

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 437**

51 Int. Cl.:

C07H 1/00	(2006.01)
C07H 15/08	(2006.01)
C07H 21/02	(2006.01)
C07C 67/11	(2006.01)
C07C 271/22	(2006.01)
C07C 269/06	(2006.01)
C07C 245/20	(2006.01)
C07C 51/41	(2006.01)
A61K 47/54	(2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2016 PCT/EP2016/068361**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2017 WO17021385**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2016 E 16745745 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 3331892**

54 Título: **Procedimientos para la preparación de derivados ácidos de GaINAc**

30 Prioridad:

06.08.2015 EP 15180058

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

25.02.2020

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**LILL, JOERG y
TRUSSARDI, RENÉ**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

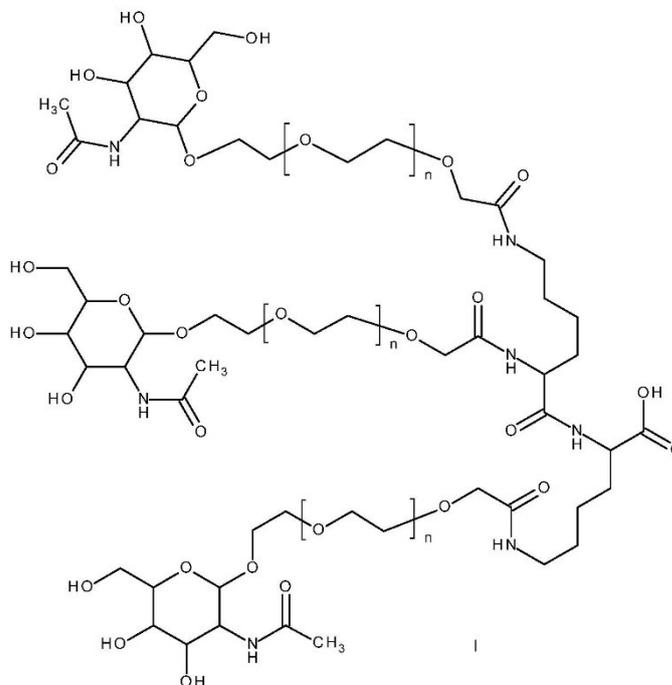
ES 2 744 437 T3

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

Procedimientos para la preparación de derivados ácidos de GalNAc

5 La invención se refiere a un nuevo procedimiento para la preparación de derivados de GalNAc de fórmula I



10 en la que n es un número entero entre 0 y 10 y sus sales, sus enantiómeros correspondientes y/o los isómeros ópticos de los mismos.

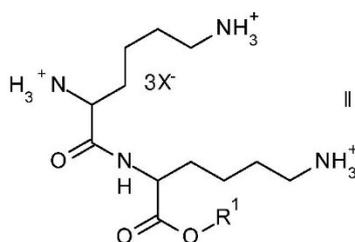
15 Los derivados de GalNAc de fórmula I son normalmente el resto dirigido de conjugados que comprenden el resto GalNAc y determinados oligonucleótidos. El resto GalNAc, debido a su afinidad por el receptor asialoglucoproteico que se localiza en la célula hepática, permite el suministro funcional de conjugados de oligonucleótidos a la célula hepática. Dichos conjugados antisentido de agrupamiento de GalNAc tienen el potencial de actuar como moduladores farmacocinéticos y se describen, por ejemplo, en la publicación PCT WO 2012/083046 o en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. US 2011/0207799. Si bien estas publicaciones también divulgan procedimientos para la preparación de los derivados de GalNAc, se halló que estos procedimientos no cumplen el estándar para una síntesis a escala técnica.

20 Por lo tanto, el objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento mejorado para la preparación de los derivados de GalNAc de fórmula I que cumplen los requisitos de un procedimiento a escala industrial.

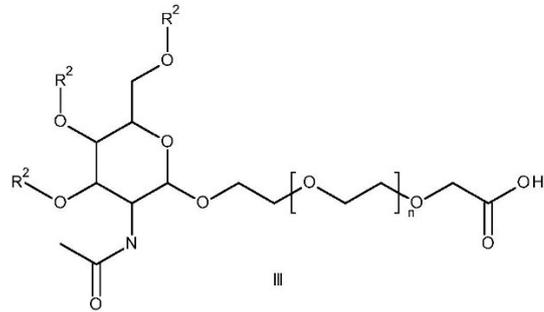
25 Otro objetivo de la invención es el uso del derivado ácido de GalNAc de fórmula I para la preparación de conjugados de oligonucleótidos con GalNAc terapéuticamente valiosos y de un procedimiento para la preparación de dichos conjugados.

El objetivo se pudo alcanzar con el procedimiento de la presente invención que comprende

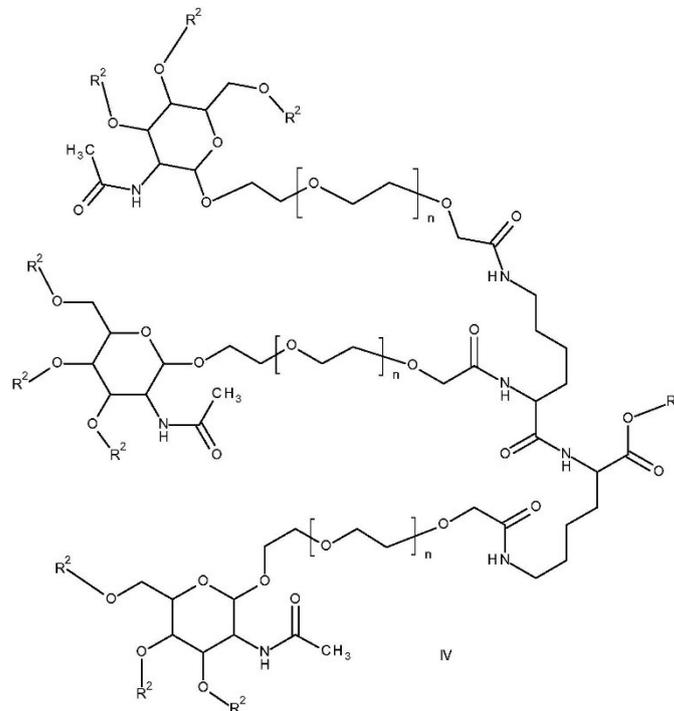
30 a) el acoplamiento de una sal triamínica de fórmula II



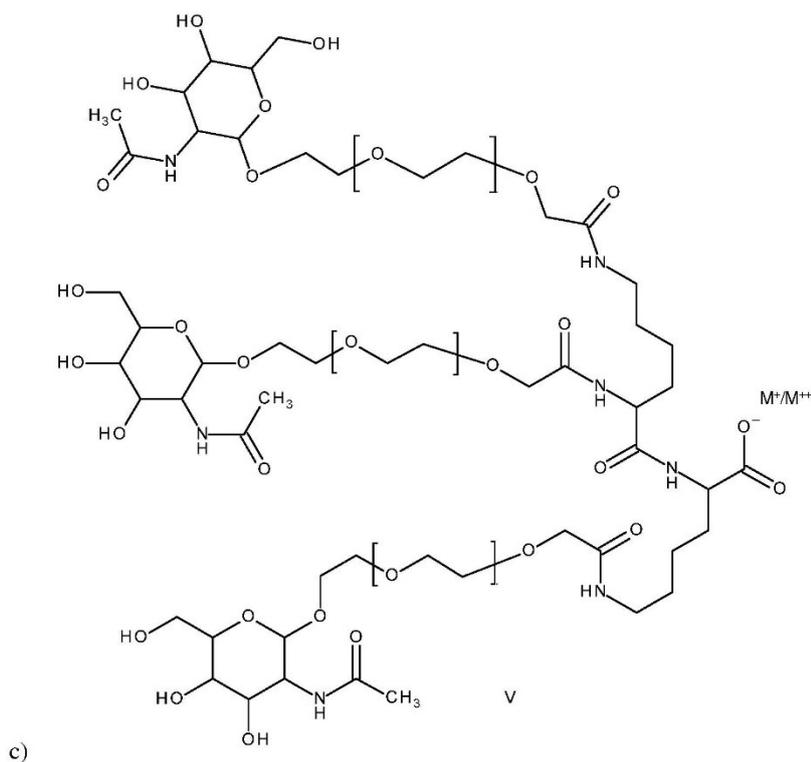
en la que R¹ es un grupo protector de éster y X es un anión de un ácido con un ácido tetrahidropiránico de fórmula III



5 en la que n es como anteriormente y R² es un grupo protector de hidroxilo en presencia de un agente de acoplamiento peptídico, una base amónica y un disolvente orgánico para formar el éster de GalNAc de fórmula IV



10 en la que n, R¹ y R² son como anteriormente;
 b) la eliminación del grupo protector de éster R¹ y de los grupos protectores de hidroxilo R² en presencia de una base mineral para formar la sal ácida de GalNAc de fórmula V



en la que n es como anteriormente y M es un catión metálico;

5 y

c) opcionalmente, la transformación de la sal ácida de GalNAc de fórmula V en el derivado ácido de GalNAc de fórmula I.

10 Las siguientes definiciones se exponen para ilustrar y definir el significado y alcance de los diversos términos usados para describir la invención en el presente documento.

Siempre que un carbono quiral esté presente en una estructura química, se entiende que todos los estereoisómeros asociados con ese carbono quiral están englobados por la estructura como estereoisómeros puros, así como mezclas de los mismos.

El término "alquilo C₁₋₇" indica un grupo hidrocarburo saturado lineal o ramificado monovalente de 1 a 7 átomos de carbono y, en modos de realización más particulares, de 1 a 4 átomos de carbono. Ejemplos de alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo o *terc*-butilo.

El término fenil-alquilo C₁₋₇ indica un grupo fenilo que está unido a un grupo alquilo C₁₋₇ como se define anteriormente. Un ejemplo particular es el grupo bencilo.

El grupo fenilo se puede sustituir opcionalmente por halógeno tal como cloro, bromo o yodo o por un grupo alquilo C₁₋₇ como se define anteriormente.

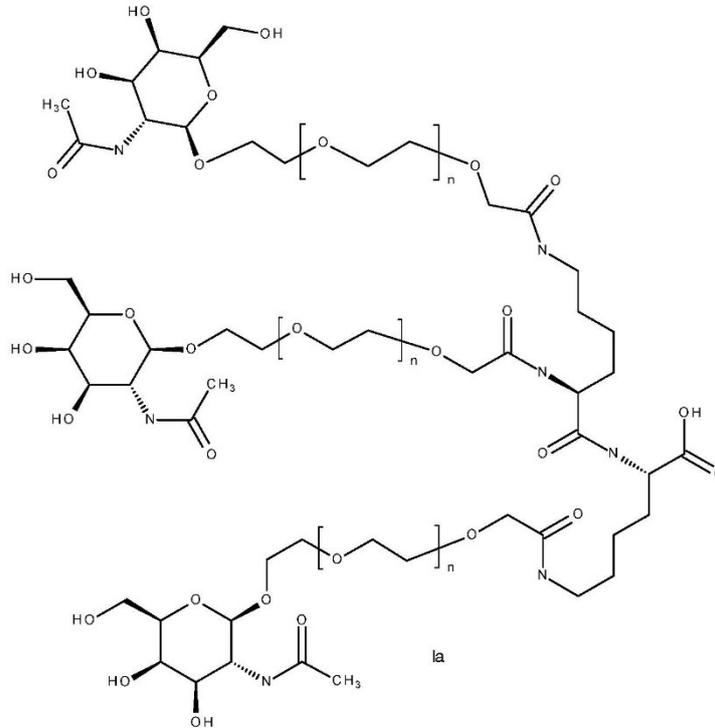
El término "grupo protector de amino" indica grupos destinados a proteger un grupo amino e incluye bencilo, benciloxicarbonilo, carbobenciloxi (CBZ o Z), 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), *p*-metoxibenciloxicarbonilo, *p*-nitrobenciloxicarbonilo, *terc*-butoxicarbonilo (BOC) y trifluoroacetilo. Otros ejemplos de estos grupos se encuentran en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 2.^a ed., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, 1991, capítulo 7; E. Haslam, "Protective Groups in Organic Chemistry", J. G. W. McOmie, Ed., Plenum Press, Nueva York, NY, 1973, capítulo 5, y T.W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1981. Los grupos protectores de amino preferentes son Fmoc y BOC.

El término "grupo protector de hidroxilo" y el término "grupo protector de éster" indican grupos destinados a proteger un grupo hidroxilo e incluyen grupos formadores de ésteres y éteres, en particular grupos tetrahidropiraniolo, benzilo, acetilo, carbamoilo, bencilo y sililéteres (por ejemplo, TBS, TBDPS). Otros ejemplos de estos grupos se encuentran en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 2.^a ed., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, 1991, capítulo 2-3; E. Haslam, "Protective Groups in Organic Chemistry", J. G. W. McOmie, Ed., Plenum Press,

Nueva York, NY, 1973, capítulo 5, y T.W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1981.

