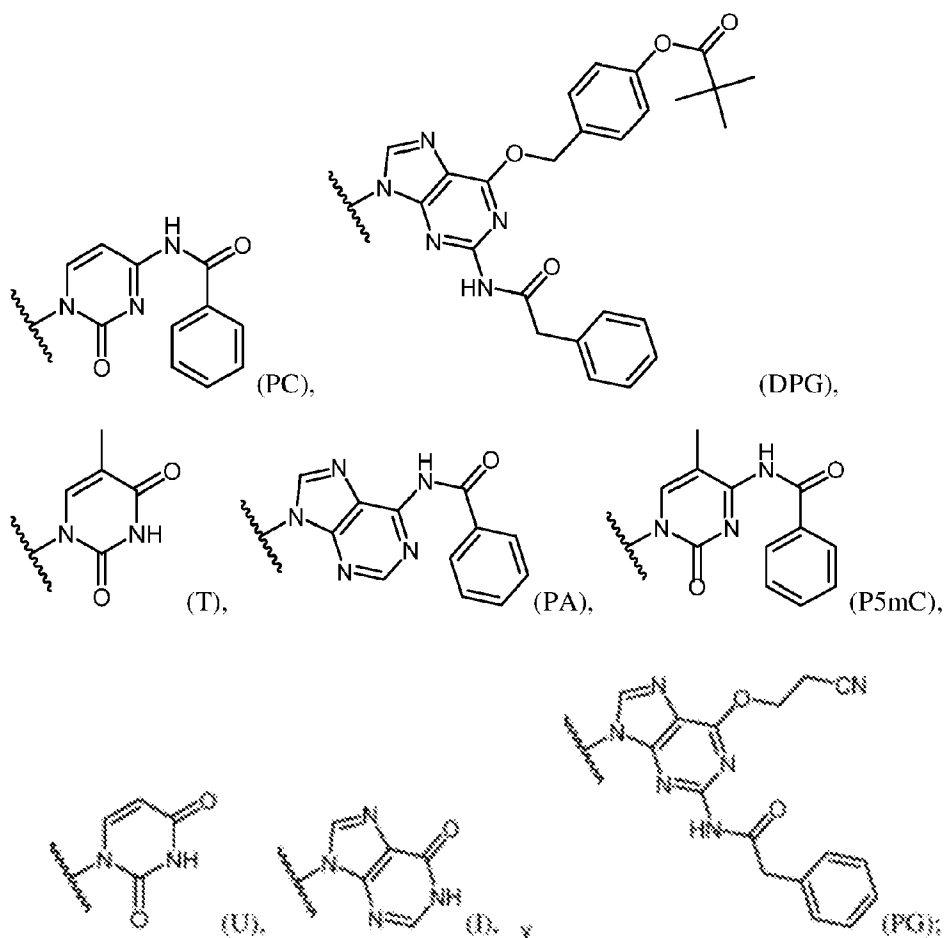


10

n es un número entero de 9 a 39

R1 es un medio de soporte; y

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



5

y

(k) poner en contacto un agente de escisión con un compuesto de la Fórmula (10) en un recipiente reactor para formar un compuesto de la Fórmula (A11).

10

8. El proceso de la reivindicación 7, en el que los pasos (a), (g2) y (j) comprenden además poner en contacto el compuesto desbloqueado de cada paso respectivo con un agente de neutralización.

15

9. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 7-8, en el que el solvente de lavado es un solvente halogenado, y de manera preferente en el que el solvente de acoplamiento es 1,3-dimetil-2-imidazolidinona o N-metil-2-pirrolidona.

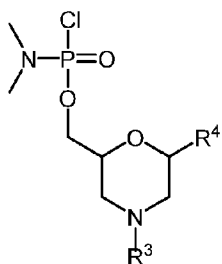
10. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que cualquiera de los pasos (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g1), (g2), (g3), (g4), (g5), (g6), (h), (i), (j) y (k) se llevan a cabo opcionalmente en un proceso discontinuo.

20

11. El proceso de la reivindicación 7, en el que el proceso se lleva a cabo en un reactor de flujo continuo, comprendiendo el reactor de flujo continuo al menos:

(a) una zona de alimentación, en donde la zona de alimentación comprende una o más líneas de alimentación, cada una equipada con una bomba, y en donde las zonas de entrada de las líneas de alimentación están conectadas independientemente a recipientes que comprenden un agente neutralizante, un solvente de acoplamiento, un agente de desbloqueo, un agente de lavado solvente y un compuesto de fórmula (A8):

25

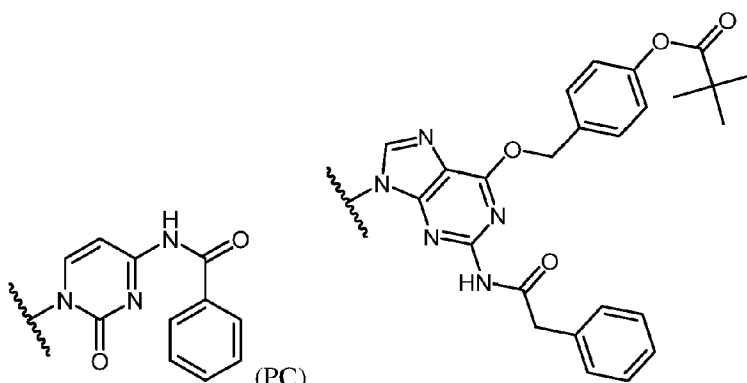


(A8);

en donde

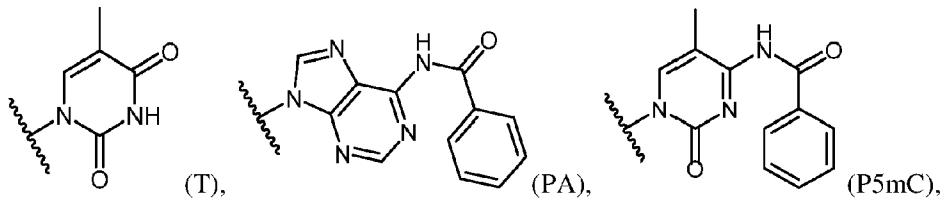
R³ se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo; y

