

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202090006 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.05.18(51) Int. Cl. C07H 1/00 (2006.01)  
C07H 21/04 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2018.07.09

## (54) УЛУЧШЕННЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИМЕТЬЕЛСТАТА

(31) 17180426.3

(32) 2017.07.10

(33) EP

(86) PCT/EP2018/068485

(87) WO 2019/011829 2019.01.17

(71) Заявитель:  
ДЖЕРОН КОРПОРЕЙШН (US)

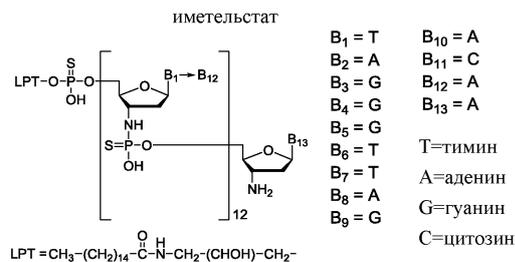
(72) Изобретатель:

Муслехиддиноглу Жале, Гала Динеш,  
Альбанезе-Уокер Дженифер Элизабет  
(BE)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу получения ингибитора теломеразы иметельстата с применением способа, содержащего 3 стадии в цикле, на твердофазном носителе, включающего стадии снятия защиты с 3'-аминогруппы связанного с носителем олигонуклеотида, связывания с 5'-фосфорамидитом и сульфуризации ацилдисульфидом, характеризующегося отсутствием дополнительной стадии кэпирования в каждом цикле, которую применяют для предотвращения реакции непрореагировавших 3'-аминоолигонуклеотидных групп во время последующих циклов. Иметельстат имеет формулу, представленную ниже.



A1

202090006

202090006

A1

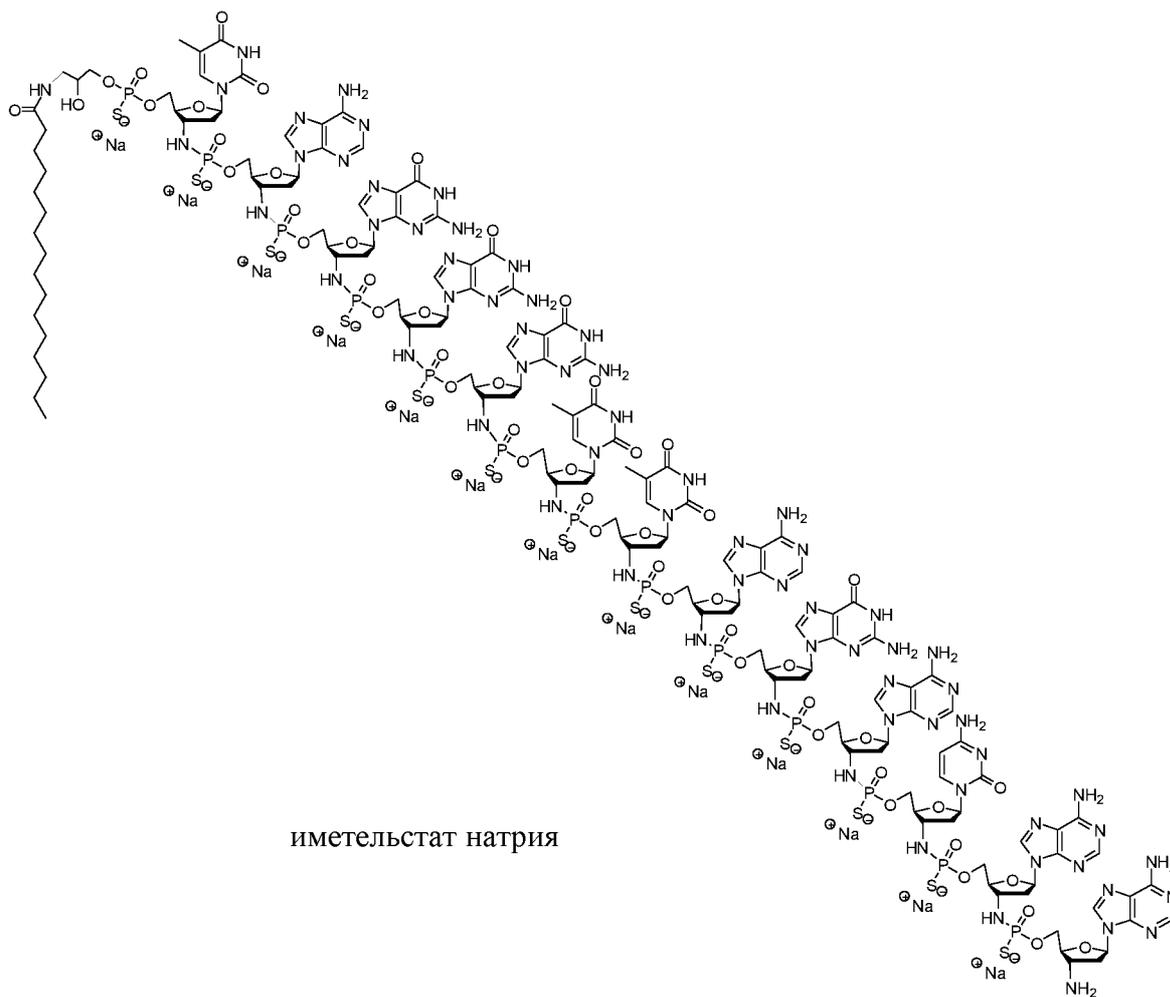
## УЛУЧШЕННЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИМЕТЕЛЬСТАТА

Настоящее изобретение относится к способу получения ингибитора теломеразы иметельстата с применением способа, содержащего 3 стадии в цикле, на твердофазном носителе, включающего стадии снятия защиты с 3'-аминогруппы связанного с носителем олигонуклеотида, связывания с 5'-фосфорамидитом и сульфуризации ацилдисульфидом, характеризующегося отсутствием дополнительной стадии кэппирования в каждом цикле, которую применяют для предотвращения взаимодействия непрореагировавших 3'-аминоолигонуклеотидных групп во время последующих циклов.

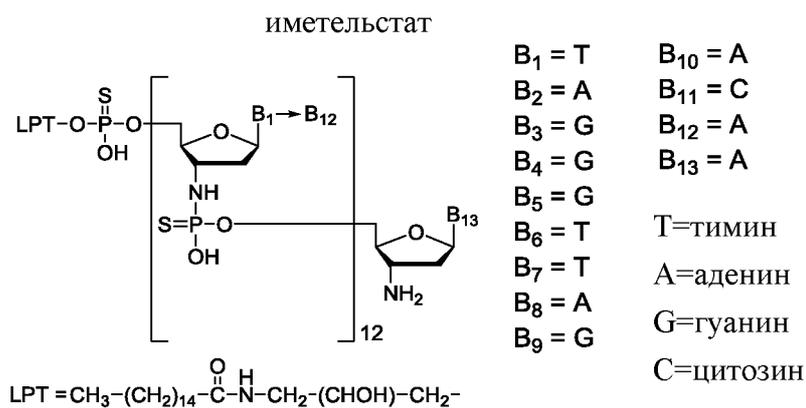
### Уровень техники

Иметельстат (SEQ ID №: 1) представляет собой N3'→P5' тиофосфорамидат олигонуклеотида, ковалентно связанный с пальмитоиллипидным остатком, и был описан в WO-2005/023994 как соединение (1F). Натриевая соль иметельстата действует как активный и специфический ингибитор теломеразы и может быть использована для лечения опосредованных теломеразой расстройств, например, рака, включая такие расстройства, как миелофиброз (MF), миелодиспластические синдромы (MDS) и острый миелогенный лейкоз (AML).