En un modo de realización preferente, el derivado de GalNAc tiene la fórmula la, en la que n es como anteriormente.

5



Asimismo, de acuerdo con la fórmula la, los compuestos intermedios II, III, IV, X, XI, XII, XIII, XIV, XX, XXI y XXII comparten la misma estereoquímica en sus centros quirales.

10

Síntesis de la sal triamínica de fórmula II (componente básico A):

El procedimiento comprende

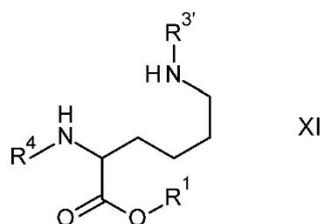
15

a1) transformación del ácido carboxílico de fórmula X



20

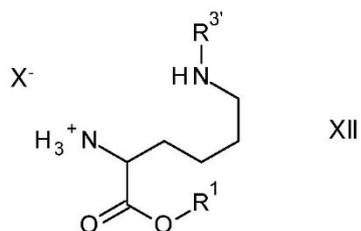
en la que $R^{3'}$ y R^4 son diferentes e independientes entre sí y son un grupo protector de amino, en un éster de fórmula XI



25

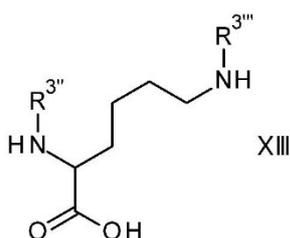
en la que R^1 es un grupo protector de éster y $R^{3'}$ y R^4 son como anteriormente;

b1) eliminación del grupo protector de amino R⁴ y posteriormente formación de una sal amínica de fórmula XII

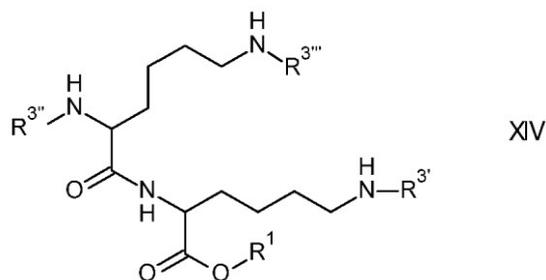


5 en la que R¹ y R^{3'} son como anteriormente y X⁻ es un anión ácido;

c1) acoplamiento de la sal amínica de fórmula XII con un derivado de ácido hexanoico de fórmula XIII



10 en la que R^{3''} y R^{3'''} son grupos protectores de amino, para formar la triamina protegida de fórmula XIV



15 en la que R^{3'}, R^{3''}, R^{3'''} y R¹ son como anteriormente;

d1) conversión de la triamina protegida de fórmula XIV, con un ácido, en la sal triamínica de fórmula II.

20 La etapa a1) comprende la transformación del ácido carboxílico de fórmula X con un alcohol R¹OH en presencia de un agente activador, un catalizador de aminas y un disolvente orgánico en el éster respectivo de fórmula XI.

25 Dado que el grupo protector de éster se debe poder escindir en condiciones básicas, alcoholes R¹OH adecuados son aquellos en los que R¹ es alquilo C₁₋₇ o fenil-alquilo C₁₋₇, en el que el grupo fenilo está opcionalmente sustituido por halógeno o alquilo C₁₋₇. En particular, son adecuados los alcoholes alifáticos C₁₋₄, tales como metanol o etanol o alcohol bencílico. El alcohol preferente es el alcohol bencílico.

30 Es importante que los grupos protectores de amino R^{3'}, R^{3''} y R^{3'''} sean diferentes de R⁴ con respecto a las condiciones para su eliminación. Adecuadamente, para R^{3'}, R^{3''} y R^{3'''} se selecciona un grupo protector de amino que se pueda escindir en condiciones ácidas, tales como el grupo Boc preferente.

Para los grupos protectores de amino R⁴ se seleccionan preferentemente grupos que se puedan escindir en condiciones básicas o por medio de hidrogenólisis, tales como FMOC (condiciones básicas) o Z (hidrogenólisis). FMOC es el grupo protector de amino preferente para R⁴.

35 Los agentes activadores adecuados se pueden seleccionar entre las carbodiimidias clásicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), pero preferentemente se usa DCC.

40 La presencia de un catalizador de aminas, preferentemente 4-(dimetilamino)piridina, es ventajosa para la esterificación.

La esterificación se realiza, por lo general, a una temperatura de 20 °C a 50 °C en un disolvente orgánico aprótico tal como hidrocarburos halogenados como el diclorometano.

5 La etapa b1) en una primera etapa implica la eliminación del grupo protector de amino R⁴, preferentemente Fmoc, con una amina alifática en presencia de un disolvente orgánico.

Convenientemente, la amina alifática es una amina alifática secundaria tal como dimetilamina, dietilamina, morfolina o piperazina. Preferentemente se aplica dietilamina.

10 La reacción se realiza, por lo general, en un disolvente orgánico adecuado, tal como en disolventes apróticos polares como tetrahidrofurano a temperaturas de reacción de entre 20 °C y 50 °C.

15 El exceso de amina se puede eliminar adecuadamente mediante destilación aceotrópica con un disolvente adecuado tal como, por ejemplo, con acetonitrilo.

En una segunda etapa de la etapa b1), la amina libre se transforma en una sal amínica de fórmula XII con un ácido adecuado.

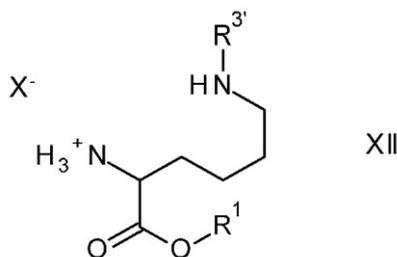
20 Los ácidos adecuados son ácidos minerales como ácido clorhídrico o ácido fosfórico o ácidos sulfónicos. Preferentemente se pueden usar ácidos sulfónicos, tales como ácido metanosulfónico o ácido *p*-toluensulfónico, y más preferentemente, ácido metanosulfónico.

En consecuencia, X representa el anión del ácido aplicado.

25 Dado que, por lo general, la amina libre no se aísla, la reacción puede tener lugar en el acetonitrilo usado en la etapa b1), normalmente a temperatura ambiente.

La sal amínica formada de fórmula XII se puede aislar, por lo general, mediante filtración.

30 La sal amínica de fórmula XII



35 en la que

R¹ es bencilo, R^{3'} es Boc

y X es el anión del ácido metanosulfónico, constituye otro modo de realización de la presente invención.

40 La etapa c1) implica el acoplamiento de la sal amínica de fórmula XII en la que R¹, R^{3'} y X son como anteriormente, pero preferentemente en la que R¹ es bencilo, R^{3'} es Boc y X es el anión del ácido metanosulfónico con el derivado de ácido hexanoico de fórmula XIII, en la que R^{3''} y R^{3'''} son como anteriormente, pero preferentemente son Boc con un agente de acoplamiento en presencia de una base amínica y un disolvente orgánico, y la formación de la triamina protegida de fórmula XIV.

45 El acoplamiento puede seguir los procedimientos clásicos conocidos por los expertos en la técnica usando un agente de acoplamiento carbodiimídico como DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida), EDC (N-[3-dimetilaminopropil]-N'-etilcarbodiimida) o EDC HCl (clorhidrato de N-[3-dimetilaminopropil]-N'-etilcarbodiimida) y un aditivo como HOBt (1-hidroxibenzotriazol), HOSu (N-hidroxisuccinimida), TBTU (tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-[benzotriazol-1-il]uronio), HBTU (hexafluorofosfato de 2-[1H-benzotriazol-1-il]-1,1,3,3-tetrametiluronio) o HOAt (1-hidroxi-7-azabenzotriazol) y combinaciones comunes de los mismos tales como TBTU/HOBt o HBTU/HOAt.

55 En un modo de realización preferente, el anhídrido del ácido *n*-propilfosfónico (T3P) se selecciona como agente de acoplamiento conjuntamente con una base amínica terciaria, como trietilamina o N-etildiisopropilamina, pero preferentemente con N-etildiisopropilamina.

Los derivados de ácido hexanoico de fórmula XIII, en particular el derivado protegido con Boc, son compuestos que están disponibles comercialmente.

5 La reacción de acoplamiento tiene lugar normalmente en un disolvente aprótico polar como acetonitrilo o tetrahidrofurano o mezclas de los mismos a temperaturas de reacción en el intervalo de 0 °C a 50 °C.

10 El aislamiento de la triamina protegida en bruto de fórmula XIV puede ocurrir eliminando los disolventes. La posterior cristalización, por ejemplo, con acetonitrilo, da lugar a un producto de alta pureza que se puede usar fácilmente para la siguiente etapa d1).

En un modo de realización preferente, en la triamina protegida de fórmula XIV, R¹ es bencilo y R^{3'}, R^{3''} y R^{3'''} son Boc.

15 La etapa d1) implica la conversión de la triamina protegida de fórmula XIV en la que R¹, R^{3'}, R^{3''} y R^{3'''} son como anteriormente, preferentemente en la que R¹ es bencilo y R^{3'}, R^{3''} y R^{3'''} son Boc con un ácido en presencia de un disolvente orgánico, en la sal triamínica de fórmula II.

20 Los ácidos adecuados son ácidos minerales como ácido clorhídrico o ácido fosfórico, ácido trifluoroacético o ácidos sulfónicos. Preferentemente se pueden usar ácidos sulfónicos, tales como ácido metanosulfónico o ácido *p*-toluensulfónico, y más preferentemente, ácido metanosulfónico.

Preferentemente se usa un exceso de 4 eq. a 10 eq. del ácido respectivo.

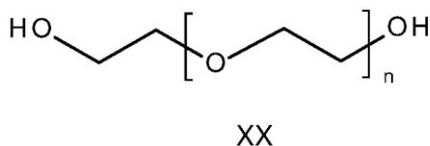
25 La reacción se realiza normalmente en un disolvente aprótico polar adecuado a una temperatura de reacción de 20 °C a 80 °C.

30 En un modo de realización preferente de la presente invención, la conversión se realiza en un disolvente aprótico polar que impide la cristalización de la sal triamínica de fórmula II resultante. En particular, el disolvente preferente es acetonitrilo, que deja la sal triamínica de fórmula II resultante en forma de una emulsión que se puede usar fácilmente para el posterior acoplamiento con el ácido tetrahidropiránico de fórmula II en la etapa a).

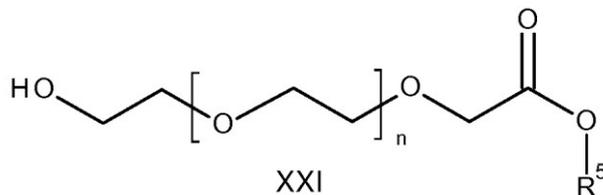
Síntesis del ácido tetrahidropiránico de fórmula III (componente básico B):

35 El procedimiento para producir el ácido tetrahidropiránico de fórmula III comprende

a2) la transformación de un diol de fórmula XX

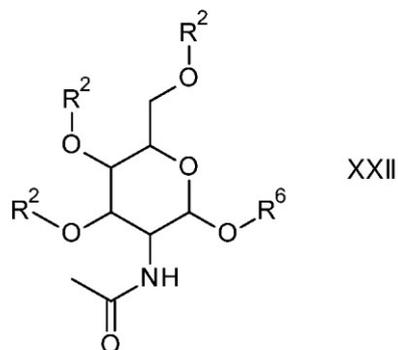


40 en la que n es un número entero entre 0 y 10, en el éster alcohólico de fórmula XXI



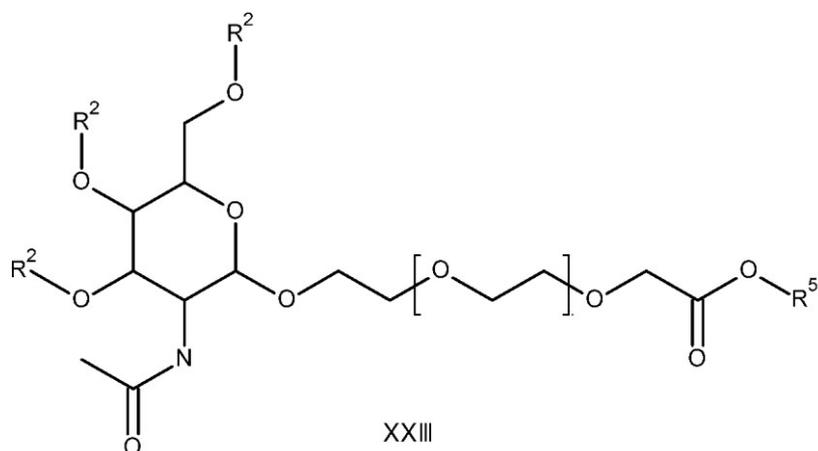
45 en la que n es como anteriormente y R⁵ es un grupo protector de éster;

b2) el acoplamiento del éster alcohólico de fórmula XXI con un derivado tetrahidropiránico de fórmula XXII



en la que R^2 y R^6 independientes entre sí son grupos protectores de hidroxilo para formar un éster tetrahidropiránico de fórmula XXIII

5



en la que R^2 y R^5 son como anteriormente;

10 c2) la eliminación del grupo estérico R^5 para formar el ácido tetrahidropiránico de fórmula III.