5 R⁴ se selecciona, independientemente para cada compuesto de la Fórmula (A8), del grupo que consiste en :



(PC),

(DPG),

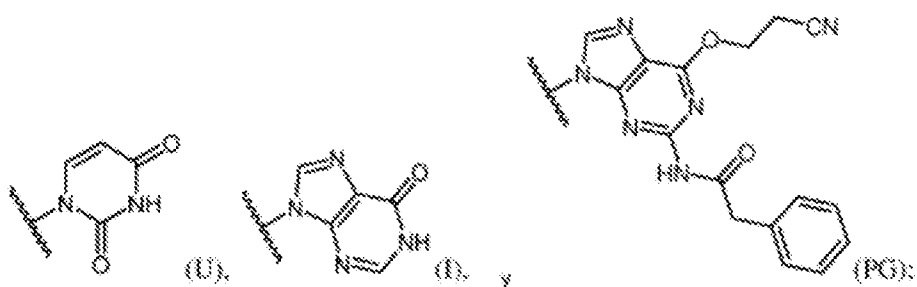


(T),

(PA),

(P5mC),

10



(U),

(I),

(PG);

en el que el compuesto de la Fórmula (A8) se disuelve en un solvente de acoplamiento;

15 (b) una zona de reacción que está conectada a la zona de salida de una o más líneas de alimentación y que contiene una resina de síntesis de PMO;

(c) una zona de salida, mediante la cual el flujo o producto residual se puede recolectar de forma independiente;

20 (d) un dispositivo de control de presión; y

(e) un medio para controlar independientemente la temperatura de la zona de alimentación y la zona de reacción.

12. El proceso de la reivindicación 11, en el que el reactor de flujo continuo se usa para la preparación de Eteplirsén.

25

13. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el agente de desbloqueo usado en cada paso es una solución que comprende un ácido halogenado, y de manera preferente en el que el agente de desbloqueo se selecciona del grupo que consiste en ácido cloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético.
/
- 5 14. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el ácido de Lewis se selecciona de un grupo que consiste en LiCl, LiBr, LiI y LiOTf.
- 10 15. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el agente de neutralización está en una solución que comprende un solvente halogenado y alcohol isopropílico y de manera preferente en el que el agente de neutralización es una monoalquil, dialquil o trialquilamina.