Структура иметельстата натрия показана ниже:



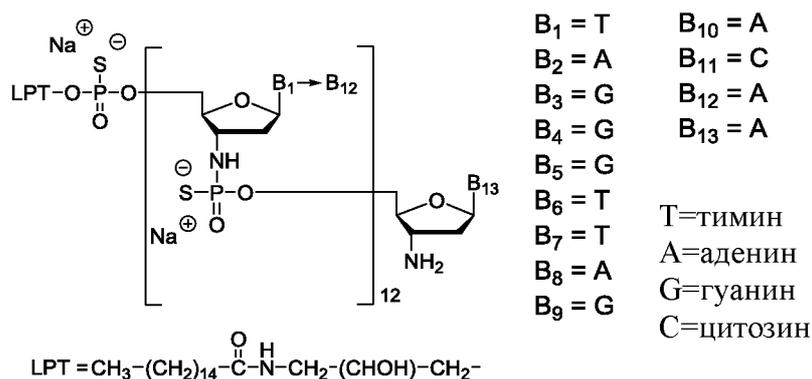
Структура иметельстата также может быть представлена, как показано ниже



Группа LPT представляет собой пальмитоиллипид, который ковалентно связан с N3'→P5' тиофосфорамидатом олигонуклеотида. Последовательность оснований из тринадцати нуклеотидов представляет собой следующую: TAGGGTTAGACAA и представлена основаниями от B<sub>1</sub> до B<sub>13</sub>. Группы -NH-P(=S)(OH)- и -O-P(=S)(OH)- указанной структуры

могут находиться в форме соли. Следует понимать, что солевые формы соединения согласно настоящему изобретению охватываются структурами, изображенными в настоящем документе, даже если это не указано конкретным образом.

Иметельстат натрия также можно представить следующим образом:

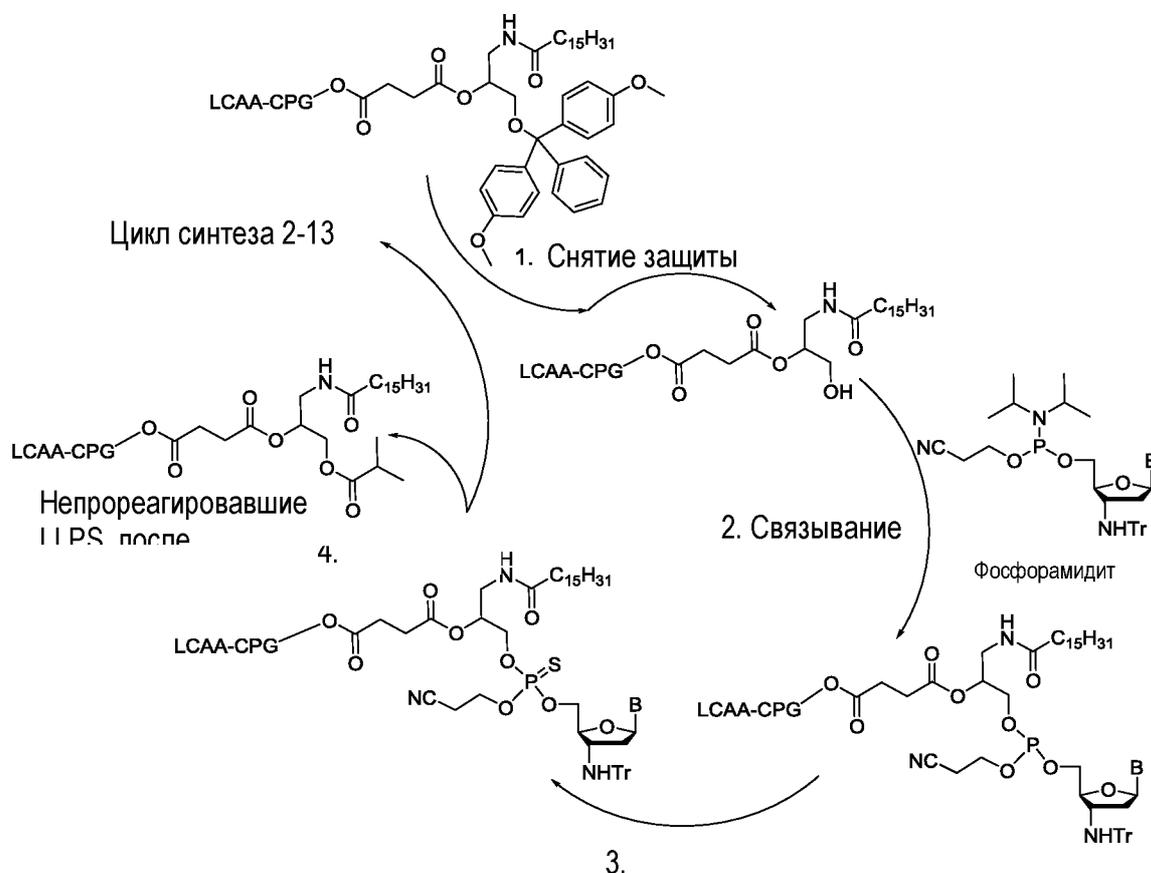


Группа  $-NH-P(=S)(OH)-$  и тиминовые, адениновые, гуаниновые и цитозиновые основания могут встречаться в других таутомерных конфигурациях, которые далее использованы в фигурах настоящего описания. Следует понимать, что все таутомерные формы рассматриваемого соединения охватываются структурой, в которой описана одна возможная таутомерная форма соединения, даже если она не указана конкретным образом.

### Уровень техники

Схема синтеза, используемая в WO-2005/023994 для получения иметельстата в форме соединения (1F), описана на схеме 1 и схеме 2. Синтез этого олигонуклеотида осуществляют с применением твердофазной фосфорамидитной методологии, в которой все реакции происходят на твердофазном носителе. Синтез иметельстата проводят на стекле с контролируемым размером пор (LCAA-CPG), загруженном 3-пальмитоиламидо-1-*O*-(4,4-диметокситритил)-2-*O*-сукцинилпропандиолом. Олигонуклеотид собирают от 5' к 3' концу путем добавления защищенных нуклеозид-5'-фосфорамидитов с помощью активатора. Каждый цикл элонгации состоит из 4 отдельных строго контролируемых стадий: снятие защиты, связывание амидита, сульфуризация и стадия кэппирования.

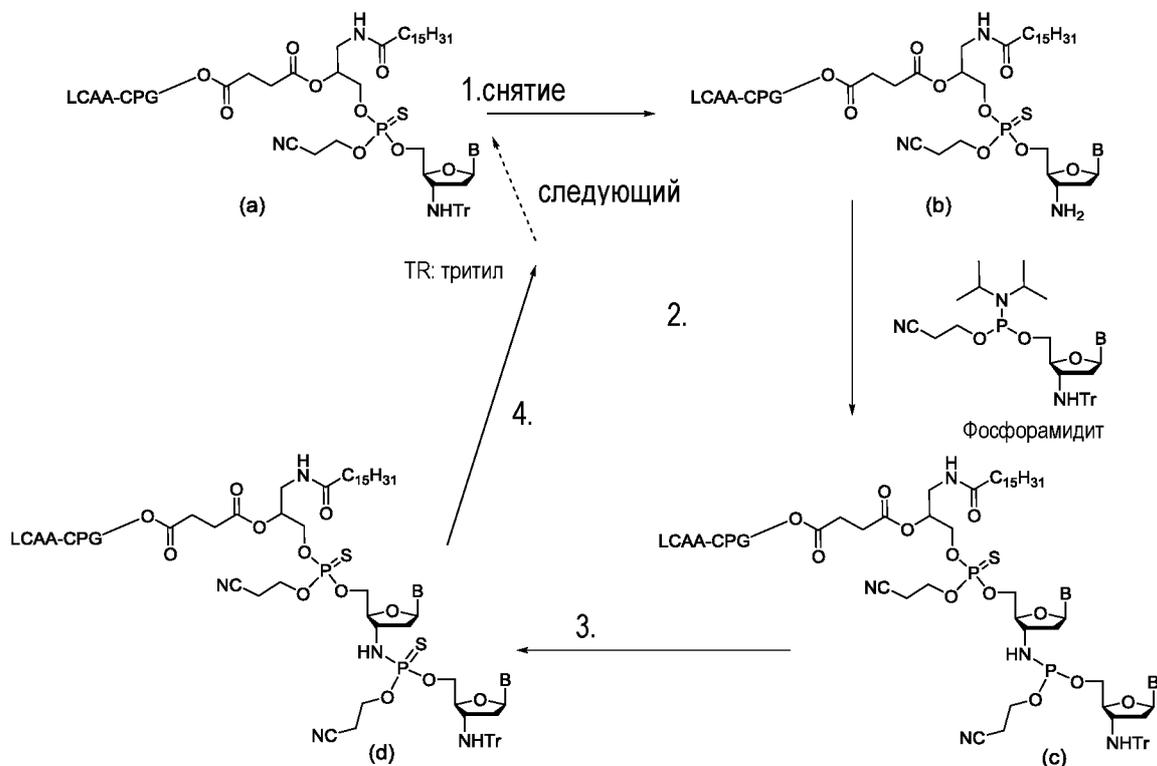
Схема 1: схема цикла 1 синтеза иметельстата



На схеме 1 синтез на твердофазном носителе начинают с удаления кислотолабильной 4,4-диметокси-тримил (DMT) защитной группы из пальмитоиламидопропандиола, связанного с твердофазным носителем. Фосфорамидит первого нуклеотида соединяют с носителем с последующей сульфуризацией фосфора с применением 0,1 М раствора фенилацетилдисульфида (PADS) в смеси ацетонитрила и 2,6-лутидина (соотношение 1:1). Затем применяют стадию кэппирования для предотвращения связывания любого непрореагировавшего исходного материала на твердофазном носителе с фосфорамидитом нуклеотида в следующих циклах реакции. Кэппирование осуществляют с применением смеси 18:1:1 ТГФ / изомасляный ангидрид / 2,6-лутидин.