La etapa a2) requiere la transformación del diol de fórmula XX en el éster alcohólico de fórmula XXI.

15 El diol de fórmula XX se caracteriza por n repeticiones de unidades $-(CH_2)_n-O-$. Por lo general, el número entero n se selecciona entre 0 y 10, pero preferentemente entre 0 y 5, más preferentemente entre 0 y 2. El diol preferente es el 2-[2-(2-hidroxietoxi)etoxi]etanol disponible comercialmente ($n = 1$).

En una primera etapa de la etapa a2), el diol de fórmula XX se desprotona con un alcoholato de metal alcalino.

20 Los alcoholatos de metales alcalinos adecuados son alcoholatos terciarios de sodio o potasio tales como *t*-butilato de sodio o potasio o amilato de sodio o potasio.

25 Para la desprotonación puede estar presente un disolvente aprótico polar o prótico polar tal como *N,N*-dimetilformamida o alcoholes terciarios como *t*-butanol o 2-metil-2-butanol y la reacción puede tener lugar a entre 50 °C y 120 °C.

En una segunda etapa de la etapa a2), el resto de ácido acético se introduce con un ácido acético halogenado o con una sal adecuada del mismo.

30 El ácido acético halogenado adecuado es ácido bromoacético o cloroacético o las sales de metales alcalinos de los mismos. En un modo de realización preferente se emplea una sal del ácido acético halogenado, más preferentemente se usa cloroacetato de sodio.

35 La reacción puede tener lugar en un disolvente aprótico polar o prótico polar, normalmente en el mismo disolvente que en la etapa previa.

La temperatura de reacción depende del disolvente, pero por lo general se selecciona entre 50 °C y 120 °C.

En la tercera etapa de la etapa a2), la sal estérica intermediaria se transforma sin aislamiento en el éster alcohólico de fórmula XXI.

5 La formación del éster alcohólico significa la introducción del grupo protector de éster R⁵.

Si bien la técnica conoce muchas posibilidades para proteger un éster, el grupo bencilo resultó ser el más adecuado. Su introducción puede ocurrir con un halogenuro de bencilo o un éster bencilsulfonílico, pero preferentemente con bromuro de bencilo.

10

La esterificación puede tener lugar en un disolvente aprótico polar, normalmente en el mismo disolvente que en la etapa anterior, a una temperatura de reacción de 20 °C a 120 °C.

15

El aislamiento del éster alcohólico de la mezcla de reacción puede ocurrir por medio de extracción con un disolvente adecuado tal como con metil-*t*-butiléter y la eliminación del disolvente. La etapa b2) requiere la reacción del éster alcohólico de fórmula XXI con el derivado tetrahidropiránico de fórmula XXII en presencia de un ácido y un disolvente orgánico para formar el éster tetrahidropiránico de fórmula XXIII.

20

Aunque la técnica conoce muchos grupos protectores de hidroxilo, R² y R⁶ son, preferentemente, acetilo.

El derivado tetrahidropiránico de fórmula XXII, en particular los derivados de acetilo, son compuestos que están disponibles comercialmente.

25

Los ácidos adecuados son ácidos sulfónicos halogenados tales como el ácido trifluorometanosulfónico preferente.

La reacción se realiza normalmente en presencia de un disolvente aprótico polar como diclorometano a temperaturas de reacción de 0 °C a 40 °C.

30

En un modo de realización preferente, el ácido acético generado se elimina mediante destilación continua durante el transcurso de la reacción.

35

Después de la neutralización de la mezcla de reacción, el éster tetrahidropiránico de fórmula XXIII se puede aislar eliminando los disolventes. El producto en bruto se puede purificar mediante cromatografía de sílice con *n*-heptano/acetona o, preferentemente, metil-*tert*-butiléter/acetona como fase móvil.

En un modo de realización preferente, en el éster tetrahidropiránico de fórmula XXIII, R² es acetilo y R⁶ es bencilo.

La etapa c2) se refiere a la eliminación del grupo estérico R⁶.

40

La eliminación de un grupo estérico es, en principio, conocida por los expertos en la técnica y está bien descrita en la literatura.

45

Como modo de realización preferente, la etapa c2) implica una hidrogenación catalítica con hidrógeno en presencia de un catalizador de hidrogenación para eliminar el grupo bencilo y la formación del ácido tetrahidropiránico de fórmula III.

El catalizador de hidrogenación típico para la eliminación del grupo bencilo es paladio sobre carbono (Pd/C).

50

La reacción se realiza normalmente en presencia de un disolvente aprótico polar como tetrahidrofurano a temperaturas de reacción de entre 10 °C y 30 °C y a una presión de hidrógeno de 1 bar a 5 bar.

El ácido tetrahidropiránico de fórmula III se puede usar, después de eliminar por filtración el catalizador, directamente en solución para el posterior acoplamiento en la etapa a) del procedimiento de la presente invención.

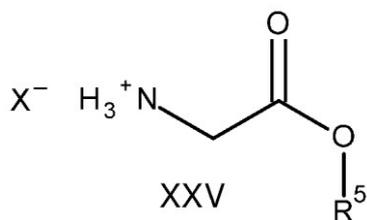
55

En el ácido tetrahidropiránico preferente de fórmula III, R² es acetilo.

En otro modo de realización, el éster alcohólico de fórmula XXI se puede preparar con un procedimiento que comprende las etapas de:

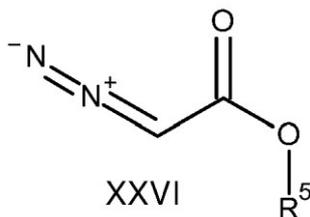
60

a3) la diazotación de un 2-aminoacetato de fórmula XXV



en la que R⁵ es como anteriormente y X es un átomo de halógeno con un nitrato para formar el compuesto 2-diazo de fórmula XXVI

5



en la que R⁵ es como anteriormente; y

10 b3) la transformación del compuesto 2-diazo de fórmula XXVI con el diol de fórmula XX en el éster alcohólico deseado de fórmula XXI.

La etapa a3) requiere la aminodiazotación del 2-aminoacetato de fórmula XXV y la formación del compuesto 2-diazo de fórmula XXVI.

15

El aminoacetato de fórmula XXV es un compuesto disponible comercialmente que se aplica adecuadamente como clorhidrato (X = Cl).

20

La diazotación se realiza, por lo general, con un nitrito alcalino, preferentemente con nitrito de sodio en presencia de una mezcla de disolventes de agua y un disolvente aprótico no polar a una temperatura de reacción de -10 °C a 10 °C, preferentemente de 0 °C a 5 °C.

25

Los disolventes apróticos no polares adecuados se pueden seleccionar de metil-*tert*-butiléter, tetrahidrofurano, 2-metil tetrahidrofurano, ciclopentil-metiléter, diclorometano y tolueno. Preferentemente, se usa tolueno en una mezcla 1:1 v/v con agua.

El compuesto 2-diazo de fórmula XXVI obtenido se mantiene disuelto en la fase orgánica para la transformación posterior en la etapa b3).

30

La etapa b3) requiere la transformación del compuesto 2-diazo de fórmula XXVI con el diol de fórmula XX.

Como se explica anteriormente, el diol de fórmula XX se caracteriza por n repeticiones de unidades -(CH₂)-O-. Por lo general, el número entero n se selecciona entre 0 y 10, pero preferentemente entre 0 y 5, más preferentemente entre 0 y 2. El diol preferente es el 2-[2-(2-hidroxietoxi)etoxi]etanol disponible comercialmente (n = 1).

35

La reacción se puede realizar en presencia de un ácido de Lewis y un disolvente aprótico no polar entre -10 °C y 10 °C, preferentemente entre 0 °C y 5 °C.

40

El disolvente aprótico no polar es, por lo general, el mismo que se usa en la etapa a3).

Los ácidos de Lewis típicos se pueden seleccionar entre trihalogenuros de boro, tales como trifluoruro de boro y sus aductos disponibles comercialmente como dietileterato de trifluoruro de boro o acetato de rodio (II) o trifluorometanosulfonato de cobre (II). Preferentemente se aplica trifluoruro de boro en forma de dietileterato.

45

El éster alcohólico de fórmula XXI se puede aislar de la mezcla de reacción mediante procedimientos de preparación comunes que implican la separación de la capa orgánica, la eliminación del disolvente por evaporación y, opcionalmente, la purificación adicional del producto en bruto por medio de cromatografía.

50

El éster alcohólico de fórmula XXI se puede usar a continuación fácilmente para la siguiente etapa b2).

Ensamblaje de los componentes básicos A y B

- La etapa a) requiere el acoplamiento de la sal triamínica de fórmula II con el ácido tetrahidropiránico de fórmula III en presencia de un agente de acoplamiento peptídico, una base amínica y un disolvente orgánico para formar el éster de GalNAc de fórmula IV.
- 5 Como se describe anteriormente, tanto la sal triamínica de fórmula II como el ácido tetrahidropiránico de fórmula III se pueden usar preferentemente sin aislamiento de la mezcla de reacción resultante de su síntesis.
- 10 Como se explica anteriormente, en el ácido tetrahidropiránico preferente de fórmula III, R² es acetilo y, en la sal triamínica preferente de fórmula II, R¹ es bencilo y X es el anión del ácido metanosulfónico.
- 15 El acoplamiento puede seguir los procedimientos clásicos conocidos por los expertos en la técnica usando un agente de acoplamiento carbodiimídico como DCC y un aditivo como HOBt (1-hidroxibenzotriazol), HOSu (N-hidroxisuccinimida), TBTU (tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-[benzotriazol-1-il]uronio), HBTU (hexafluorofosfato de 2-[1H-benzotriazol-1-il]-1,1,3,3-tetrametiluronio) o HOAt (1-hidrox-7-azabenzotriazol) y combinaciones comunes de los mismos tales como TBTU/HOBt o HBTU/HOAt.
- 20 En un modo de realización preferente, el anhídrido del ácido *n*-propilfosfónico (T3P) se selecciona como agente de acoplamiento conjuntamente con una base amínica terciaria, como trietilamina o N-etildiisopropilamina, pero preferentemente N-etildiisopropilamina.
- 25 La reacción de acoplamiento tiene lugar normalmente en un disolvente aprótico polar como acetonitrilo o tetrahidrofurano o mezclas de los mismos a temperaturas de reacción en el intervalo de 20 °C a 70 °C.
- El ácido metanosulfónico formado y el exceso de base amínica y agente de acoplamiento se pueden eliminar después de completar la reacción de acoplamiento precipitando el producto en bruto en un disolvente orgánico adecuado, tal como en 2-propanol.
- 30 En un modo de realización alternativo y preferente, las etapas a) y b) se pueden combinar y realizar en una etapa sin aislar el éster de GalNAc de fórmula IV. En consecuencia, la mezcla de reacción de la etapa a) se puede tratar directamente con la base mineral como se explica en la etapa b) a continuación.
- En el éster de GalNAc preferente de fórmula IV, R¹ es bencilo y R² es acetilo.
- 35 La etapa b) requiere la eliminación del grupo protector de éster R¹ y de los grupos protectores de hidroxilo R² en presencia de una base mineral para formar la sal ácida de GalNAc de fórmula V.
- Por lo general, el éster de GalNAc de fórmula IV se disuelve en un disolvente orgánico polar, en particular en un alcohol como metanol.
- 40 M representa un catión metálico, normalmente un catión de metal alcalino o alcalinotérreo tal como litio, sodio, potasio, rubidio, calcio o magnesio, pero preferentemente sodio, potasio o calcio, más preferentemente sodio.
- 45 En consecuencia, una base mineral adecuada es un hidróxido de metal alcalino o alcalinotérreo seleccionado de hidróxido de sodio, potasio o calcio, típicamente aplicado en forma de una solución acuosa. Preferentemente se usa hidróxido de sodio acuoso en un exceso de 11 eq. a 25 eq.
- La reacción se puede realizar a una temperatura de 0 °C a 40 °C.
- 50 El producto en bruto se puede aislar por evaporación del disolvente. La purificación adicional del producto se puede lograr por cromatografía preparativa en fase inversa usando una fase estacionaria polar y una fase móvil polar.
- Una fase móvil polar preferente resultó ser mezclas de hidrogenocarbonato de sodio acuoso y acetonitrilo que se aplicaron con gradientes variables.
- 55 La concentración de las fracciones seleccionadas de la cromatografía proporciona una sal ácida de GalNAc pura de fórmula V.
- 60 En la sal ácida de GalNAc preferente de fórmula V, R¹ es bencilo, R² es acetilo y M es sodio.
- No es necesaria ninguna concentración en caso de que la sal de GalNAc de fórmula V se someta a la etapa opcional c) que comprende la transformación de la sal ácida de GalNAc de fórmula V en el derivado ácido de GalNAc de fórmula I.
- 65 La transformación se puede realizar por intercambio iónico con un intercambiador de cationes adecuado o, de forma alternativa, por neutralización con un ácido adecuado, por ejemplo, ácido fosfórico o ácidos sulfónicos como ácido

metanosulfónico.