El monómero de adenosina es estable a 90°C

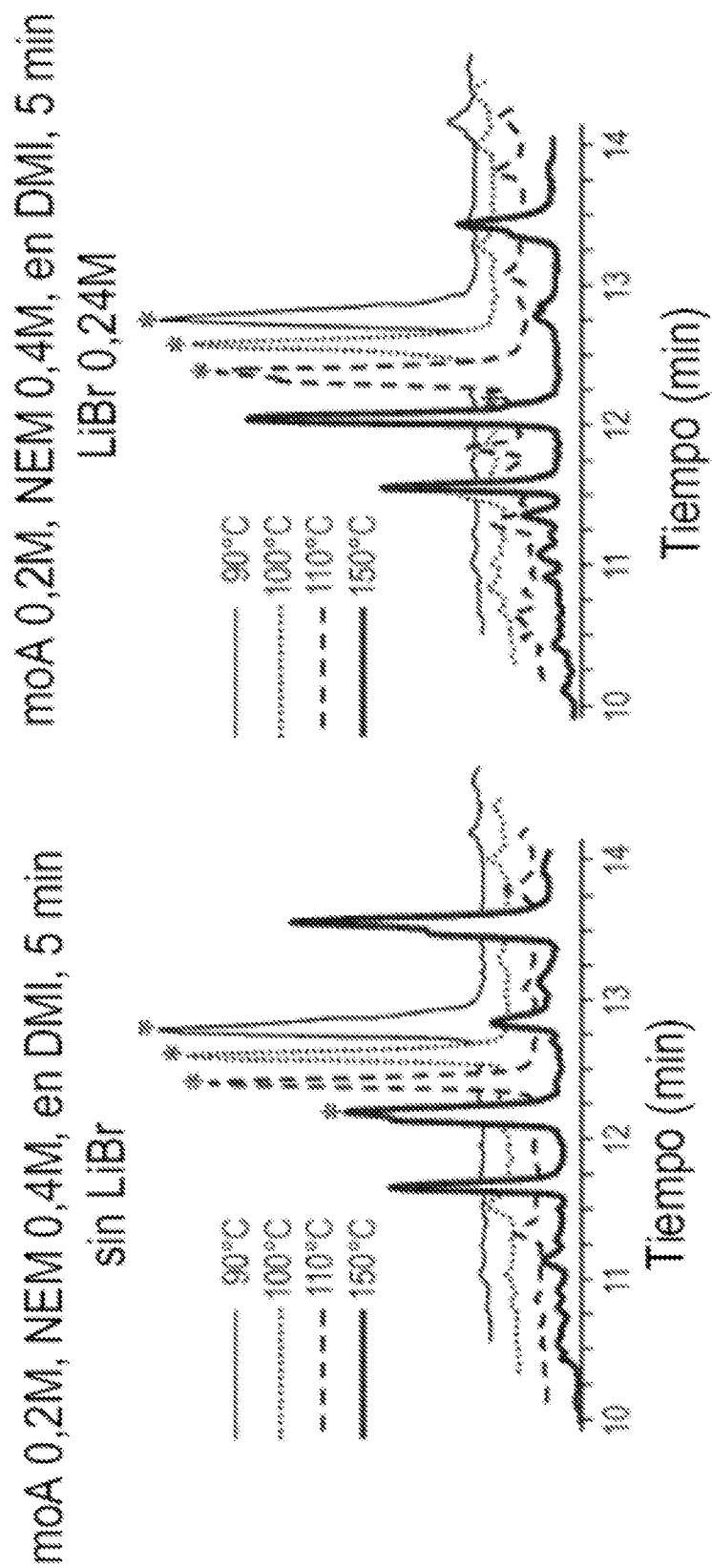


Fig. 1

Estabilidad de la PMO de resina

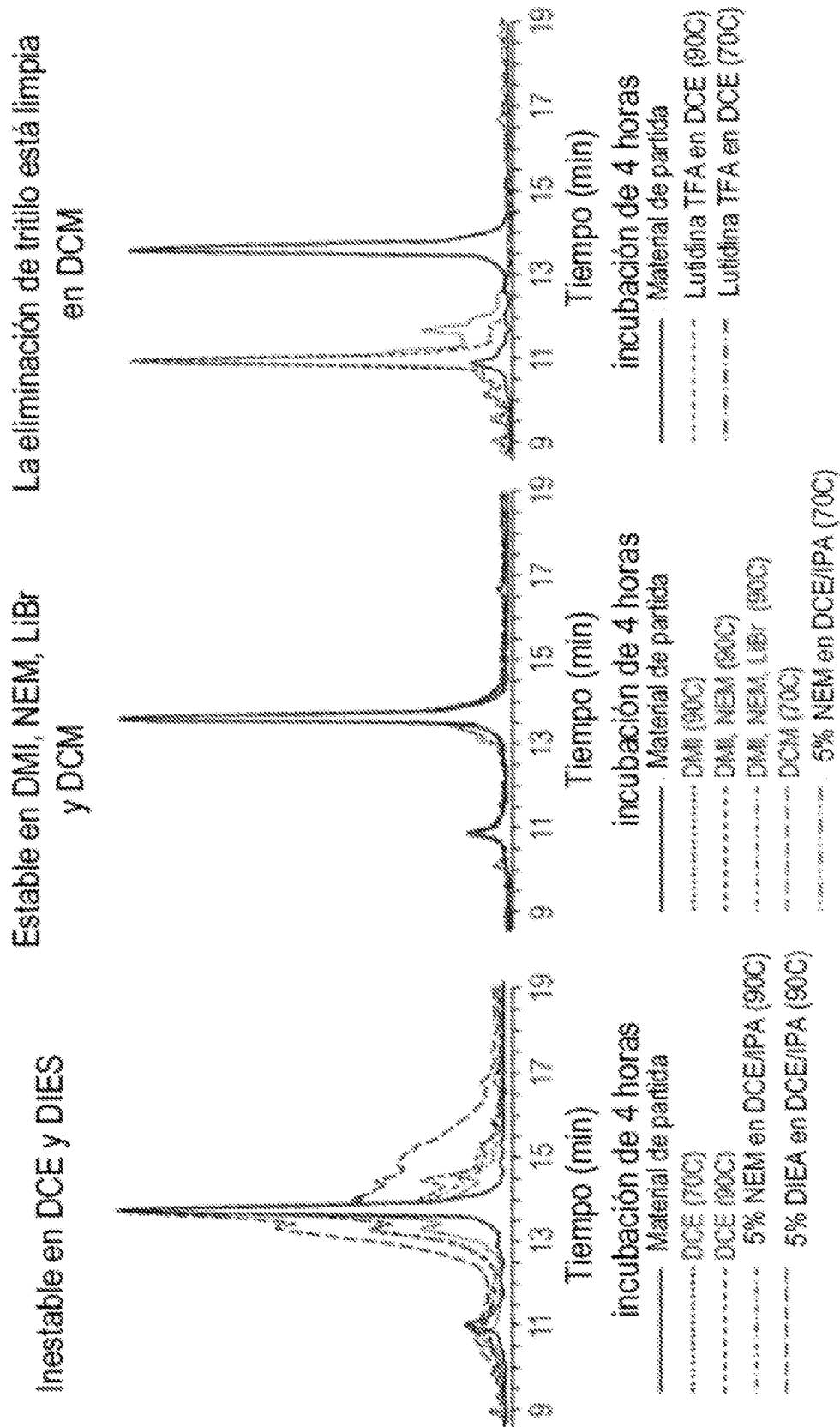


Fig. 2

Detritilación leve, rápida a 90°C

Collidina TFA a 90°C

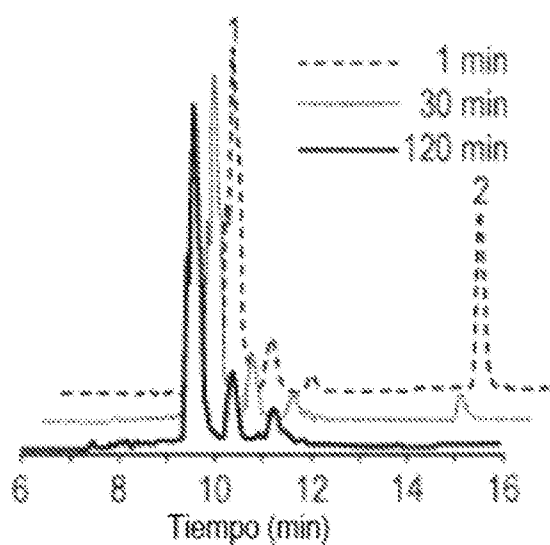