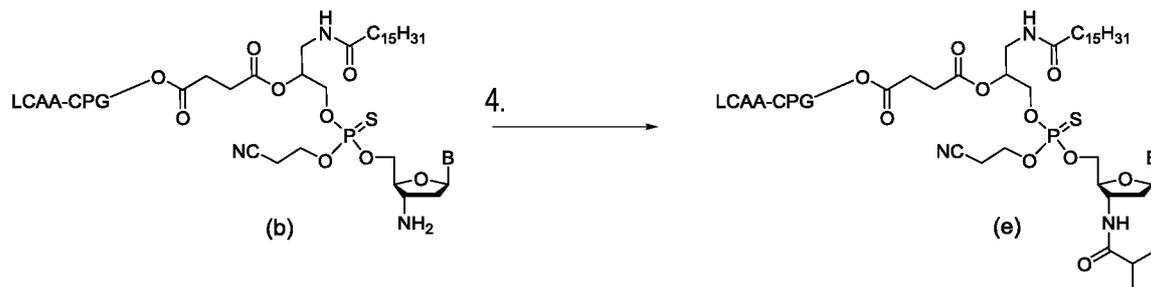
После первого цикла на твердофазном носителе элонгацию цепи осуществляют путем проведения реакции 3'-аминогруппы связанного с носителем олигонуклеотида с избытком раствора защищенного нуклеотидного фосфорамидитного мономера, соответствующего следующему необходимому нуклеотиду в последовательности, как показано на схеме 2.

Схема 2: схема цикла 2-13 синтеза иметельстата



На схеме 2 показан первый цикл процесса элонгации цепи, который осуществляют посредством снятия защиты с 3'-аминогруппы связанного с носителем олигонуклеотида (а) с последующей реакцией связывания 3'-аминогруппы связанного с носителем олигонуклеотида (b) с избытком раствора 5'-фосфорамидитного мономера, соответствующего следующему необходимому нуклеотиду в последовательности иметельстата. За реакцией связывания следует сульфуризация фосфора связанного с носителем олигонуклеотида (с) и стадия кэппирования (см. схему 3) для предотвращения связывания любого непрореагировавшего исходного материала на твердофазном носителе (b) с 5'-фосфорамидитом нуклеотида в следующих циклах реакции. Цикл реакции по схеме 2 повторяют 12 раз перед обработкой связанного с твердофазным носителем олигонуклеотида смесью 1:1 этанола и концентрированного аммиака с последующей очисткой посредством ВЭЖХ с получением иметельстата.

Схема 3



Стадию кэппирования с применением смеси 18:1:1 ТГФ / изомасляный ангидрид / 2,6-лутидин проводят для превращения любого оставшегося после стадии связывания олигонуклеотида (b), связанного с твердофазным носителем, с первичной 3'-аминогруппой в олигонуклеотид (e) с защищенной (или «кэппированной») 3'-аминогруппой для предотвращения связывания первичной 3'-аминогруппы с фосфорамидитом нуклеотида в следующих циклах реакции.

В WO-01/18015 в примере 3 с SEQ ID №: 2 раскрыт N3'→P5' тиофосфoramидат олигонуклеотида и способ получения этого олигонуклеотида, включающий стадию кэппирования.

Herbert B-S et al. раскрывает липидную модификацию GRN163 (Oncogene (2005) 24, 5262-5268).

Makiko Horie et al. раскрывает синтез и свойства олигонуклеотидов, содержащих нуклеиновые кислоты с 2'-O,4'-C-этиленовой мостиковой связью, направленных на субъединицу РНК теломеразы человека (Nucleic Acids Symposium Series (2005) 49, 171-172).

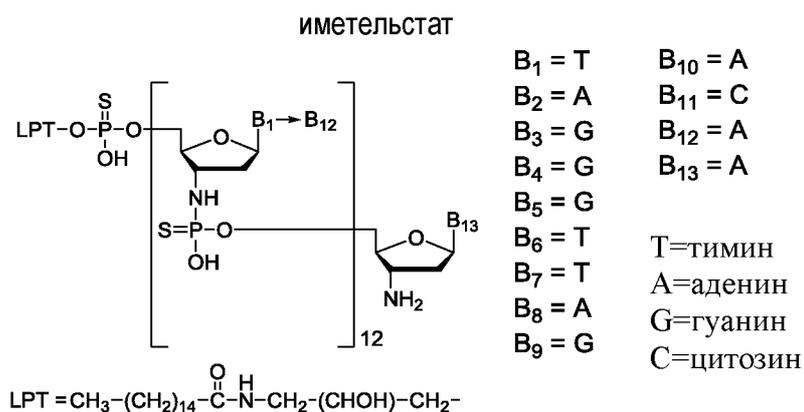
### Описание изобретения

Реакция связывания в способе на твердофазном носителе, раскрытом в WO-01/18015 и WO-2005/023994, включает стадию кэппирования для предотвращения реакции любых непрореагировавших первичных 3'-аминогрупп на связанном с носителем олигонуклеотиде во время последующих циклов.

В настоящее время неожиданно было обнаружено, что применение стадии кэппирования, как описано в предшествующем уровне техники, является излишним, и что иметельстат можно получать с применением 3-стадийного цикла без дополнительной стадии кэппирования с почти идентичным выходом и чистотой по сравнению с 4-стадийным циклом из предшествующего уровня техники, в котором применяют указанную стадию кэппирования. Исключение стадии кэппирования в каждом цикле является эффективным для способа в целом за счет уменьшения количества стадий цикла на 22% (с 54 до 42 стадий) и, как следствие, сокращения времени осуществления способа. Кроме того, благодаря сокращению циклов, расход растворителя уменьшается, что делает процесс более экологичным.

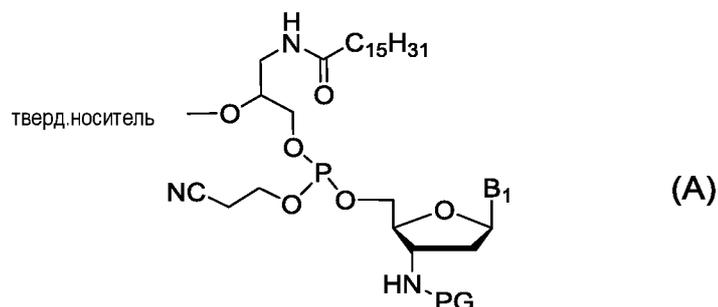
В настоящем документе, где используется термин «стадия кэппирования», он определяет дополнительную стадию химического процесса, в которой первичная свободная 3'-аминогруппа на связанном с твердофазным носителем олигонуклеотиде превращается в замещенную вторичную или третичную 3'-аминогруппу, которая не способна участвовать в реакции связывания с защищенным 3'-аминонуклеозид-5'-О-цианоэтил-N,N-диизопропиламинофосфорамидитным мономером на последующей стадии связывания.