5 En caso de que se aísle el derivado ácido de GalNAc deseado de fórmula I, la transformación puede tener lugar preferentemente en una solución metanólica. La eliminación del disolvente hace que el producto deseado tenga una alta pureza y rendimiento.

10 De forma alternativa, en el caso de que el derivado ácido de GalNAc de fórmula I se someta directamente a la conjugación con oligonucleótidos, la transformación se realiza adecuadamente en un disolvente aprótico polar como N,N'-dimetilformamida.

10 Como otra alternativa, el derivado ácido de GalNAc de fórmula I se puede transformar nuevamente en una sal de GalNAc de fórmula V en presencia de una base mineral adecuada, como se explica anteriormente. Esta alternativa permitiría, en principio, cambiar el catión metálico.

15 En consecuencia, el término "sal" en el contexto del derivado ácido de GalNAc de fórmula I significa una sal de metal alcalino o alcalinotérreo con un catión seleccionado de litio, sodio, potasio, rubidio, calcio o magnesio, pero preferentemente sodio, potasio o calcio, más preferentemente sodio.

20 Conjugación a oligonucleótidos

20 El derivado ácido de GalNAc de fórmula I o la sal ácida de GalNAc de fórmula V se pueden usar como se describe inicialmente para la preparación de conjugados de oligonucleótidos con GalNAc terapéuticamente valiosos.

25 El término "oligonucleótido", como se usa en el presente documento, se define como lo entiende en general el experto en la técnica, como una molécula que comprende dos o más nucleósidos unidos covalentemente. Para su uso como un oligonucleótido terapéuticamente valioso, los oligonucleótidos se sintetizan típicamente con una longitud de 7 a 30 nucleótidos.

30 Los oligonucleótidos pueden consistir en ADN, ARN, ARN modificado o monómeros de nucleósidos de LNA o combinaciones de los mismos. Los monómeros de nucleósidos de LNA son nucleósidos modificados que comprenden un grupo conector (denominado birradical o puente) entre C2' y C4' del anillo glucídico de ribosa de un nucleótido. Estos nucleósidos también se denominan ácido nucleico con puente o ácido nucleico bicíclico (BNA) en la literatura.

35 Los oligonucleótidos también pueden contener conectores amino en el extremo 5' del oligonucleótido tales como, por ejemplo, un conector amino C-6.

La preparación de conjugados de polinucleótidos con GalNAc comprende las etapas de:

40 a3) preparación del derivado ácido de GalNAc de fórmula I o la sal ácida de GalNAc de fórmula V de acuerdo con la presente invención como se describe anteriormente y

b3) conjugación del derivado ácido de GalNAc de fórmula I o la sal ácida de GalNAc de fórmula V en condiciones de acoplamiento peptídico con un polinucleótido.

45 Es preferente la conjugación con la sal ácida de GalNAc de fórmula V.

50 Las condiciones de acoplamiento peptídico son procedimientos clásicos conocidos por los expertos en la técnica que usan un agente de acoplamiento carbodiimídico como DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida), EDC (N-[3-dimetilaminopropil]-N'-etilcarbodiimida) o EDC HCl (clorhidrato de N-[3-dimetilaminopropil]-N'-etilcarbodiimida) y un aditivo como HOBt (1-hidroxibenzotriazol), HOSu (N-hidroxisuccinimida), TBTU (tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-[benzotriazol-1-il]uronio), HBTU (hexafluorofosfato de 2-[1H-benzotriazol-1-il]-1,1,3,3-tetrametiluronio) o HOAt (1-hidroxi-7-azabenzotriazol) y combinaciones comunes de los mismos tales como TBTU/HOBt o HBTU/HOAt.

55 A modo de ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 2011/0207799 se puede citar como referencia de una conjugación de derivados de GalNAc con oligonucleótidos.

Ejemplos

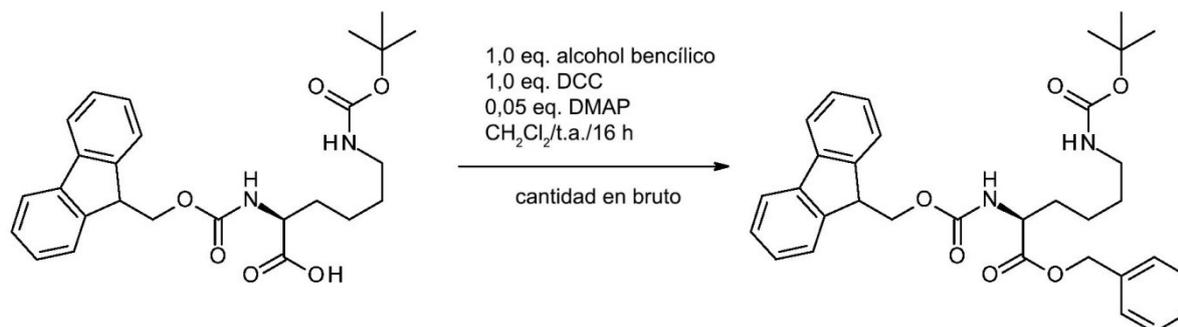
60 Abreviaturas:

AcOH	ácido acético
DMAP	4-(dimetilamino)-piridina
DMF	N,N'-dimetilformamida
EtOH	etanol

MeOH	metanol
t.a.	temperatura ambiente
THF	tetrahidrofurano
TBME	éter metil- <i>terc</i> -butílico

Componente básico A:**Ejemplo 1**

5

(2S)-6-(*terc*-butoxicarbonilamino)-2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)hexanoato de bencilo

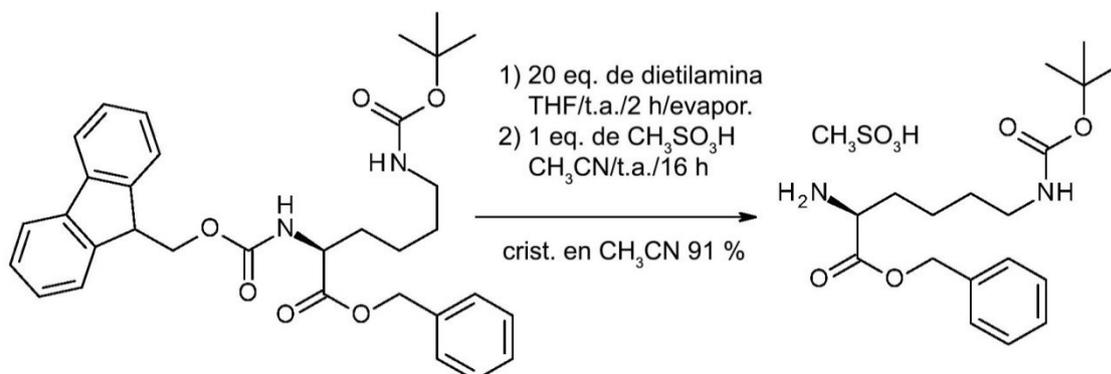
10 Se suspendieron 234,0 g (500,0 mmol) de ácido (2S)-6-(*terc*-butoxicarbonilamino)-2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)hexanoico en 500 ml de diclorometano, se añadieron 62,0 ml (600 mmol, 1,2 eq.) de alcohol bencilico y 3,05 g de DMAP (25,0 mmol, 0,05 eq.). La solución se enfrió a 0-5 °C en el transcurso de 40 min, se añadió gota a gota una solución de 108,0 g (525,0 mmol, 1,05 eq.) de N,N'-diciclohexilcarbodiimida en 500 ml de diclorometano. La suspensión blanca se agitó durante 1 h a 0-5 °C y, a

15 continuación, durante 15 h a temperatura ambiente. La suspensión se filtró sobre un filtro de vidrio G3, los residuos de filtración blancos se lavaron por partes con un total de 250 ml de diclorometano. El filtrado se evaporó a 650-10 mbar/1 h para obtener un aceite amarillo, que se disolvió en 2,0 l de acetato de etilo, se extrajo con 2,0 l de ácido clorhídrico 0,5 M, 2,0 l de NaHCO₃ 1 M y 1,0 l de salmuera, se evaporó la capa orgánica a sequedad a 40 °C/150-10 mbar/5 h para obtener 291,1 g de

20 (2S)-6-(*terc*-butoxicarbonilamino)-2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)hexanoato de bencilo en bruto como un sólido blanco con un rendimiento del 104 % y una pureza del 96,4 % (% del área por HPLC; contiene aprox. 5 % de alcohol bencilico).

El material se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. EM: m/z = 459,22735 (M-Boc+H)⁺.

25

Ejemplo 2Sal ácida metanosulfónica de (2S)-2-amino-6-(*terc*-butoxicarbonilamino)hexanoato de bencilo

30

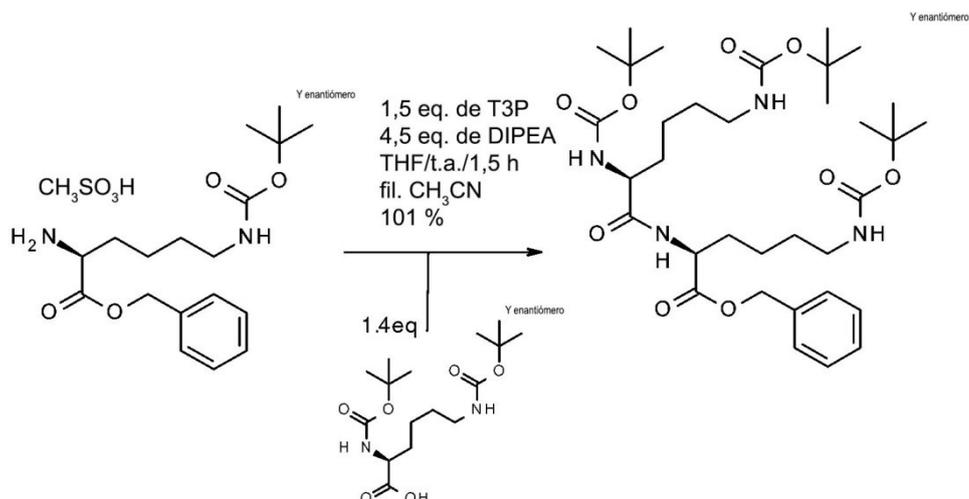
Se disolvieron 291,1 g (500,0 mmol) de (2S)-6-(*terc*-butoxicarbonilamino)-2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino) hexanoato de bencilo (pureza por HPLC; 95,8 %; contiene aprox. 5 % de alcohol bencilico) en 1,4 l de THF a temperatura ambiente. Dentro de 10 minutos, se añadieron 1,04 l de dietilamina (10,0 mol, 20 eq.), la solución de color amarillo claro se agitó durante 2 h a temperatura ambiente y, a continuación, se evaporó a 40 °C/200-10 mbar, se añadieron 200 ml de acetonitrilo y se evaporó nuevamente para eliminar eficazmente la dietilamina a 40 °C/100-10 mbar/1 h. Finalmente, se obtuvieron 268,1 g de un aceite amarillo, que se disolvió en 2,5 l de

35

5 acetoniitrilo, agitando durante 10 min a temperatura ambiente. Las partículas insolubles se filtraron sobre un filtro de fibra de vidrio y se lavaron con 500 ml de acetoniitrilo. El filtrado se trató gota a gota en el transcurso de 10 min con 34,0 ml de ácido metanosulfónico a 20 °C-25 °C. La suspensión blanca formada se agitó durante 17 h a temperatura ambiente y se filtró sobre un filtro de vidrio G3. Los residuos de filtración se lavaron por partes con 500 ml de acetoniitrilo. Los cristales blancos se secaron a 40 °C/15 mbar/4 h para obtener 195,8 g de sal ácida metanosulfónica de (2S)-2-amino-6-(*terc*-butoxicarbonilamino)hexanoato de bencilo en forma de cristales blancos con un rendimiento del 91 % (2 etapas) y un 99,3 % de pureza (% del área por HPLC). EM: m/z = 337,2149 (M+H)⁺.