Fig. 3A

Collidina TFA a 90°C

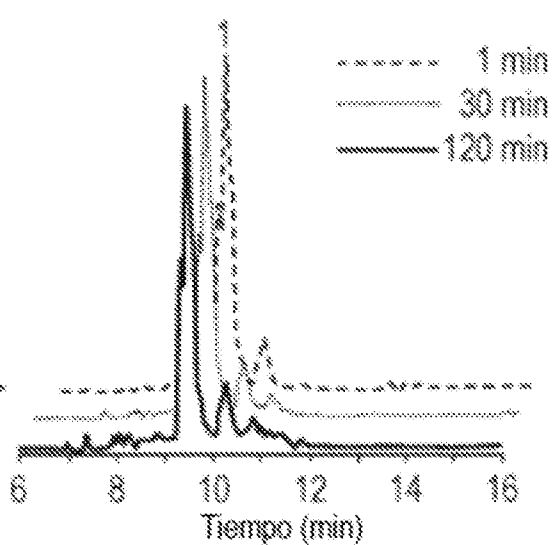


Fig. 3B

Piridina TFA a 90°C

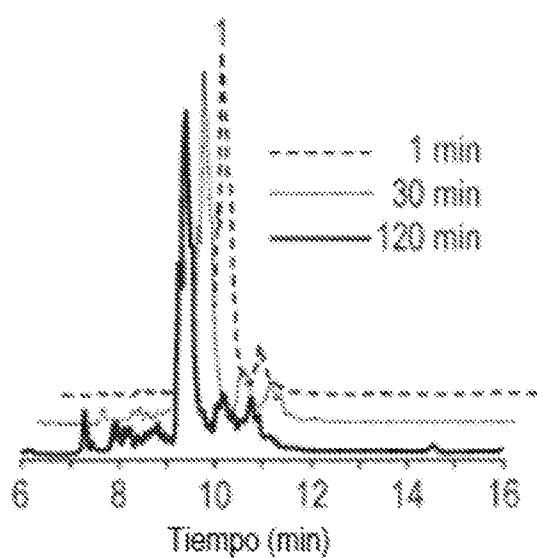


Fig. 3C

4-Cianopiridina TFA RT

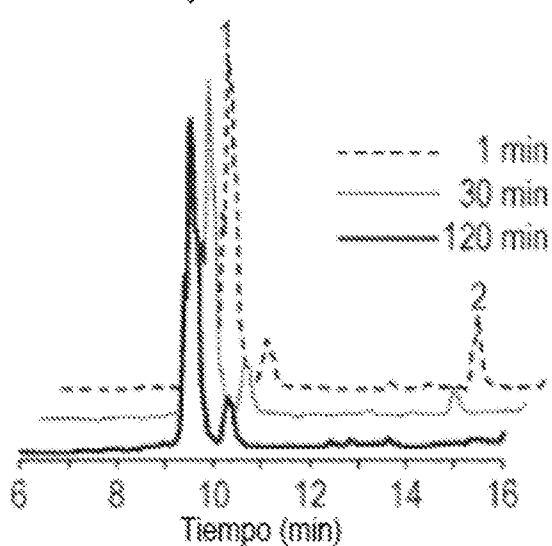
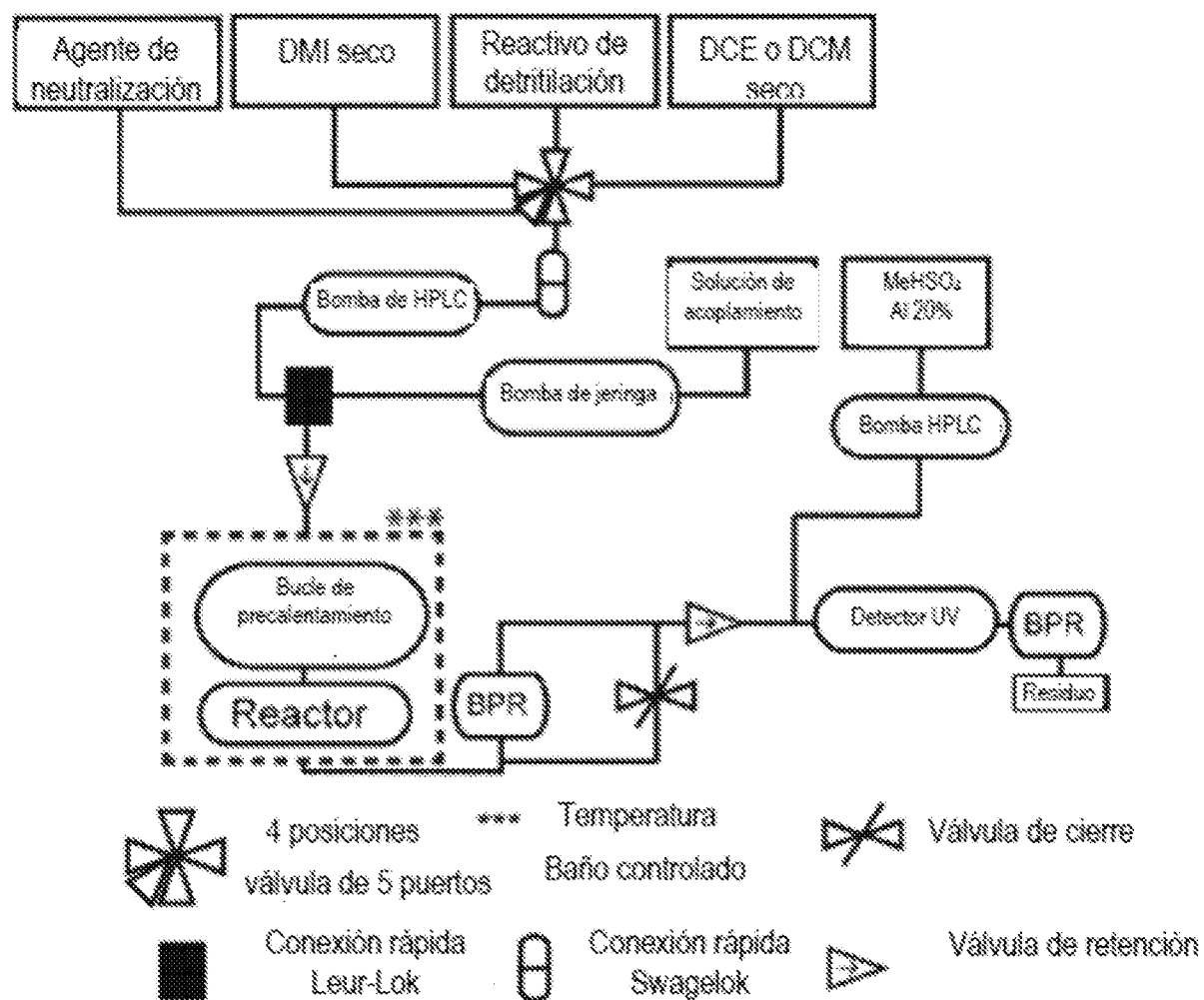