В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу синтеза N3'→P5' тиофосфорамидата олигонуклеотида формулы

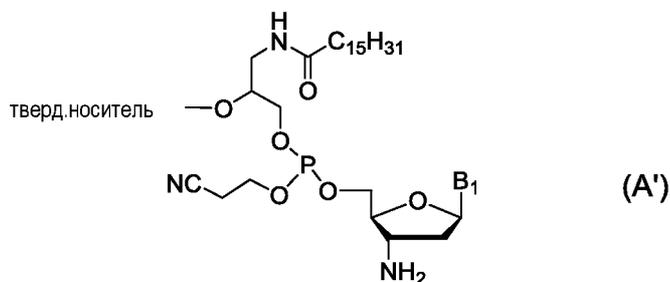


при этом способ включает

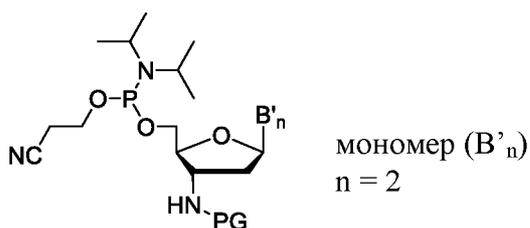
- а) обеспечение первого 3'-аминозащищенного нуклеотида, присоединенного к твердофазному носителю формулы (A), где PG представляет собой кислотолабильную защитную группу;



b) снятие защиты с защищенной 3'-аминогруппы с образованием свободной 3'-аминогруппы;



с) взаимодействие свободной 3'-аминогруппы с защищенным 3'-аминонуклеозид-5'-О-цианоэтил-N,N-диизопропиламинофосфорамидитным мономером формулы (B'<sub>n</sub>), где n = 2 для получения межнуклеозидной N3'→P5'-фосфорамидитной связи;



d) сульфуризацию межнуклеозидной фосфорамидитной группы с применением ацилдисульфида с образованием N3'→P5' тиофосфорамидата;

e) последовательное повторение 11 раз стадии снятия защиты b), стадии связывания с) с защищенным 3'-аминонуклеозид-5'-О-цианоэтил-N,N-диизопропиламинофосфорамидитным мономером формулы (B'<sub>n</sub>), где защищенное нуклеозидное основание B' в мономере (B'<sub>n</sub>) представляет собой последовательно защищенное

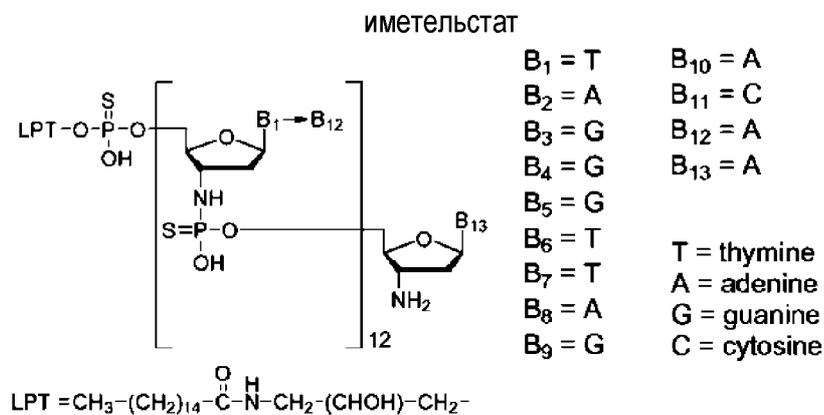
нуклеосооснование от  $B_3$  до  $B_{13}$  в соответствующих 11 стадиях связывания, и стадии сульфуризации d);

f) удаление кислотолабильной защитной группы PG; и

g) отщепление от твердофазного носителя и снятие защиты с иметельстата;

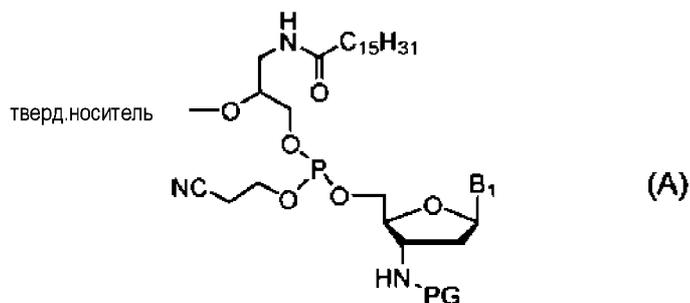
где на любой из стадий реакции a) - e) дополнительную стадию кэппирования не проводят.

В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу синтеза  $N3' \rightarrow P5'$  тиофосфорамидата олигонуклеотида иметельстата формулы

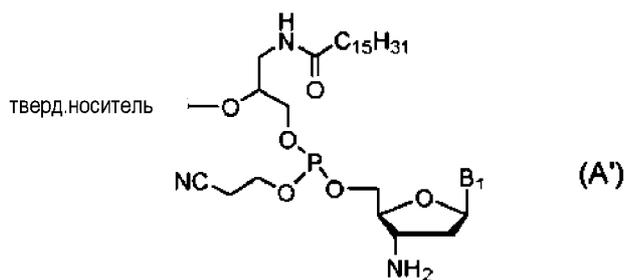


при этом способ включает

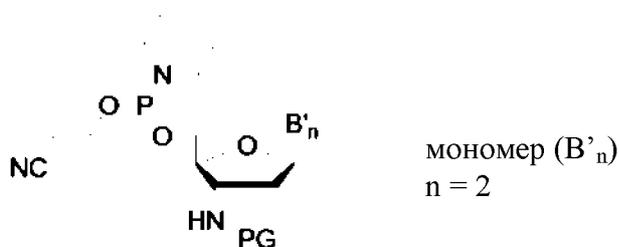
a) обеспечение первого 3'-аминозащищенного нуклеотида, присоединенного к твердофазному носителю формулы (A), где PG представляет собой кислотолабильную защитную группу;



b) снятие защиты с защищенной 3'-аминогруппы с образованием свободной 3'-аминогруппы;



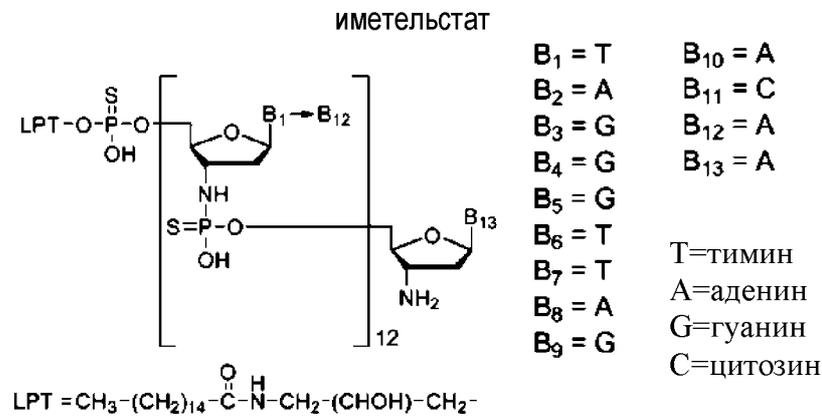
- с) взаимодействие свободной 3'-аминогруппы с защищенным 3'-аминонуклеозид-5'-О-цианоэтил-N,N-диизопропиламинофосфорамидитным мономером формулы ( $B'_n$ ), где  $B'_n$  с  $n = 2$  представляет собой защищенное А, для получения межнуклеозидной  $N3' \rightarrow P5'$ -фосфорамидитной связи;



- d) сульфуризацию межнуклеозидной фосфорамидитной группы с применением ацилдисульфида с образованием  $N3' \rightarrow P5'$  тиофосфорамидата;
- e) последовательное повторение 11 раз стадии снятия защиты b), стадии связывания с) с защищенным 3'-аминонуклеозид-5'-О-цианоэтил-N,N-диизопропиламинофосфорамидитным мономером формулы ( $B'_n$ ), где нуклеозидное основание  $B'$  в мономере ( $B'_n$ ) представляет собой защищенное В, за исключением случая, когда В представляет собой тимин, и где  $B_n$  представляет собой следующее нуклеобазное от  $B_3$  до  $B_{13}$  в соответствующих 11 стадиях связывания, и стадии сульфуризации d);
- f) удаление кислотлабильной защитной группы PG; и
- g) снятие защиты и отщепление иметельстата от твердофазного носителя;

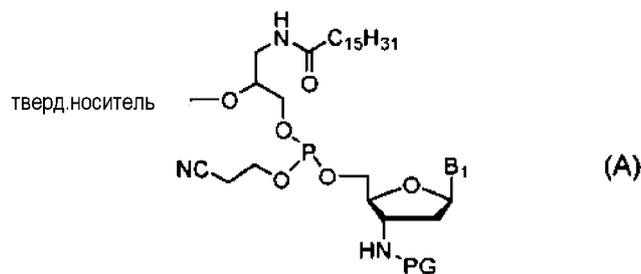
где на любой из стадий реакции а) - е) дополнительную стадию кэппирования не проводят.