10 **Ejemplo 3**

(2S)-2-[[[(2S)-2,6-bis(*terc*-butoxicarbonilamino)hexanoil]amino]-6-(*terc*-butoxicarbonilamino)hexanoato de bencilo



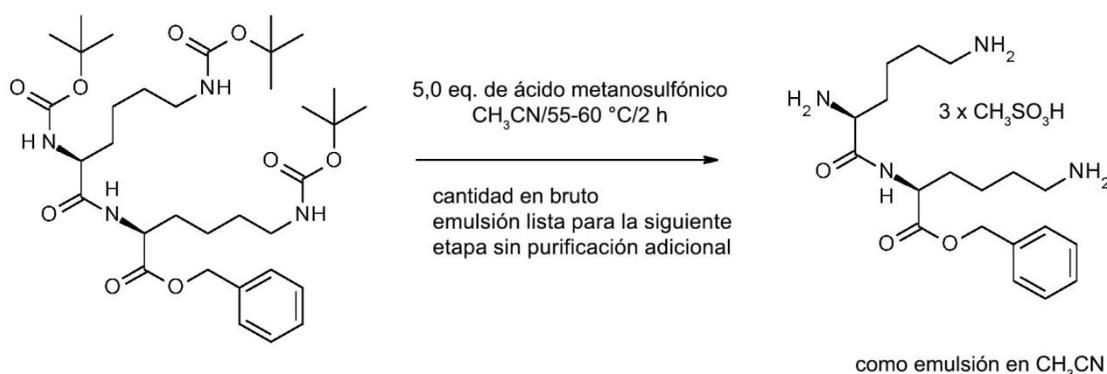
15 Se suspendieron 190,0 g (439,0 mmol) de sal ácida metanosulfónica de (2S)-2-amino-6-(*terc*-butoxicarbonilamino)hexanoato de bencilo en 1,9 l de THF a temperatura ambiente. Se añadieron 335 ml (1,98 mol, 4,5 eq.) de N-etildiisopropilamina, con lo que la temperatura disminuyó ligeramente hasta 15 °C. A continuación, se añadieron 213 g (615 mmol, 1,4 eq.) de ácido

20 (S)-2,6-bis((*terc*-butoxicarbonil)amino)hexanoico y la suspensión blanca se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. Se añadieron gota a gota 390 ml de anhídrido del ácido *n*-propilfosfónico (T3P como trímero cíclico al 50 % en acetato de etilo, 659 mmol, 1,5 eq.) en el transcurso de 20 min a 20-25 °C (enfriado en un baño de agua fría). La solución turbia de color amarillo claro resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h, se transfirió a un embudo de separación, se diluyó con 1,9 l de TBME y se extrajo con 1,9 l de agua, 1,9 l de ácido clorhídrico 0,5 M, 1,9 l de NaOH 0,5 M, 1,9 l de agua y 1,9 l de salmuera. La capa orgánica separada, aún turbia, se filtró sobre un filtro de fibra de vidrio, el filtro se lavó con 100 ml de TBME y los filtrados combinados se evaporaron a 40 °C/100 mbar/1 h, se añadió de nuevo 1,0 l de TBME (para eliminar el agua de forma azeotrópica) y se evaporó a 40 °C/250-10 mbar/1 h para obtener 296,4 g en bruto como un residuo sólido blanco.

30 El sólido en bruto se trató con 500 ml de acetoniitrilo y la solución turbia se calentó a 60-65 °C durante 10 min. La mezcla se enfrió a 20-25 °C, se agitó durante 10 min, se filtró sobre un filtro de fibra de vidrio y se lavó con 50 ml de acetoniitrilo. La solución de color amarillo claro se evaporó a 40 °C/100-10 mbar/4 h para obtener 295 g de (2S)-2-[[[(2S)-2,6-bis(*terc*-butoxicarbonilamino)hexanoil]amino]-6-(*terc*-butoxicarbonilamino)hexanoato de bencilo como un sólido blanquecino con un rendimiento del 101 % (pureza por HPLC: 100 %, pureza del diastereómero (SS): 98,6 %) que se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa. EM: m/z = 565,3741 (M-Boc+H)⁺.

35 **Ejemplo 4**

Sal ácida trimetanosulfónica de (2S)-6-amino-2-[[[(2S)-2,6-diaminohexanoil]amino]hexanoato de bencilo



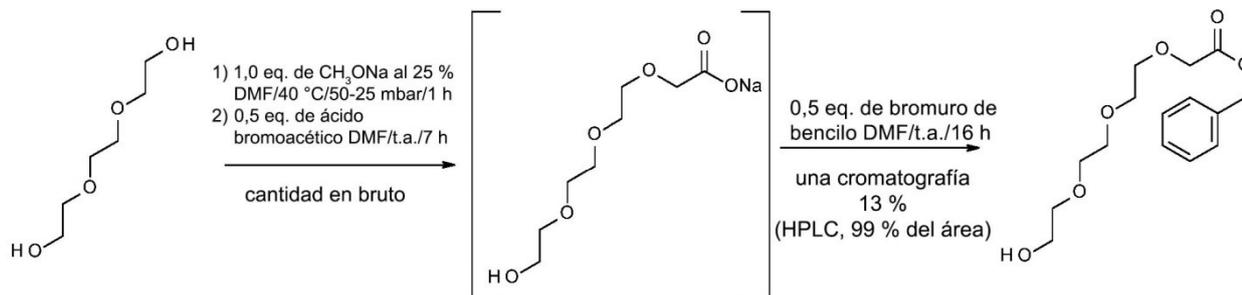
Se suspendieron 124,0 g (187 mmol) de (2S)-2-[[[(2S)-2,6-bis(*tert*-butoxicarbonilamino)hexanoil]amino]-6-(*tert*-butoxicarbonilamino)hexanoato de bencilo en 1,25 l de acetonitrilo. Se añadieron 61,0 ml (935,0 mmol, 5,0 eq.) de ácido metanosulfónico a 20-25 °C en el transcurso de 10 min (evolución de gas). La suspensión anaranjada resultante se calentó en 40 min a 55-60 °C y se agitó durante 1 h adicional a 55-60 °C. La emulsión de color anaranjado rojizo se enfrió a temperatura ambiente (la eliminación de Boc se controló mediante ¹H-RMN) y se usó sin purificación adicional en la etapa de ensamblaje A+B, ejemplo 8. EM: m/z = 365,2558 (M+H)⁺.

10 Componente básico B:

Ejemplo 5a

2-[2-[2-(2-hidroxietoxi)etoxi]etoxi]acetato de bencilo

15



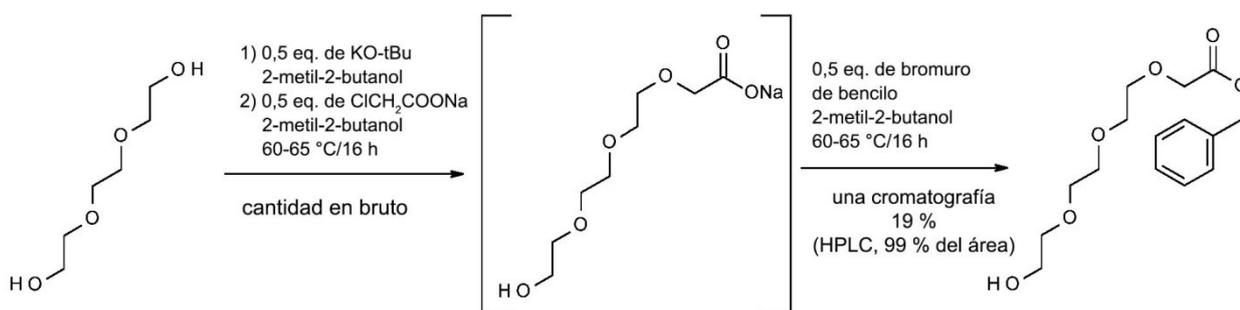
Se disolvieron 30,0 g (200,0 mmol) de 2-[2-(2-hidroxietoxi)etoxi]etanol en 50 ml de DMF a 20-25 °C y, a continuación, se añadieron 46,0 ml de metóxido de sodio al 25 % (200,0 mmol, 1,0 eq.) en metanol. La solución formada se evaporó a 40 °C/50 mbar/0,5 h (eliminación de 40 ml de disolvente), se añadieron nuevamente 50 ml de DMF y se evaporó a 40 °C/20 mbar/0,5 h (eliminación de 15 ml de disolvente). A la suspensión ligeramente gelatinosa se le añadió una solución de 13,9 g de ácido bromoacético (100 mmol, 0,5 eq.) en 50 ml de DMF a 20-25 °C y la mezcla se agitó durante 6 h. Se añadieron 11,9 ml de bromuro de bencilo (100 mmol, 0,5 eq.) y la mezcla se agitó durante otras 16 h a 20-25 °C. La mezcla de reacción se trató, a continuación, con 200 ml de salmuera y se extrajo con 200 ml de TBME. La capa de TBME separada se extrajo con 200 ml de salmuera, la capa de TBME separada se secó a continuación con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a 40 °C/300-10 mbar/1 h para obtener 23,9 g en bruto de 2-[2-[2-(2-hidroxietoxi)etoxi]etoxi]acetato de bencilo.

Después de la cromatografía (600 g de sílice 60 [0,063-0,2 mm], fase móvil: acetato de etilo), se aislaron un total de 7,85 g de 2-[2-[2-(2-hidroxietoxi)etoxi]etoxi]acetato de bencilo como un aceite incoloro con un rendimiento del 13 % y un 99,0 % de pureza (% del área por HPLC). EM: m/z = 299,1517 (M+H)⁺.

Ejemplo 5b

2-[2-[2-(2-hidroxietoxi)etoxi]etoxi]acetato de bencilo

35



5 Se suspendieron 11,2 g de *tert*-butilato de potasio (100,0 mmol, 0,5 eq.) en 70 ml de 2-metil-2-butanol (ligeramente exotérmica a 35 °C) y, a continuación, se añadieron 30,0 g (200,0 mmol) de 2-[2-(2-hidroxi)etoxi]etoxi]etanol gota a gota en el transcurso de 5 min. El embudo de decantación se enjuagó con 10 ml de 2-metil-2-butanol (aumento de temperatura a 45 °C), la solución se calentó a 60-65 °C, se añadieron 11,6 g (100 mmol, 0,5 eq.) de cloroacetato de sodio y se agitó durante 16 h a 60-65 °C. A continuación, se añadieron 11,9 ml de bromuro de bencilo (100 mmol, 0,5 eq.) y la mezcla se agitó durante otras 16 h a 60-65 °C. La mezcla de reacción se enfrió a t.a. y, a continuación, se trató con 50 ml de agua y se extrajo con 80 ml de TBME y 40 ml de TBME. La capa combinada de TBME se lavó con 10 50 ml de salmuera semisaturada, la capa orgánica se evaporó a 40 °C/300-10 mbar/1 h para obtener 27,0 g en bruto de 2-[2-[2-(2-hidroxi)etoxi]etoxi]etoxi]acetato de bencilo.

15 Después de la cromatografía (270 g de sílice 60 [0,063-0,2 mm], fase móvil: comenzar con acetato de etilo/*n*-heptano 1/1, cuando el producto puro fue visible, la fase móvil se cambió a acetato de etilo al 100 %), se aislaron un total de 11,4 g de 2-[2-[2-(2-hidroxi)etoxi]etoxi]etoxi]acetato de bencilo en forma de aceite casi incoloro con un rendimiento del 19 % (38 % a partir del cloroacetato de sodio) y un 99,0 % de pureza (% del área por HPLC).