Fig. 3D

**Fig. 4**

Acoplamiento de 70°C, DIEA RT
Detrit. Cianopiridina TFA

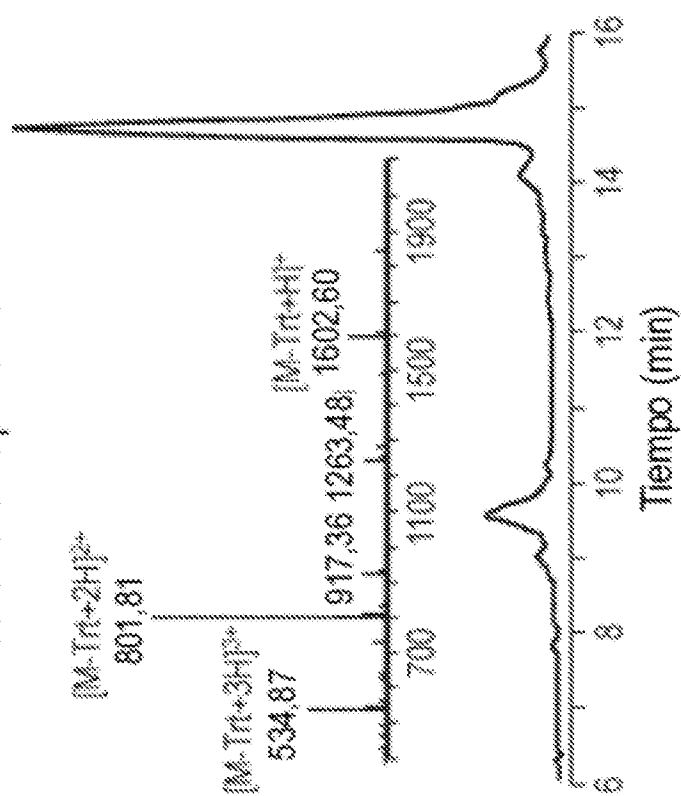


Fig. 5B

Acoplamiento de 70°C, DIEA 70°C
Detrit. Cianopiridina TFA

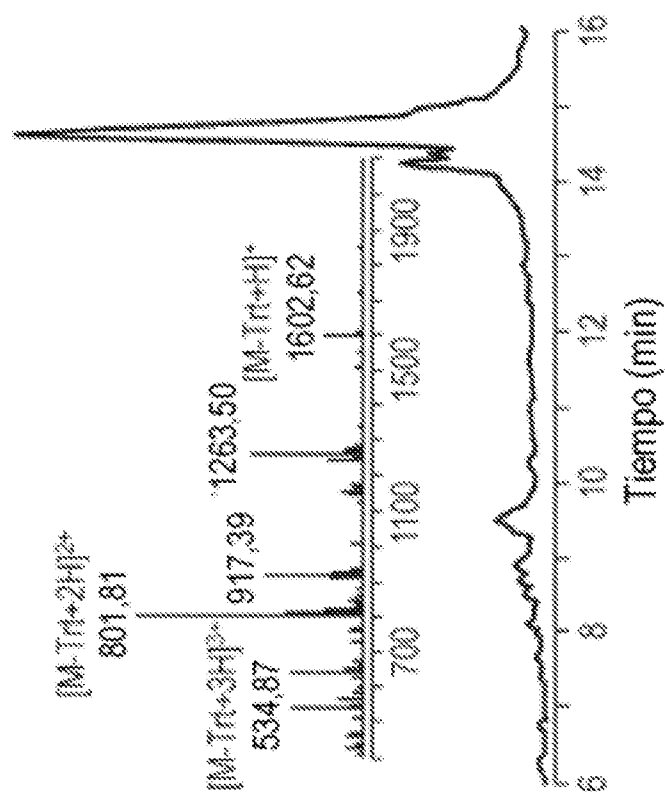