В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу синтеза N3'→P5' тиофосфорида олигонуклеотида иметельстата формулы

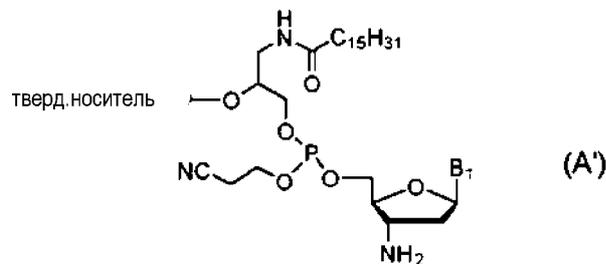


при этом способ включает

- а) обеспечение первого 3'-аминозащищенного нуклеотида, присоединенного к твердофазному носителю формулы (A), где PG представляет собой кислотолабильную защитную группу;

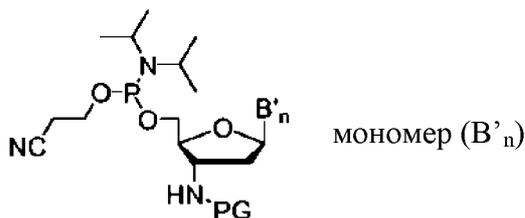


- б) снятие защиты с PG-защищенного 3'-аминонуклеотида с образованием свободного 3'-аминонуклеотида формулы (A');



- с) взаимодействие свободного 3'-аминонуклеотида с защищенным 3'-аминонуклеозид-5'-О-цианоэтил-N,N-диизопропиламинофосфорамидитным

мономером ( $B'_n$ ), где  $B'_n$  с  $n = 2$  представляет собой защищенное А, для получения межнуклеозидной  $N3' \rightarrow P5'$ -фосфорамидитной связи;



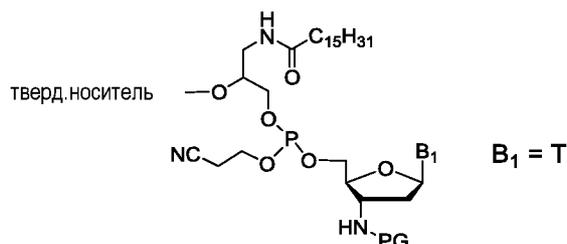
- d) сульфуризацию  $N3' \rightarrow P5'$ -фосфорамидитной связи с применением ацилдисульфида с образованием межнуклеозидной  $N3' \rightarrow P5'$ -тиофосфорамидатной связи;
- e) последовательное повторение 11 раз:  
 стадии снятия защиты b),  
 стадии связывания c) с защищенным 3'-аминонуклеозид-5'-О-цианоэтил-N,N-диизопропиламино-фосфорамидитным мономером ( $B'_n$ ), где нуклеозидное основание В' в мономере ( $B'_n$ ) представляет собой защищенное В, за исключением случая, когда В представляет собой тимин, и где  $B_n$  представляет собой следующее нуклеос основание от  $B_3$  до  $B_{13}$  в соответствующих 11 стадиях связывания, и  
 стадии сульфуризации d);  
 с получением защищенного  $N3' \rightarrow P5'$  тиофосфорамидата олигонуклеотида иметельстата, присоединенного к твердофазному носителю;
- f) удаление 3'-концевой кислотолабильной защитной группы PG с защищенного  $N3' \rightarrow P5'$  тиофосфорамидата олигонуклеотида иметельстата; и
- g) снятие защиты и отщепление защищенного  $N3' \rightarrow P5'$  тиофосфорамидата олигонуклеотида иметельстата от твердофазного носителя с получением иметельстата;

где на любой из стадий реакции а) - е) дополнительную стадию кэппирования не проводят.

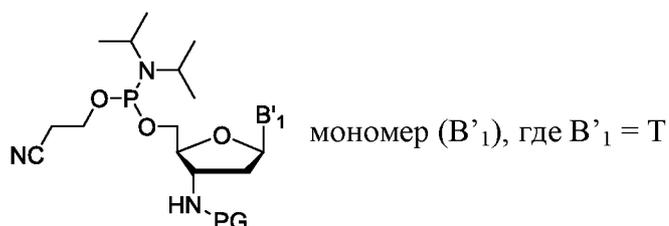
Согласно настоящему изобретению можно применять широкое разнообразие твердофазных носителей, включая, но не ограничиваясь ими, такие как микрочастицы, изготовленные из стекла с контролируемым размером пор (CPG), полистирола с высокой степенью поперечной сшивки, гибридного стекла с контролируемым размером пор,

загруженного поперечно-сшитым полистирольным носителем, акриловые сополимеры, целлюлозу, нейлон, декстран, латекс, полиакролеин и тому подобное.

3'-аминозащищенный нуклеотид, присоединенный к твердофазному носителю формулы (A)



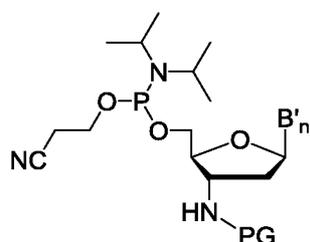
может быть получен, как описано в WO-2005/023994, где осуществляли связывание носителя из стекла с контролируемым размером пор, загруженного 3-пальмитоиламидо-1-*O*-(4,4-диметокситритил)-2-*O*-сукцинилпропандиолом, с защищенным 3'-аминонуклеозид-5'-*O*-цианоэтил-*N,N*-диизопропиламинофосфорамидитным мономером формулы (B'<sub>1</sub>)



где PG представляет собой кислотолабильную защитную группу. Подходящие кислотолабильные 3'-аминозащитные группы PG представляют собой, но не ограничиваются ими, например, трифенилметил (*m.e.* тритил или Tr), *p*-анизилдифенилметил (*m.e.* монометокситритил или MMT) и ди-*p*-анизилдифенилметил (*m.e.* диметокситритил или DMT).

Защищенные 3'-аминонуклеозид-5'-*O*-цианоэтил-*N,N*-диизопропиламинофосфорамидитные мономеры формулы (B'<sub>n</sub>) имеют 3'-аминозащитную группу PG, которая представляет собой кислотолабильную группу, такую как трифенилметил (*m.e.* тритил или Tr), *p*-анизилдифенилметил (*m.e.* монометокситритил или

ММТ) или ди-п-анизилфенилметил (*m.e.* диметокситритил или DMT). Кроме того, нуклеозидное основание  $B'$  защищено лабильной к основаниям защитной группой (кроме тимина).



$B'_1 = T$	$B'_{10} =$ защищенный
$B'_2 =$ защищенный AA	
$B'_3 =$ защищенный G	$B'_{11} =$ защищенный C
$B'_4 =$ защищенный G	$B'_{12} =$ защищенный G
$B'_5 =$ защищенный G	T=тимин
$B'_6 = T$	A=аденин
	G=гуанин
	C=цитозин

Нуклеотидные мономеры  $B'_1$  и от  $B'_2$  до  $B'_{13}$  используют последовательно на 13 стадиях связывания, начиная с обеспечения твердофазного носителя, загруженного 3-пальмитоиламидо-1-*O*-(4, 4''-диметокситритил)-2-*O*-сукцинил пропандиолом, и связывания с нуклеотидным мономером  $B'_1$ , и применяют следующий цикл 12 снятия защиты, реакции связывания и сульфуризации, в которых применяют нуклеотидные мономеры от  $B'_2$  до  $B'_{13}$ .

3'-аминозащитную группу PG можно удалить обработкой кислотным раствором, таким как, например, дихлоруксусная кислота в дихлорметане или толуоле.