Ejemplo 5c

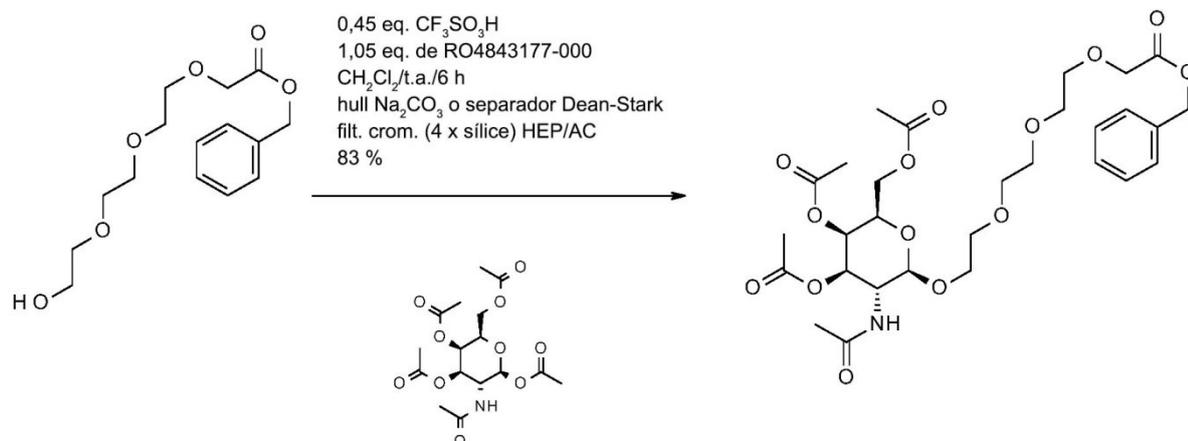
20 2-[2-[2-(2-hidroxi)etoxi]etoxi]etoxi]acetato de bencilo



25 Se disolvieron 40,3 g (200,0 mmol) de clorhidrato de 2-aminoacetato de bencilo en 340 ml de agua y 340 ml de tolueno enfriado a 0-5 °C y, en el transcurso de 60 min, se añadió gota a gota una solución de 16,5 g (240 mmol, 1,2 eq.) de nitrato de sodio en 50 ml de agua a 0-5 °C bajo agitación enérgica. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a 0-5 °C. La capa amarilla de tolueno se separó y se lavó con 340 ml de NaHCO₃ 1 M y 340 ml de salmuera, la capa de tolueno separada se trató con 60 g de sulfato de sodio y se agitó durante 1 hora a 20-25 °C. La suspensión amarilla se filtró y se lavó con 50 ml de tolueno. La solución de tolueno amarilla transparente contiene un máximo de 200,0 mmol de 2-diazoacetato de bencilo (~8,5 % en tolueno). Esta solución se añadió gota a gota en el transcurso de 60 min a una mezcla bien agitada y enfriada a 0-5 °C de 60,0 g (400 mmol) de trietilenglicol y 465 µl (3,67 mmol, 0,02 eq.) de dietileterato de trifluoruro de boro en 170 ml de tolueno en evolución del nitrógeno. La mezcla de reacción amarilla se agitó durante 90 min a 20-25 °C, tras lo cual se formó una solución incolora. La solución se extrajo con 250 ml de salmuera, la capa orgánica separada se secó con 60 g de sulfato de sodio, se filtró, se lavó con 100 ml de tolueno y se evaporó a 40 °C/40-10 mbar/1 h para obtener 49,9 g en bruto de 2-[2-[2-(2-hidroxi)etoxi]etoxi]etoxi]acetato de bencilo. La cromatografía se realizó con un Teledyne Isco CombiFlash (330 g de sílice 60 [0,035-0,070 mm Teledyne Isco Ref. 69-2203-330], fase móvil: gradiente acetona/*n*-heptano de 15/85 a 30/70 en 45 min, tamaño de fracción de 20 ml). La fracción combinada arrojó 33,88 g de 2-[2-[2-(2-hidroxi)etoxi]etoxi]etoxi]acetato de bencilo como un aceite incoloro y con un rendimiento global del 57 % y una pureza del 99,0 % (% del área por HPLC).

Ejemplo 6

45 2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxi]etoxi]etoxi]etoxi]acetato de bencilo

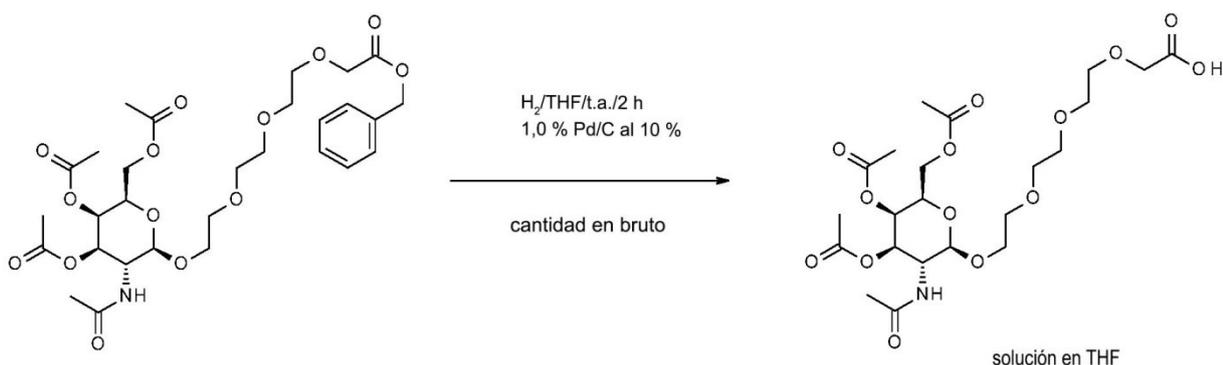


Se disolvieron 268,0 g de 2-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)acetato de bencilo (900 mol) en 2,4 l de diclorometano. Se añadieron 385,0 g de triacetato de (2S,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-6-(acetoximetil)tetrahidro-2H-piran-2,4,5-trilo (990 mmol, 1,1 eq.) y 12,0 ml de ácido trifluorometanosulfónico (135 mmol, 0,15 eq.). La suspensión se calentó a reflujo con un separador Dean-Stark (50 ml, para eliminar el AcOH). Después de 1 h, se añadieron 4,50 ml de ácido trifluorometanosulfónico (50,7 mmol, 0,05 eq.) y 50 ml de diclorometano a la suspensión anaranjada y se descargó el disolvente (50 ml) del separador Dean-Stark. Cada media hora se repitió este procedimiento, hasta un total de 6 veces (3 h). Después de un total de 4,5 h, la solución roja se enfrió a 10-15 °C y se añadió dentro de 30 min a 20-25 °C a una solución de 1,8 l de hidrogenocarbonato de sodio 1 M (1,8 mol, 2,0 eq.; evolución de CO₂, pH 7-8). La capa orgánica amarilla se separó y se evaporó a 40 °C/600-10 mbar/3 h para obtener 585,4 g en bruto de 2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetato de bencilo como un aceite amarillo (pureza por HPLC: 87 %). El producto en bruto se disolvió en 700 ml de acetona y se cargó en una columna de sílice precargada (3,0 kg de sílice 60; 0,063-0,2 mm). La cromatografía se llevó a cabo usando *n*-heptano/acetona como fase móvil (gradiente de 5:1 a 1:2). Las fracciones recogidas combinadas se evaporaron a 40 °C/600-10 mbar y se secaron a 20-25 °C/0,3 mbar/3 h para obtener 465,0 g de 2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidro-piran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetato de bencilo como un aceite amarillo con un rendimiento del 83 % y una pureza del 100 % (% del área por HPLC). EM: m/z = 628,2627 (M+H)⁺.

Ejemplo 7

Ácido

2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acético



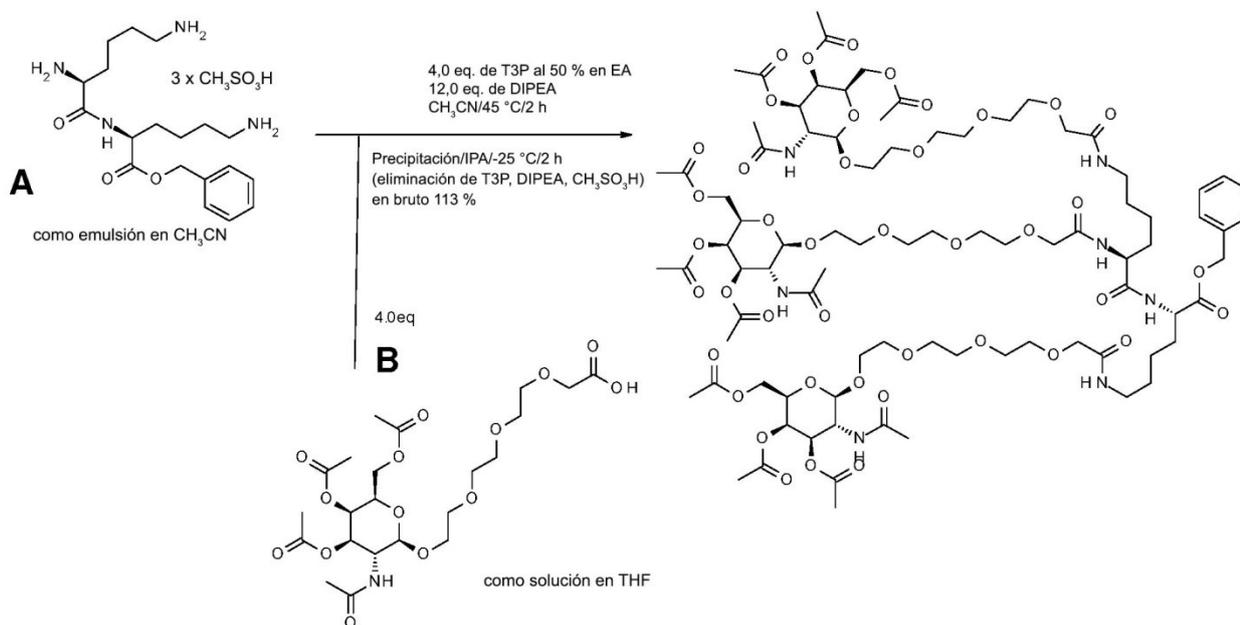
Bajo atmósfera de argón, se disolvieron 456,0 g de 2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidro-piran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetato de bencilo (727 mmol) en 1,4 l de THF. Se añadieron 4,56 g de Pd/C al 10% y la atmósfera de argón se reemplazó por hidrógeno (1 bar). La suspensión negra se hidrogenó a 20-25 °C durante 2 h. La atmósfera de hidrógeno se reemplazó por argón, la suspensión negra se filtró y los residuos de filtración se lavaron por partes con un total de 400 ml de THF. El filtrado incoloro (pureza por HPLC: 71 % y 27 % de tolueno) se usó sin ninguna purificación en la etapa de ensamblaje A+B, ejemplo 8. EM: m/z = 538,2191 (M+H)⁺.

Ensamblaje de los componentes básicos A y B

Ejemplo 8a

(2S)-6-[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]eto

xi]acetil]amino]-2-[[[(2S)-2,6-bis[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropir an-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoato de bencilo



5

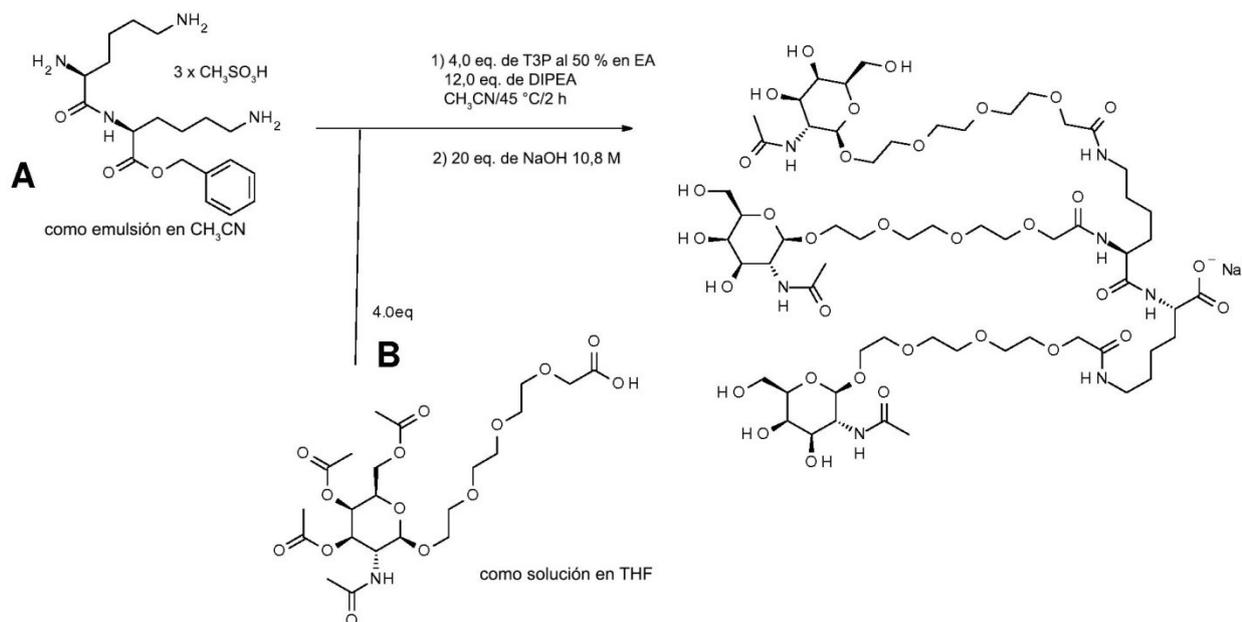
La solución de color rojo anaranjado (~1,4 l) de trimetanosulfonato de (2S)-6-amino-2-[[[(2S)-2,6-diaminohexanoil]amino]hexanoato de bencilo (180,0 mmol) del ejemplo 4 se diluyó con 3,60 l de acetonitrilo. A 20-25 °C, se añadieron 365,0 ml de N-etildisopropilamina (2,16 mol, 12,0 eq.) dentro de 5 min. A la suspensión pegajosa formada se le añadió una solución (~2,25 l) de ácido 2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acético (720 mmol, 4,0 eq.) del ejemplo 7 a 20-25 °C dentro de 10 min, por lo que la temperatura se incrementó ligeramente hasta 40 °C. A 45-50 °C se añadió una solución de 425 ml de anhídrido del ácido *n*-propilfosfónico (T3P, trómero al 50 % en acetato de etilo, 720 mmol, 4,0 eq.) dentro de 10 min. La solución de reacción se agitó durante 1 h a 45-50 °C. La solución de color amarillo claro se enfrió a 20-25 °C y se evaporó a 40 °C/10 mbar/6 h para obtener 1,06 kg en bruto de (2S)-6-[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]-2-[[[(2S)-2,6-bis[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoato de bencilo (pureza por HPLC: 24,1 %). El producto en bruto se precipitó en tres partes para eliminar el ácido metansulfónico, la N-etildisopropilamina y el T3P residual. Se disolvieron 353 g del producto en bruto en 7,0 l de 2-propanol, se enfriaron en 1 h a -25 °C, se agitó durante 1 h a -25 °C, se filtró sobre un filtro de vidrio G3 enfriado previamente (-25 °C; sin enjuague), con una parte del producto precipitado depositado sobre la pared de vidrio del reactor. Todos los precipitados se disolvieron por partes del filtro y de la pared de vidrio con un total de 1,0 l de THF. Las soluciones combinadas se evaporaron a 40 °C/20 mbar/6 h para obtener 390,0 g de (2S)-6-[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]-2-[[[(2S)-2,6-bis[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoato de bencilo (pureza por HPLC: 71,9 %). que se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa. EM: m/z = 1923,8438 (M+H)⁺.