Fig. 5A

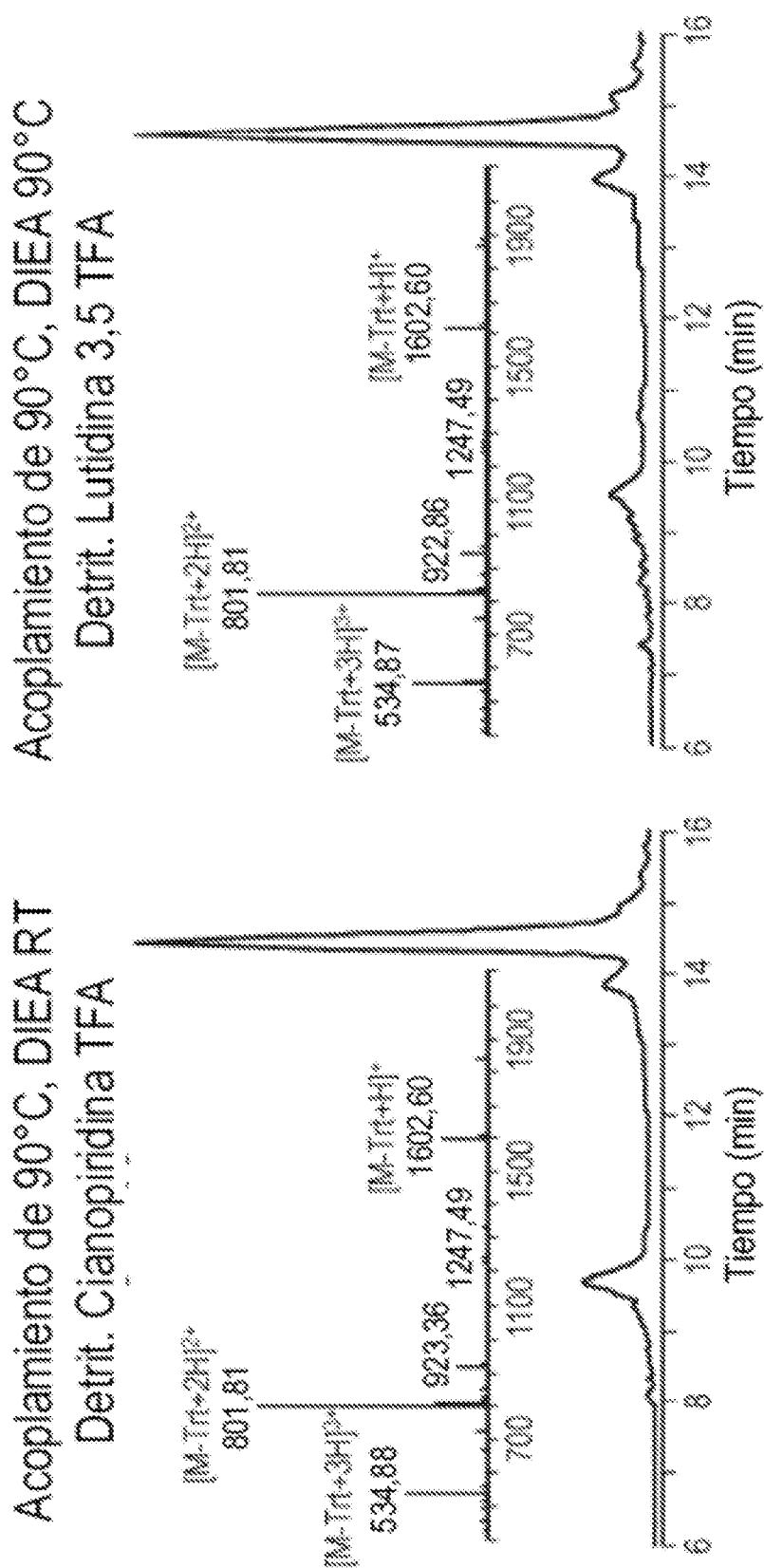


Fig. 5D

Fig. 5C

Acoplamiento de 90°C, NEM 90°C
 Detrit. Lutidina 3,5 TFA

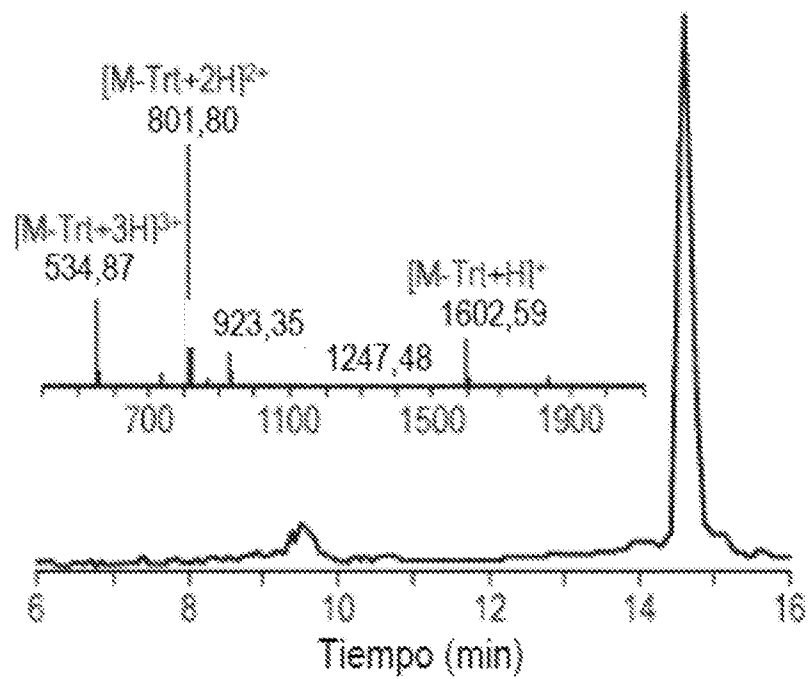


Fig. 5E