Нуклеозидное основание  $B'$  в защищенных 3'-аминонуклеозид-5'-*O*-цианоэтил-N,N-диизопропиламинофосфорамидитных мономерах формулы ( $B'_n$ ) защищено лабильной к основаниям защитной группой, которую удаляют на стадии g). Подходящими лабильными к основаниям защитными группами для аденинового, цитозинового или гуанинового нуклеозидного основания являются, например, ацильные группы, такие как ацетил, бензоил, изобутирил, диметилформаминадил или дибензилформаминадил. В условиях реакции, применяемых в синтезе олигонуклеотидов, тиминное нуклеозидное основание не требует защиты. Такие защищенные 3'-аминонуклеозид-5'-*O*-цианоэтил-N,N-диизопропиламинофосфорамидитные мономеры формулы ( $B'_n$ ), имеющие 3'-аминозащитную кислотолабильную группу, защитную группу PG и нуклеозидное основание  $B'$ , защищенное лабильной к основаниям защитной группой, являются коммерчески доступными или могут быть получены, как описано в WO-2006/014387.

Стадию связывания с) осуществляют путем добавления раствора защищенного 3'-аминонуклеозид-5'-О-цианоэтил-N,N-диизопропиламинофосфорамидитного мономера формулы (B<sub>n</sub>) и раствора активатора (или раствор, содержащий фосфорамидитный мономер (B<sub>n</sub>) и активатор) в реакционный сосуд, содержащий свободную аминогруппу (олиго)нуклеотида, ковалентно присоединенного к твердому носителю. Затем смесь перемешивают такими методами, как механическое встряхивание, барботаж инертного газа и т. д. В качестве альтернативы, раствор(ы) мономера и активатора могут протекать через реакционный сосуд (или колонку), содержащий (олиго)нуклеотид со свободной 3'-аминогруппой, нанесенный на твердую фазу. Мономер и активатор могут быть либо предварительно смешаны, смешаны в клапанном блоке подходящей установки для синтеза, смешаны в сосуде для предварительной активации и предварительно выдержаны при необходимости, либо они могут быть добавлены в реакционный сосуд по отдельности.

Примеры активаторов для применения в настоящем изобретении представляют собой, но не ограничиваются ими, тетразол, 5-(этилтио)-1H-тетразол, 5-(4-нитрофенил)тетразол, 5-(2-тиенил)-1H-тетразол, триазол, пиридиний хлорид и тому подобное. Подходящими растворителями являются ацетонитрил, тетрагидрофуран, дихлорметан и тому подобное. На практике ацетонитрил является широко используемым растворителем для синтеза олигонуклеотидов.

Агент сульфуризации для применения на стадии d) представляет собой ацилдисульфид, растворенный в растворителе. Ацилдисульфиды, известные в данной области техники, представляют собой, например, дибензоилдисульфид, бис(фенилацетил) дисульфид (PADS), бис(4-метоксибензоил) дисульфид, бис(4-метилбензоил) дисульфид, бис(4-нитробензоил) дисульфид и бис(4-хлорбензоил) дисульфид.

Фенилацетилдисульфид (PADS) представляет собой широко используемый агент для реакций сульфуризации, который наилучшим образом следует «выдерживать» в основном растворе для достижения оптимальной активности сульфуризации (Scotson J.L. et al., *Org. Biomol. Chem.*, vol. 14, 10840 - 10847, 2016). Подходящим растворителем для PADS является, например, смесь основного растворителя, такого как, например, 3-пиколин или

2,6-лутидин, с соразводителем, таким как ацетонитрил, толуол, 1-метилпирролидинон или тетрагидрофуран. Соотношение количества основного растворителя к количеству соразвителя может представлять собой любое соотношение, включая соотношение 1:1. В зависимости от превращения фосфитного эфира в соответствующий тиофосфат можно применять как «свежие», так и «выдержанные» PADS, однако было показано, что «выдержанные» PADS улучшают скорость и эффективность сульфуризации. «Выдержанные» растворы PADS представляют собой свежеприготовленные растворы PADS, которые выдерживали в течение некоторого времени перед применением в реакции сульфуризации. Время выдерживания может варьироваться от нескольких часов до 48 часов, и специалист в данной области техники может определить оптимальное время выдерживания посредством анализа выхода и чистоты реакции сульфуризации.

Для получения иметельстата в соответствии с настоящим изобретением применяют раствор PADS в смеси ацетонитрила и 2,6-лутидина, предпочтительно в соотношении 1:1, со временем выдерживания от 4 до 14 часов. Обнаружено, что при применении 2,6-лутидина предельное количество 2,3,5-коллидина (который обычно обнаруживают в качестве примеси в 2,6-лутидине) ниже 0,1 % улучшает эффективность сульфуризации, и наблюдают меньшее количество нежелательного окисления фосфора.

На стадии g) с иметельстата снимают защиту и отщепляют от твердофазного носителя. Снятие защиты включает удаление  $\beta$ -цианоэтильных групп и лабильных к основаниям защитных групп на нуклеотидных основаниях. Это можно осуществлять посредством обработки основного раствора, такого как раствор диэтиламина (DEA) в ацетонитриле, с последующей обработкой водным раствором аммиака, растворенного в спирте, таком как этанол.

Стадии реакции a) -f) настоящего изобретения проводят в интервале температур от 10 °C до 40 °C. Более предпочтительно, эти реакции проводят при контролируемой температуре в диапазоне от 15 °C до 30 °C. В частности, стадию реакции b) в настоящем изобретении проводят при контролируемой температуре в диапазоне от 15 °C до 30 °C.; более конкретно от 17 °C до 27°C. В частности, стадию реакции d) в настоящем изобретении проводят в диапазоне температур от 17 °C до 27°C; более конкретно от 18 °C до 22°C; еще более конкретно 19 °C. Стадию g), в которой снимают защиту с иметельстата

и отщепляют от твердофазного носителя, проводят при температуре в диапазоне от 30 °С до 60 °С. В зависимости от оборудования и конкретных используемых условий реакции специалист в данной области техники может определить оптимальную температуру реакции для каждой стадии а) -g) в указанных выше пределах.

После каждой стадии цикла элонгации твердофазный носитель промывают растворителем, например, ацетонитрилом, для подготовки к следующей реакции.

После стадии g) получают неочищенный иметельстат в форме его соли аммония, который затем очищают препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографией с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ) с применением смол на основе полимеров или диоксида кремния для получения очищенного иметельстата в триэтиламиновой форме. Добавляют избыток натриевой соли, а затем раствор обессоливают путем диафильтрации, таким образом получая иметельстат натрия, который затем лиофилизируют для удаления воды.

### **Экспериментальная часть**

«Комнатная температура» или «температура окружающей среды» обычно составляет 21-25 °С.

#### **Эксперимент 1 (без стадии кэппирования)**

Готовили все реагенты и растворы исходного материала, включая 3% раствор дихлоруксусной кислоты (DCA) в толуоле, 0,5 М раствор 5-(этилтио) -1Н-тетразола в ацетонитриле, 0,15 М раствор всех 4 нуклеотидных мономеров формулы (B'<sub>n</sub>) в ацетонитриле, 0,2 М раствор фенилацетилдисульфида (PADS) в смеси 1:1 ацетонитрила и 2,6-лутидина и 20% DEA (диэтиламин) в ацетонитриле.

нуклеотидный мономер формулы (B' <sub>n</sub> )	Структура
--	-----------

нуклеотидный мономер формулы (B' <sub>n</sub> )	Структура
B' <sub>1</sub> , B' <sub>6</sub> , B' <sub>7</sub>	
B' <sub>2</sub> , B' <sub>8</sub> , B' <sub>10</sub> , B' <sub>12</sub> , B' <sub>13</sub>	
B' <sub>3</sub> , B' <sub>4</sub> , B' <sub>5</sub> , B' <sub>9</sub>	
B' <sub>11</sub>	

Синтез олигонуклеотидов осуществляли в направлении от 5' к 3' с применением повторяющегося цикла синтеза, состоящего из детритилирования с последующим связыванием и сульфуризацией, проводимыми при температуре окружающей среды.