25

Ejemplo 8b

30

(2S)-6-[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]-2-[[[(2S)-2,6-bis[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoato de sodio

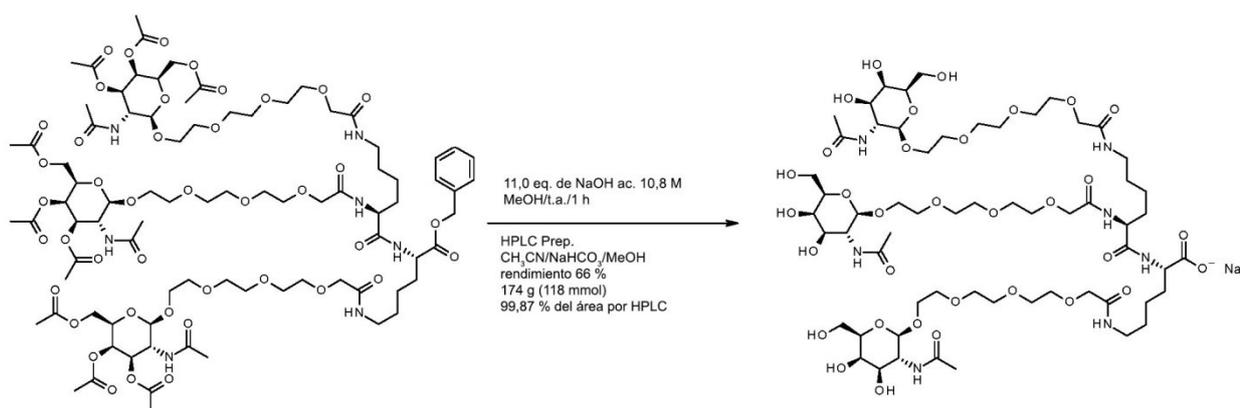


La solución de color rojo anaranjado (~95 ml) de trimetanosulfonato de (2S)-6-amino-2-[[[(2S)-2,6-diaminohexanoil]amino]hexanoato de bencilo (12,2 mmol) se diluyó con 240 ml de acetoniitrilo. A 20-25 °C, se añadieron 30,0 ml de N-etildiisopropilamina (2,16 mol, 14,5 eq.) dentro de 5 min. Para la suspensión pegajosa formada se le añadió una solución (~150 ml) de ácido 2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]-2-[[[(2S)-2,6-bis[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoato de bencilo (pureza por HPLC: 32 % del área).

Se disolvieron 68,0 g (11,0 mmol) del producto en bruto en 340 ml de metanol, se añadieron 20,0 ml (220 mmol, 20 eq.) de NaOH 10,8 M a la solución de color amarillo claro, la temperatura se incrementó hasta 32 °C, la mezcla de reacción se agitó durante 2,5 h a t.a., con lo que se formó una suspensión (pH 12,0). La suspensión se filtró y los residuos de filtración se lavaron con 100,0 ml de metanol, el filtrado se evaporó a 40 °C/250-10 mbar/2 h para obtener 41,5 g de (2S)-6-[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]-2-[[[(2S)-2,6-bis[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoato de sodio que, a continuación, se purificó por cromatografía preparativa de fase inversa, véanse las condiciones en el experimento 9.

Ejemplo 9

(2S)-6-[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]-2-[[[(2S)-2,6-bis[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoato de sodio



5 Se disolvieron 378,0 g (197,0 mmol, en bruto) de (2S)-6-[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]-2-[[[(2S)-2,6-bis[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoato de bencilo en 1,9 l de metanol. Dentro de 10 minutos, se añadieron 200,0 ml de solución de hidróxido de sodio 10,8 M (2,16 mol, 11,0 eq.) a 20-25 °C. De este modo, la temperatura se incrementó hasta 31 °C. La solución de color amarillo claro se agitó durante 2 h a 20-25 °C (pH 13,4) y, a continuación, se añadieron 80,0 ml de solución de cloruro de amonio 5 M (pH 10,7). A continuación, la solución de color amarillo claro se evaporó a 20-25 °C/100-20 mbar/5 h y se secó a 20-0,5 mbar/1 h para obtener 543 g en bruto de (2S)-6-[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]-2-[[[(2S)-2,6-bis[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoato de sodio (pureza por HPLC: 40,1 %) que, a continuación, se purificó por cromatografía preparativa de fase inversa.

15 Columna: Triart C18-120 26 x 15 cm; 10 µm;

Fase móvil: A: NaHCO₃ 2 mM/B: acetonitrilo;

Gradiente:

20

Minutos	A	B	Caudal (ml/min)
0	94	6	700
2	94	6	700
20	88	12	700
20,1	10	90	750
26	10	90	750
26,1	94	6	700
36	94	6	700

Termostato: temperatura ambiente

25 Detección: 220 nm

Solución: 543 g disueltos en 4500 ml de NaHCO₃ 2 mM y filtrados (GF5; = 5000 ml [109 mg/ml])

Solución de muestra/inyección: muestra de 200 µl por serie = 21,8 g (25 series)

30 Concentración: las fracciones combinadas (46 l) se diluyeron con 110 l de agua, esta solución se bombeó en 3 partes a una columna RP C18 y se lavó con agua/MeOH 98/2 y, a continuación, se eluyó con MeOH y se concentró en un evaporador rotatorio para obtener 1,18 kg de solución metanólica. Un cuarto de la solución metanólica de 1,18 kg de la etapa de purificación por HPLC preparativa, es decir, 295 g, se evaporaron a 40 °C/20 mbar/1 h y, a continuación, a 20-25 °C/0,35 mbar/14 h a sequedad para obtener 43,5 g de (2S)-6-[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]-2-[[[(2S)-2,6-bis[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoato de sodio como un polvo blanco amorfo, pureza por HPLC del 99,88 %. Los tres cuartos restantes de la solución anterior (885 g) se usaron en la siguiente etapa. EM: m/z = 1452,684 (M-H)⁻.

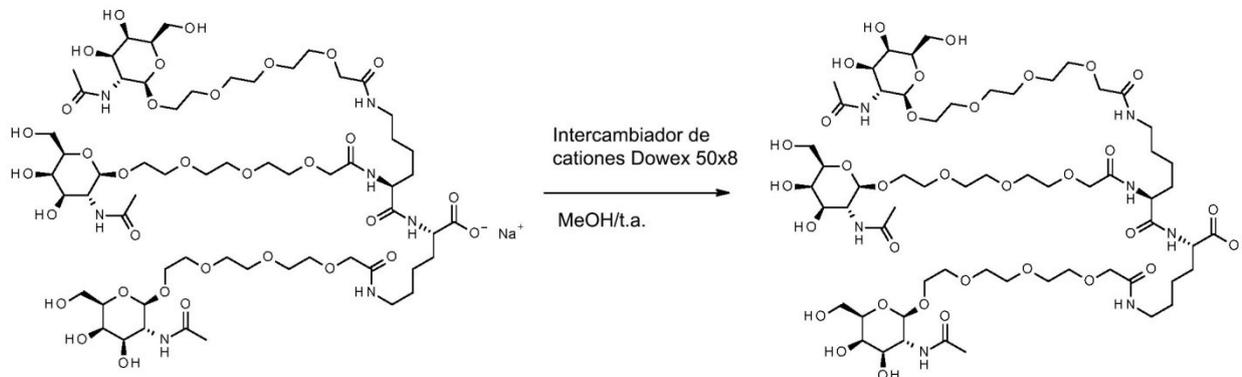
40

Ejemplo 10

Ácido

(2S)-6-[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]-2-[[[(2S)-2,6-bis[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoico

5



10

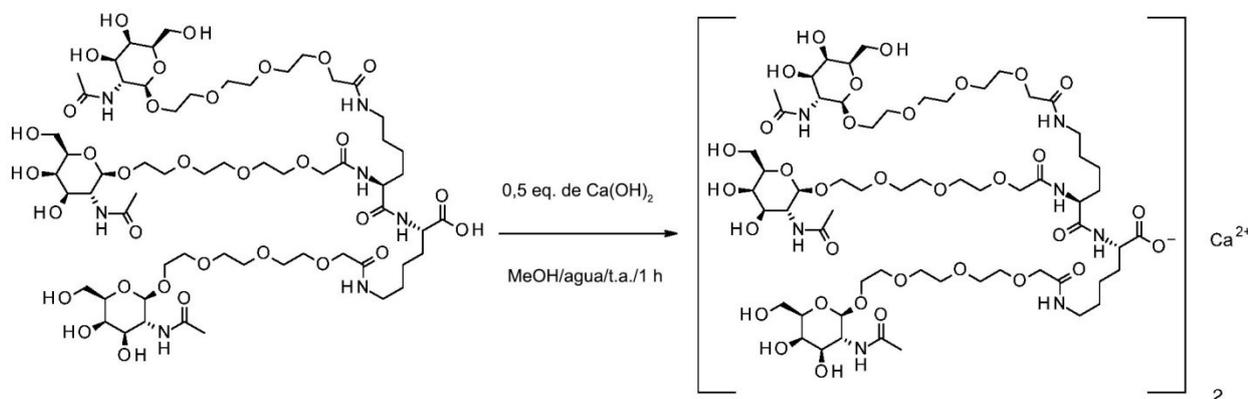
La solución en metanol (885 g) del ejemplo 9 se trató a 20-25 °C con 47,9 g de Dowex (intercambiador de cationes 50x8; conc. de H₃O⁺, 2,57 mmol/g), se agitó durante 1 h (pH 3,1), se filtró y se lavó con 200 ml de metanol. El filtrado se evaporó a 20-25 °C/15-50 mbar y se secó a 20-25 °C/0,01 mbar/2 h para obtener 128,0 g de ácido ((2S)-6-[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]-2-[[[(2S)-2,6-bis[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoico en forma de un polvo blanco amorfo, con una pureza por HPLC del 99,77 %. EM: m/z = 1452,684 (M-H).

15

Ejemplo 11

(2S)-6-[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]-2-[[[(2S)-2,6-bis[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoato de calcio

20



25

Se disolvieron 0,10 g (0,068 mmol) de ácido ((2S)-6-[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]-2-[[[(2S)-2,6-bis[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoico en 3,0 ml de metanol y 0,30 ml de agua, se añadieron 2,60 mg (0,034 mmol, 0,5 eq.) de hidróxido de calcio y la mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La solución turbia clara se evaporó a 40 °C/200-10 mbar/1 h para obtener 0,11 g como un sólido blanco, con una pureza por HPLC del 99,60 %. EM: m/z = 1452,684 (M-H).