Acoplamiento de 90°C, Detrit. Lutidina 3,5 TFA 90°Cm DCE

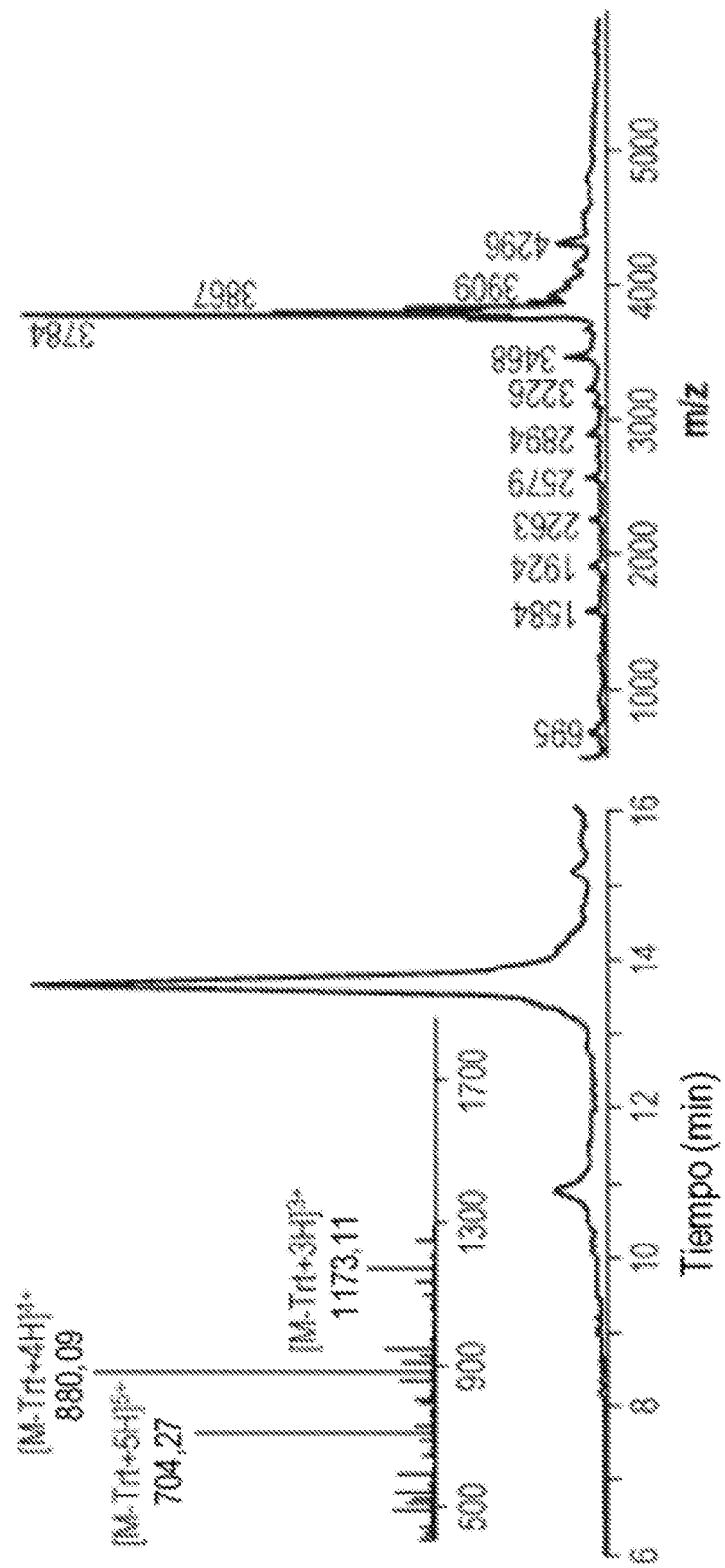


Fig. 6A

Acoplamiento de 70°C, Detrit. Lutidina 3,5 TFA 70°C, DCM

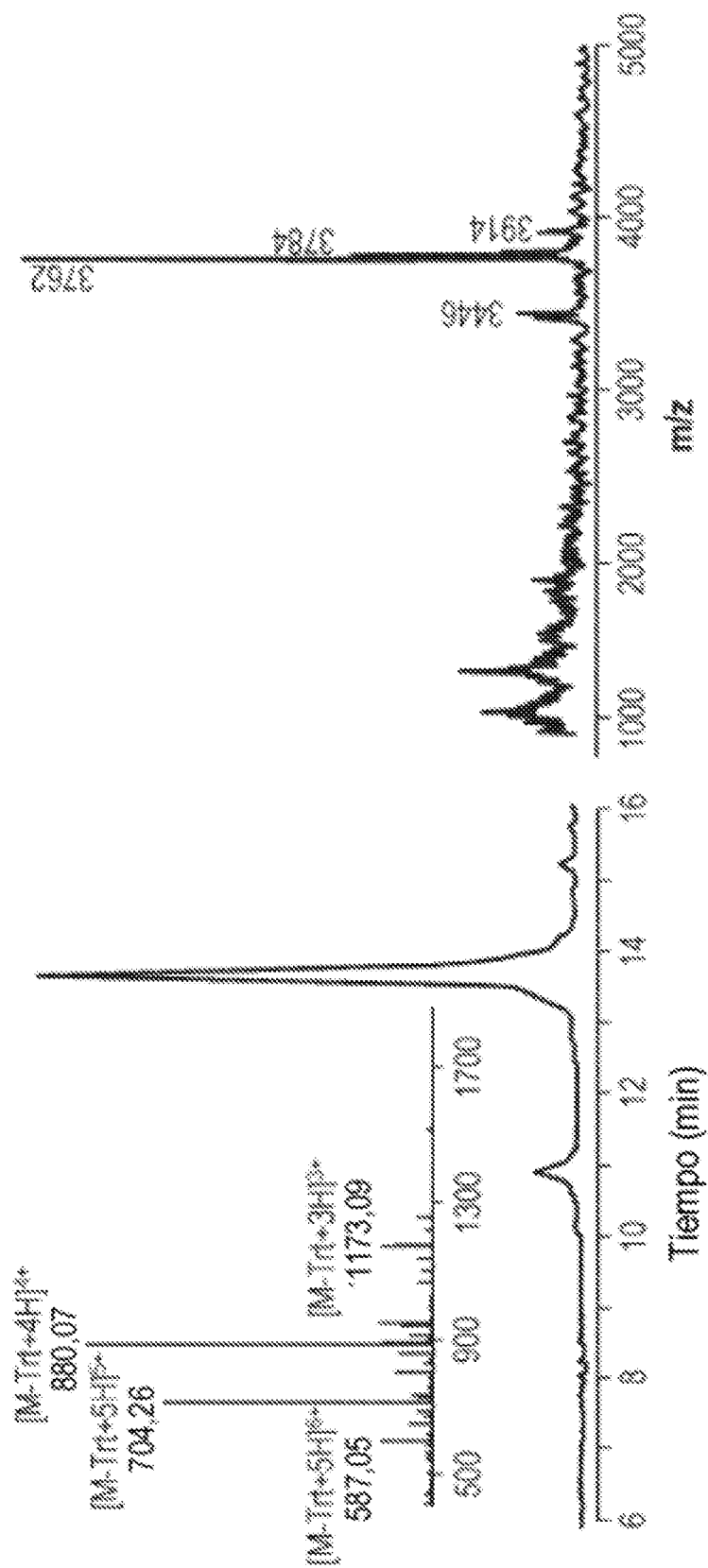


Fig. 6C