Колонку (диаметр: 3,5 см) заполняли твердым носителем, загруженным 3-пальмитоиламидо-1-*O*- (4,4-диметокситритил)-2-*O*- сукцинилпропандиолом (3,5 ммоль в расчете на емкость, составляющую 400 мкмоль/г), который вступал в реакцию связывания с нуклеотидным мономером  $B'_1$ . Детритилирование осуществляли с применением 3% дихлоруксусной кислоты (DCA) в толуоле (количество составляет от 6,5 до 13,4 объемов колонки на каждой стадии детритилирования), и связанный с твердофазным носителем нуклеотид промывали ацетонитрилом (количество: 5 объемов колонки). Связывание следующего нуклеотидного мономера формулы ( $B'_n$ ) осуществляли посредством пропускания раствора 0,5 М 5-(этилтио)-1Н-тетразола в ацетонитриле и 0,15 М раствора следующего в последовательности нуклеотидного мономера формулы ( $B'_n$ ), растворенного в ацетонитриле, через колонку. Колонку промывали ацетонитрилом (количество: 2 объема колонки). Затем проводили сульфуризацию посредством пропускания раствора 0,2 М фенилацетилдисульфида (PADS) в смеси 1:1 ацетонитрила и 2,6-лутидина через колонку с последующей промывкой колонки ацетонитрилом (количество: 5 объемов колонки).

В синтезе цикл детритилирования, связывания со следующим нуклеотидным мономером формулы ( $B'_n$ ) и сульфуризации повторяли 12 раз с последующим детритилированием с применением 3% дихлоруксусной кислоты (DCA) в толуоле (количество составляет от 6,5 до 13,4 объемов колонки).

После завершения цикла синтеза неочищенный олигонуклеотид на твердофазном носителе обрабатывали раствором диэтиламина (DEA) с последующей обработкой раствором гидроксида аммония: этанол (объемное соотношение 3:1) при температуре 55 °С. Реакционную смесь выдерживали в течение 4-24 часов при 55 °С, охлаждали до комнатной температуры, и суспензию фильтровали для удаления полимерного носителя. Раствор, содержащий иметельстат в его аммониевой форме, подвергали процедуре анализа ВЭЖХ согласно эксперименту 3.

### **Эксперимент 2 (со стадией кэппирования)**

Готовили все реагенты и растворы исходного материала, включая 3% раствор дихлоруксусной кислоты (DCA) в толуоле, 0,5 М раствор 5-(этилтио)-1Н-тетразола в ацетонитриле, 0,15 М раствор всех 4 нуклеотидных мономеров формулы ( $B'_n$ ) в ацетонитриле, 0,2 М раствор фенилацетилдисульфида (PADS) в смеси 1:1 ацетонитрила и 2,6-лутидина, 20% раствор N-метилимидазола (NMI) в ацетонитриле в качестве агента кэппирования А, изобутриевый ангидрид в смеси 1:1 ацетонитрила и 2,6-лутидина в качестве агента кэппирования В и 20% DEA в ацетонитриле.

Синтез олигонуклеотидов осуществляли в направлении от 5' к 3' с применением повторяющегося цикла синтеза, состоящего из детритилирования с последующим связыванием и сульфуризацией, проводимыми при температуре окружающей среды.

Колонку (диаметр: 3,5 см) заполняли твердым носителем, загруженным 3-пальмитоиламидо-1-О- (4,4-диметокситритил)-2-О- сукцинилпропандиолом (3,5 ммоль в расчете на емкость, составляющую 400 мкмоль/г), который вступал в реакцию связывания с нуклеотидным мономером  $B'_1$ . Детритилирование осуществляли с применением 3% дихлоруксусной кислоты (DCA) в толуоле (количество составляет от 6,5 до 13,4 объемов колонки на каждой стадии детритилирования), и связанный с твердофазным носителем нуклеотид промывали ацетонитрилом (количество: 5 объемов колонки). Связывание следующего нуклеотидного мономера формулы ( $B'_n$ ) осуществляли посредством пропускания раствора 0,5 М 5-(этилтио)-1Н-тетразола в ацетонитриле и 0,15 М раствора следующего в последовательности нуклеотидного мономера формулы ( $B'_n$ ), растворенного в ацетонитриле, через колонку. Колонку промывали ацетонитрилом (количество: 2 объема колонки). Затем проводили сульфуризацию посредством пропускания раствора 0,2 М фенилацетилдисульфида (PADS) в смеси 1:1 ацетонитрила и 2,6-лутидина через колонку с последующей промывкой колонки ацетонитрилом (количество: 5 объемов колонки).

После сульфуризации проводили стадию кэппирования. В каждом кэппировании в данном цикле применяли 37-47 эквивалентов (экв.) агента кэппирования NMI и 9-11 эквивалентов агента кэппирования В изомасляного ангидрида (IBA) и 1,4-1,8 эквивалента

2,6 лутидина. Агенты кэппирования А и В пропускали через колонку с помощью отдельных насосов при различных соотношениях, таких как 50:50, 35:65, 65:35.

В синтезе цикл детритилирования, связывания со следующим нуклеотидным мономером формулы ( $B'_n$ ) и сульфуризации и стадию кэппирования повторяли 12 раз с последующим детритилированием с применением 3% дихлоруксусной кислоты (DCA) в толуоле (количество составляет от 6,5 до 13,4 объемов колонки).

После завершения цикла синтеза неочищенный олигонуклеотид на твердофазном носителе обрабатывали раствором диэтиламина (DEA) с последующей обработкой раствором гидроксида аммония: этанол (объемное соотношение 3:1) при температуре 55 °С. Реакционную смесь выдерживали в течение 4-24 часов при 55 °С, охлаждали до комнатной температуры, и суспензию фильтровали для удаления полимерного носителя. Раствор, содержащий иметельстат в его аммониевой форме, подвергали процедуре анализа ВЭЖХ согласно эксперименту 3.

### **Эксперимент 3: сравнение отсутствия и наличия кэппирования**

Иметельстат, полученный в эксперименте 1 и эксперименте 2, анализировали с помощью ВЭЖХ. Количество необходимого полноразмерного олигонуклеотида, содержащего 13 нуклеотидов, было определено и указано в таблице ниже для эксперимента 1 и эксперимента 2. Кроме того, общее количество короткого олигонуклеотида, в частности из 12 нуклеотидов, было определено и указано в таблице ниже для эксперимента 1 и эксперимента 2.

Метод анализа ВЭЖХ:

тип колонки: Kromasil C18, размер частиц 3,5 мкм, 4,6 X 150 мм

элюент:

А: 14,4 mM TEA/386 mM HFIP (гексафторизопропанол) / 100 ppm(масс./об.)  $Na_2EDTA$  в воде

В: 50% MeOH, 50% EtOH, содержащий 5% IPA

Градиент:

Стадия	Время анализа	% В
--------	---------------	-----

	(минуты)	
1	0	10
2	5	10
3	12	26 (линейный)
4	35	45 (линейный)
5	40	50 (линейный)
6	42	50
7	44	10 (линейный)
8	50	10

Таблица: эксперименты с применением кэппирования относительно экспериментов без применения кэппирования (эксперимент 1 осуществляли дважды, и результаты приведены в форме экспериментов 1a и 1b).

№ эксперимента	Кэппирование или отсутствие кэппирования	Основной пик, %	Короткий олигонуклеотид (12 нуклеотидов)
1a	без кэппирования	71,6 %	5,5 %
1b	без кэппирования	71,2 %	5,7 %
2	кэппирование	71,3 %	5,6 %

Анализ ВЭЖХ эксперимента 1 и эксперимента 2 демонстрирует, что выход и чистота в эксперименте без кэппирования и в эксперименте с кэппированием являются сравнимыми. Основной пик, %, включает полноразмерный олигонуклеотид + примеси РО + депурированные примеси.

РО примеси представляют собой примеси, включающие одну или более оксофосфорамидатных межнуклеозидных связей вместо тиофосфорамидатных межнуклеозидных связей.

Применение растворителя и время реакции

0,45 л ацетонитрила/ммоль применяли для приготовления реагентов агента кэппирования А и агента кэппирования В, что соответствует приблизительно 25% от общего использованного ацетонитрила во время приготовления реагентов. Поскольку после каждой стадии химической реакции следовала промывка растворителем, после каждой стадии кэппирования также проводили промывку растворителем, что эквивалентно примерно 40 объемам колонки растворителя. Учитывая, что примерно 212 объемов колонки применяли для промывки растворителем для данного цикла синтеза, примерно 19% растворителя для промывки применяли для стадий кэппирования. Каждая стадия кэппирования занимала от 3 до 6 минут. Это соответствует примерно 8% общего времени синтеза, включая 13 циклов и обработку DEA.

Эксперимент 4 (температура детритилирования)

Температура детритилирования оказывает влияние с точки зрения контроля n-1 и депуринированных примесей. Температуру деблокирующего раствора на входе в установку для синтеза выбирали от 17,5 до 27 °С (при шкале 3,5 ммоль), и выбранную температуру удерживали такой же в течение всех стадий детритилирования. При промывке ацетонитрилом также удерживали такую же температуру деблокирующего раствора. % депуринированных примесей увеличивался линейно в зависимости от температуры, в то время как n-1 был выше при более низких температурах.

Температура	n-1, %	Депуринированные примеси, %
17,5	10,7	5,3
19	7,6	6,4
22	5,4	8,7
25	6,1	10,8
27	5,3	12,3

Эксперимент 5 (температура стадии сульфуризации)

В экспериментах ниже исследовали влияние температуры (RT обозначает комнатную температуру) используемого в реакциях сульфуризации раствора PADS на % менее желательных примесей PO (они представляют собой примеси, в которых окисление

фосфора происходит вместо сульфуризации). Более низкие температуры приводят к более низкому % PO.

Температура сульфуризации (°C)	PO, %
RT	7,2
RT	8,1
RT	6,9
RT	8,8
19	6,5
19	6,3

**SEQ ID №: 1 - иметельстат и иметельстат натрия**

5'-R-TAGGGTTAGACAA-NH<sub>2</sub>-3'

в которой R представляет собой пальмитоил [(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub>] амид, конъюгированный с помощью аминоклицеринового линкера с 5'-тиофосфатной группой N3'→P5' тиофосфорамидат (NPS)-связанного олигонуклеотида.

Sequence listing.txt

SEQUENCE LISTING

<110> Janssen Pharmaceutica NV

<120> IMPROVED PROCESS FOR PREPARING IMETELSTAT

<130> JAB6114PCT

<150> EP17180426.3

<151> 2017-07-10

<160> 1

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..13

<223> /organism="Artificial Sequence"  
/note="Synthetic oligonucleotide"  
/mol\_type="unassigned DNA"

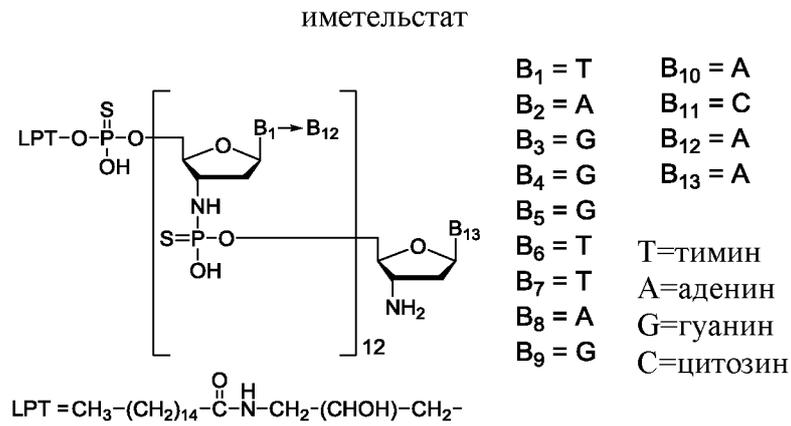
<400> 1

tagggttaga caa

13

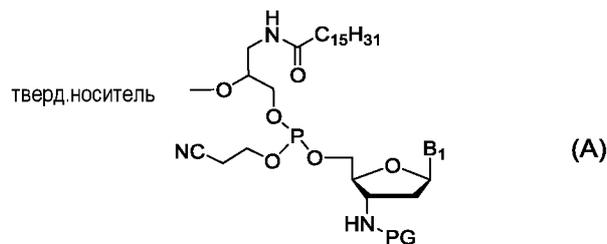
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ синтеза N3'→P5' тиофосфорамидата олигонуклеотида иметельстата формулы

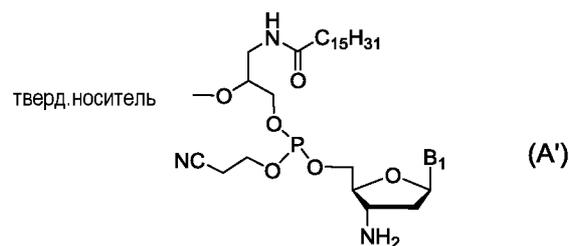


при этом способ включает

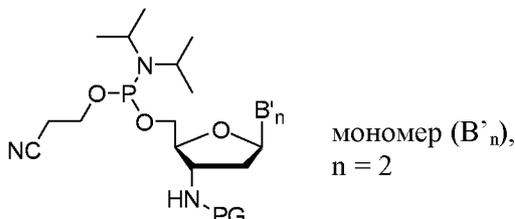
- а) обеспечение первого 3'-аминозащищенного нуклеотида, присоединенного к твердофазному носителю формулы (A), где PG представляет собой кислотолабильную защитную группу;



- б) снятие защиты с защищенной 3'-аминогруппы с образованием свободной 3'-аминогруппы;



- с) взаимодействие свободной 3'-аминогруппы с защищенным 3'-аминонуклеозид-5'-О-цианоэтил-N,N-диизопропиламинофосфорамидитным мономером формулы ( $B'_n$ ), где  $B'_n$  с  $n = 2$  представляет собой защищенное А, для получения межнуклеозидной  $N3' \rightarrow P5'$ -фосфорамидитной связи;



- d) сульфуризацию межнуклеозидной фосфорамидитной группы с применением ацилдисульфида с образованием  $N3' \rightarrow P5'$  тиофосфорамидата;
- e) последовательное повторение 11 раз стадии снятия защиты b), стадии связывания с) с защищенным 3'-аминонуклеозид-5'-О-цианоэтил-N,N-диизопропиламинофосфорамидитным мономером формулы ( $B'_n$ ), где нуклеозидное основание  $B'$  в мономере ( $B'_n$ ) представляет собой защищенное В, за исключением случая, когда В представляет собой тимин, и где  $B_n$  представляет собой следующее нуклеос основание от  $B_3$  до  $B_{13}$  в соответствующих 11 стадиях связывания, и стадии сульфуризации d);
- f) удаление кислотолабильной защитной группы PG; и
- g) снятие защиты и отщепление иметельстата от твердофазного носителя;
- где на любой из стадий реакции а) -е) дополнительную стадию кэппирования не проводят.
2. Способ по п. 1, в котором иметельстат дополнительно превращают в его натриевую соль.
  3. Способ по любому из п. 1 или п. 2, в котором ацилдисульфид выбран из дибензоилдисульфида, бис(фенилацетил) дисульфида (PADS), бис(4-метоксибензоил) дисульфида, бис(4-метилбензоил) дисульфида, бис(4-нитробензоил) дисульфида и бис(4-хлорбензоил) дисульфида.
  4. Способ по п. 3, в котором ацилдисульфид представляет собой PADS.

5. Способ по п. 4, в котором PADS растворяют в смеси из 3-пиколина или 2,6-лутидина с соразтворителем, выбранным из ацетонитрила, толуола, 1-метилпирролидинона и тетрагидрофурана.
6. Способ по п. 5, в котором PADS растворяют в смеси 2,6-лутидина с ацетонитрилом.
7. Способ по п. 6, в котором раствор PADS выдерживают от 4 до 14 часов перед применением.
8. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором кислотолабильная группа PG выбрана из трифенилметила, п-анизилдифенилметила и ди-п-анизилфенилметила.
9. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором кислотолабильную защитную группу PG удаляют путем обработки кислотным раствором.
10. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором лабильная к основаниям защитная группа аденинового, цитозинового и гуанинового оснований в мономере формулы (В'п) выбрана из ацетила, бензоила, изобутирила, диметилформамидинила и дибензилформамидинила.
11. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что стадию связывания с) осуществляют с применением активатора, выбранного из тетразола, 5-(этилтио)-1Н-тетразола, 5-(4-нитрофенил)тетразола, 5-(2-тиенил)-1Н-тетразола, триазола и хлорида пиридиния.
12. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором стадию г) осуществляют путем обработки основным раствором.
13. Способ по п. 12, в котором основной раствор представляет собой диэтиламин, растворенный в ацетонитриле, или водный раствор аммиака, растворенный в спирте, или комбинацию обоих.