Acoplamiento de 90°C, Detrit. Lutidina 3,5 TFA 90°C, DCM

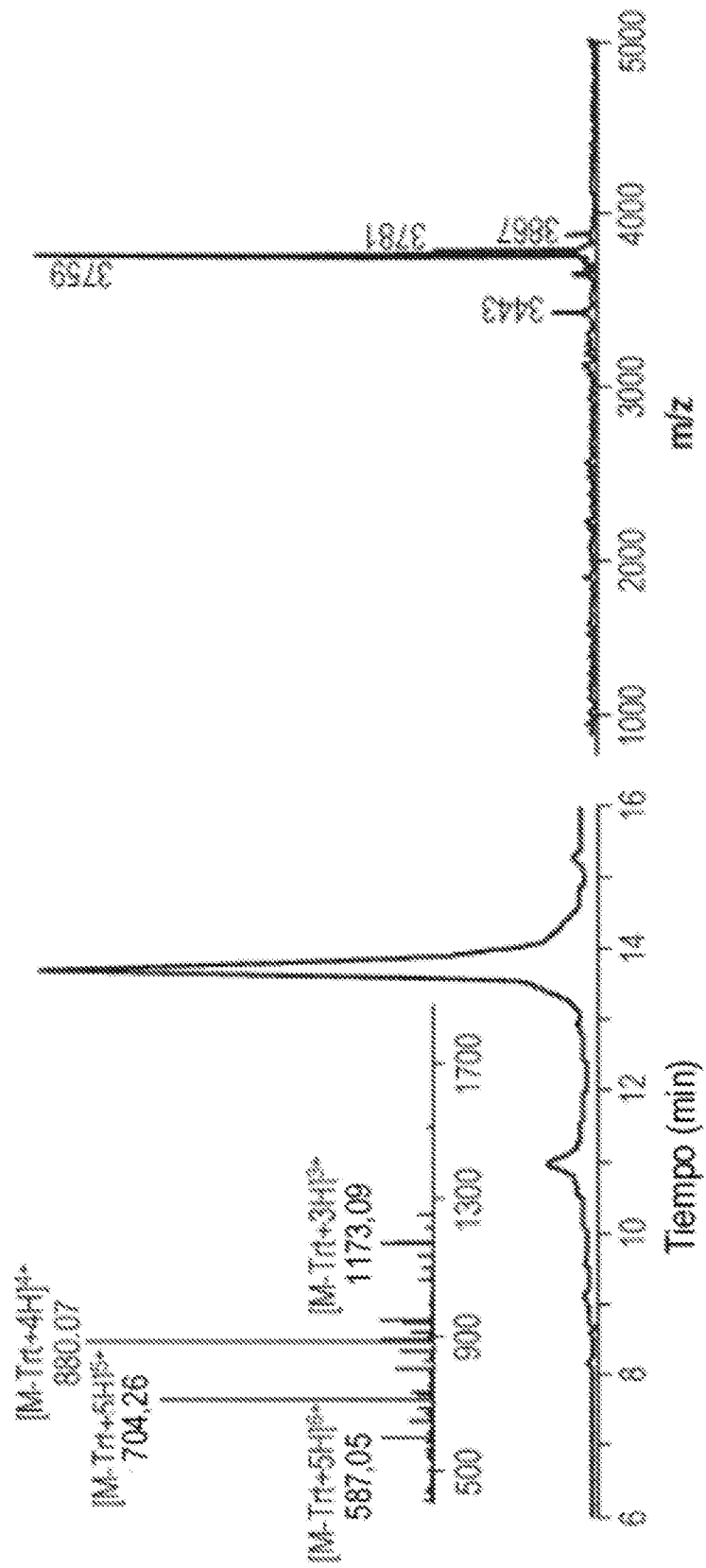


Fig. 6D

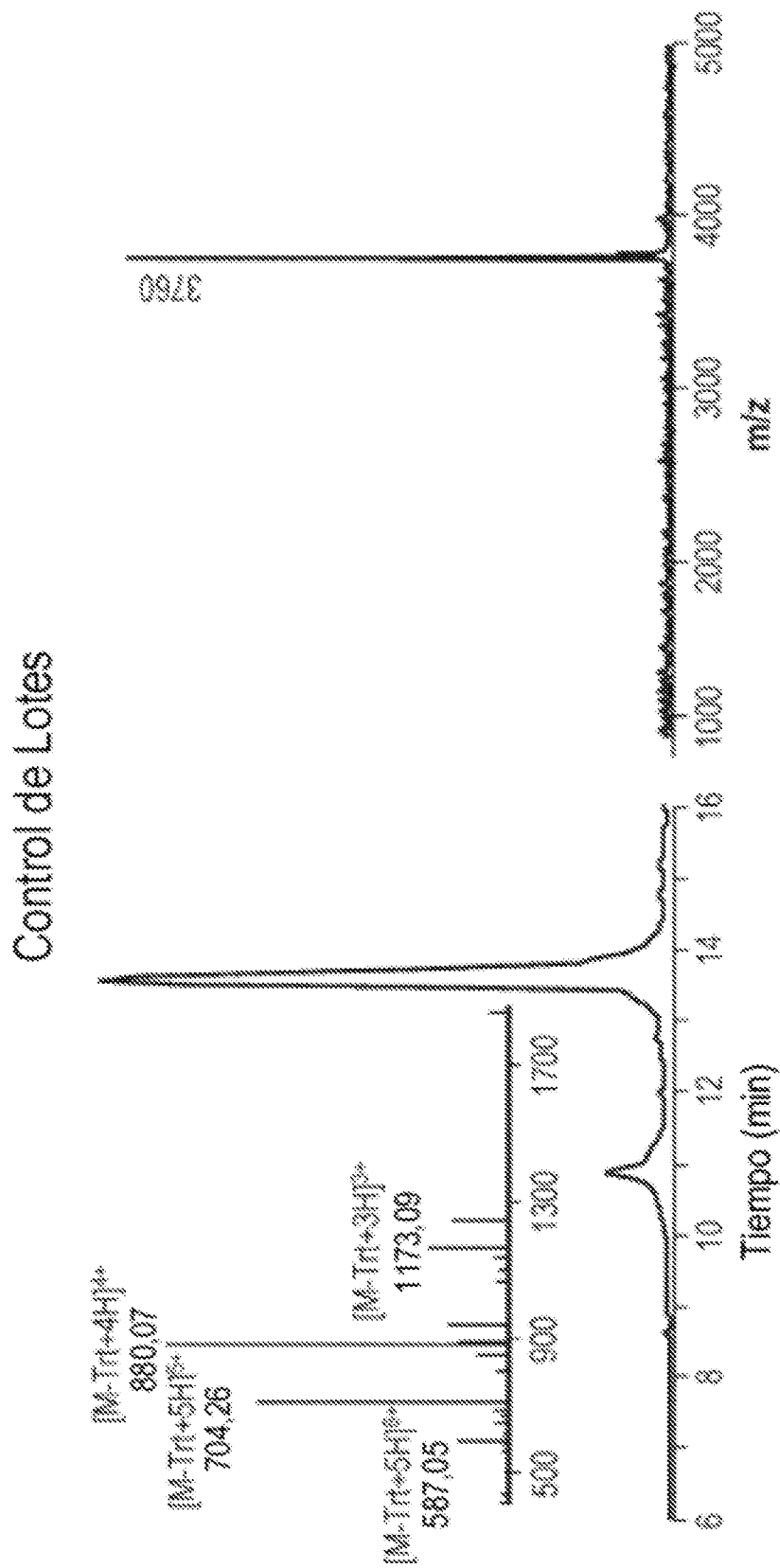


Fig. 6E

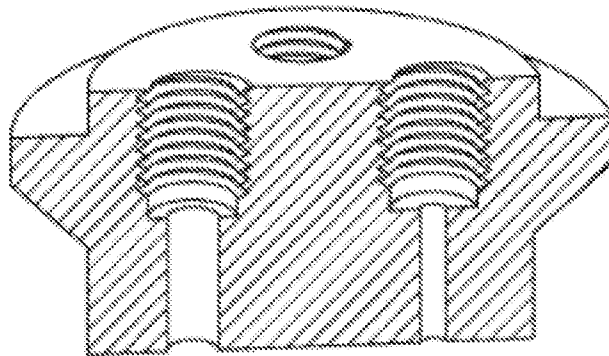


Fig. 7