30

Conjugación al oligonucleótido

Ejemplo 11 (de acuerdo con el ejemplo 15 de la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 2011/0207799)

35

Se evaporaron conjuntamente 20 mg (0,014 mmol) de ácido ((2S)-6-[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]-2-[[[(2S)-2,6-bis[[2-[2-[2-[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoico (ácido de GalNAc) con piridina y diclorometano. El residuo se disolvió en DMF seco (0,9 ml) y se añadió una solución de N-hidroxisuccinimida (HOSu) en DMF (1,6 mg, 0,014 mmol) mientras se agitaba bajo atmósfera de argón. A 0 °C se añadió lentamente una solución de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) en DMF (3,2 mg, 0,016 mmol). Se

40

dejó que la reacción alcanzara la temperatura ambiente y se agitó durante la noche. El éster N-hidroxisuccinimídico de GalNAc formado se usó sin purificación adicional para la conjugación a ARN.

5 El ARN usado era un ARN aminomodificado que tiene la secuencia: (SEQ ID 1) en la que u y c son los nucleótidos 2'-O-metilo respectivos de las bases correspondientes y s significa fosforotioato.

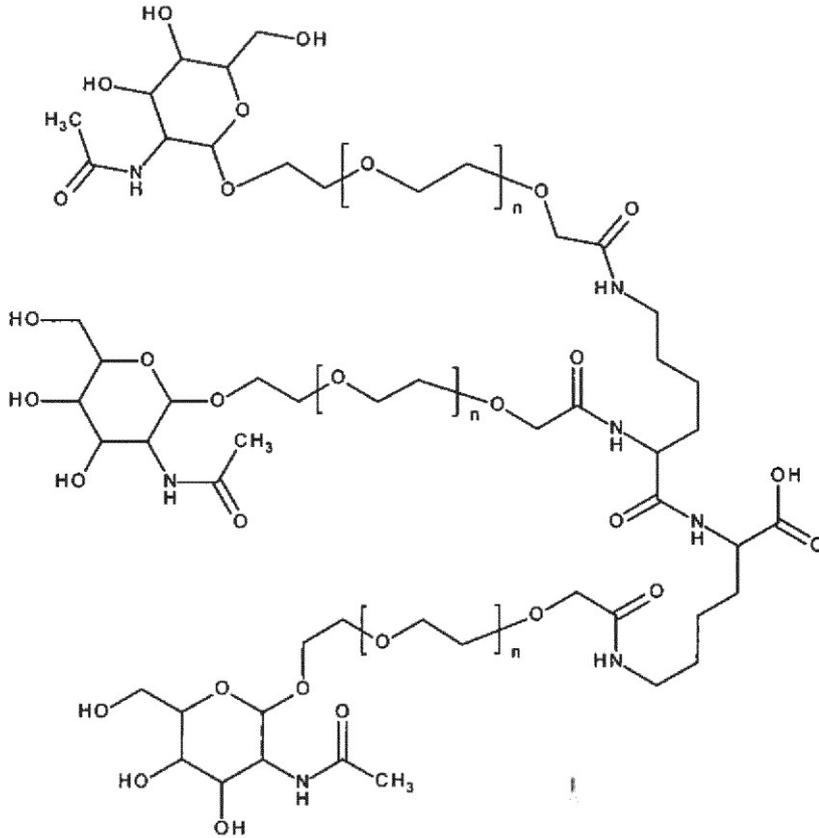
10 El ARN (2,54 μmol) equipado con un conector amino C-6 en el extremo 5' se liofilizó y se disolvió en 250 μL de amortiguador de borato de sodio (0,1 mol/l de borato de sodio, pH 8,5, 0,1 mol/l de KCl) y 1,1 ml de DMSO. Después de la adición de 8 μl de N,N-diisopropiletilamina (DIPEA), se añadió lentamente a la solución de ARN una solución del éster N-hidroxisuccinimídico de GalNAc (teóricamente 0,014 mmol) $5'-(\text{NH}_2\text{C}_6)\text{GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA}-3'$ en DMF bajo agitación continua. La mezcla de reacción se agitó a 35 °C durante la noche. La reacción se controló usando RP-HPLC (Resource RPC 3 ml, amortiguador: A: acetato de trietilamonio 100 mM (TEAA, 2,0 M, pH 7,0) en agua, B: TEAA 100 mM en acetonitrilo al 95 %, gradiente: 5 % B a 22 % B en 20 CV). Después de la precipitación del ARN usando acetato de sodio (3 M) en EtOH a -20 °C, el conjugado de ARN se purificó usando las condiciones descritas anteriormente. Las fracciones puras se agruparon y el conjugado deseado se precipitó usando acetato de sodio/EtOH para dar el conjugado de ARN puro. El conjugado se ha aislado con un rendimiento del 59 % (1,50 μmol). La pureza del conjugado se analizó mediante HPLC de intercambio aniónico (pureza: 85,5 %) y la identidad se confirmó por ESI-MS ($[\text{M}+\text{H}]^{1+}$ calculada: 8374,4; $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$ medida: 8376,0).

15

20

REIVINDICACIONES

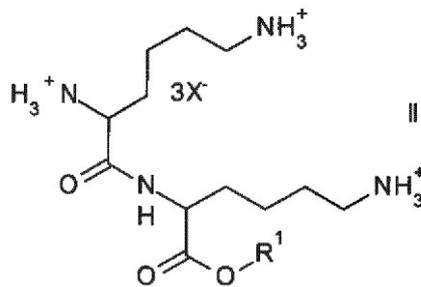
1. Procedimiento para la preparación de derivados ácidos de GalNAc de fórmula I



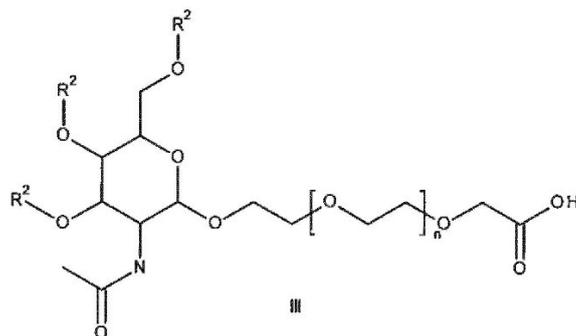
5

en la que n es un número entero entre 0 y 10, y sus sales, sus enantiómeros correspondientes y/o los isómeros ópticos de los mismos, que comprende

10 a) el acoplamiento de una sal triamínica de fórmula II

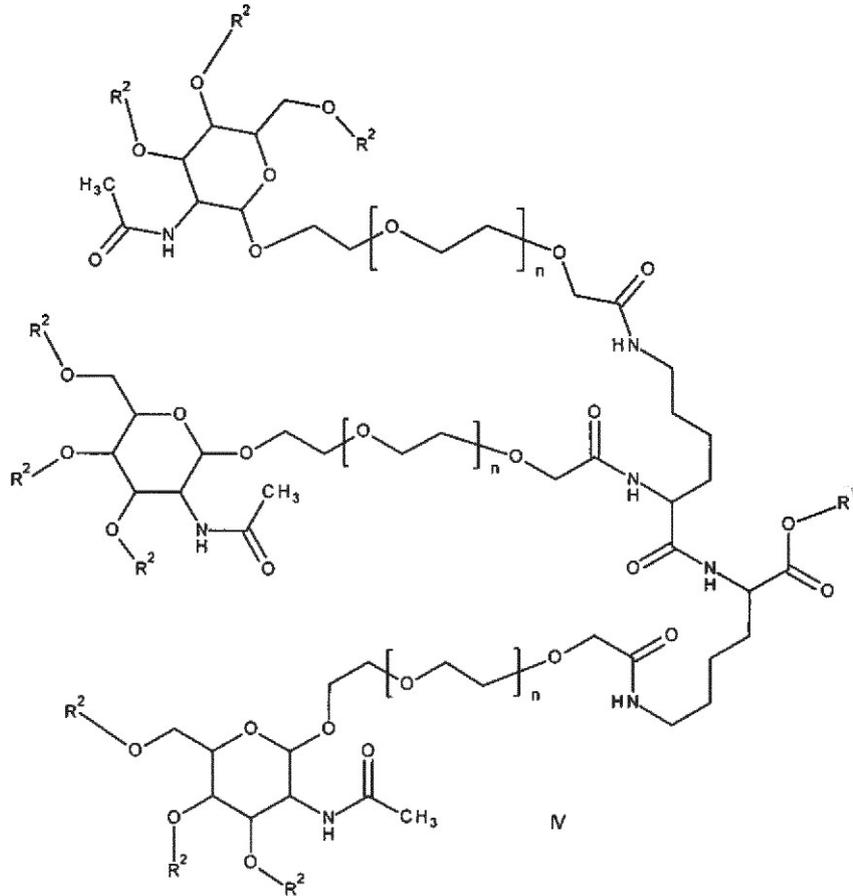


en la que R^1 es un grupo protector de éster y X es un anión de un ácido con un ácido tetrahidropiránico de fórmula III



15

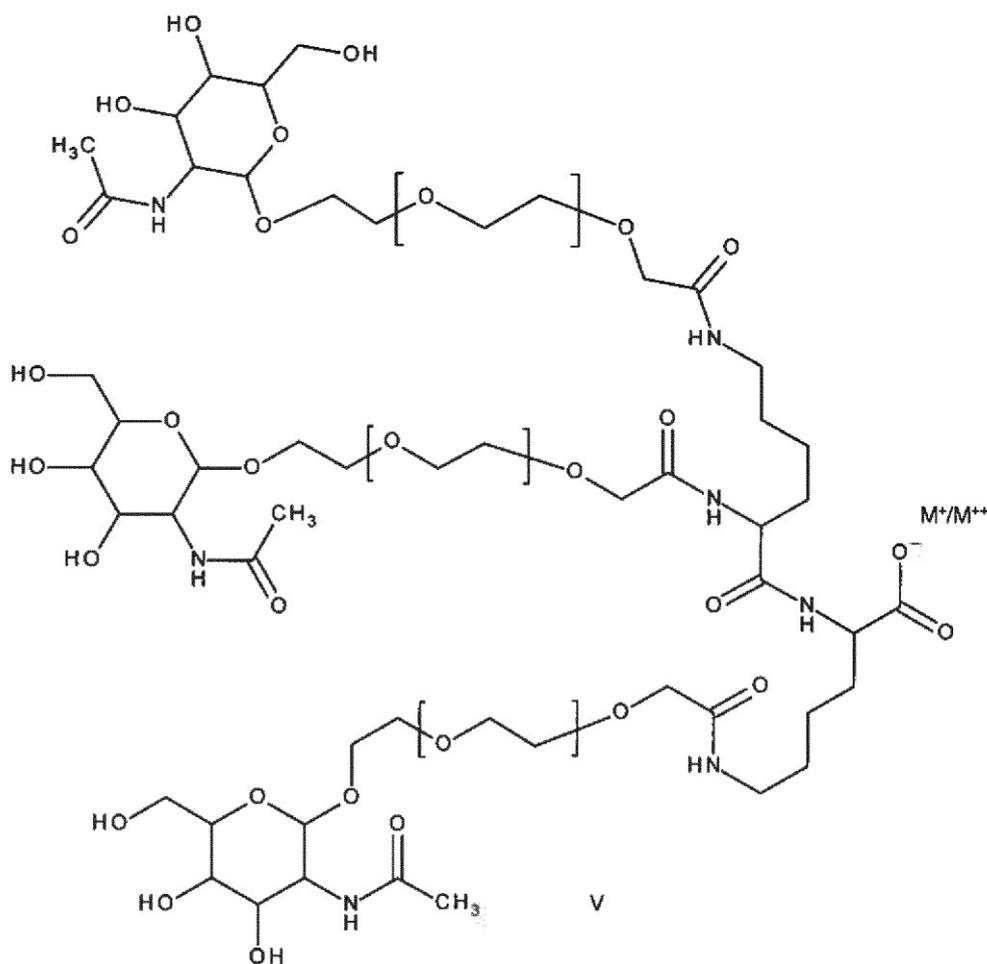
en la que R^2 es un grupo protector de hidroxilo y n es como anteriormente en presencia de un agente de acoplamiento peptídico, una base amínica y un disolvente orgánico para formar el éster de GalNAc de fórmula IV



5

en la que R^1 y R^2 y n son como anteriormente;

10 b) la eliminación del grupo protector de éster R^1 y de los grupos protectores de hidroxilo R^2 en presencia de una base mineral para formar la sal ácida de GalNAc de fórmula V



en la que n es como anteriormente y M es un catión metálico;

5 y

c) opcionalmente, la transformación de la sal ácida de GalNAc de fórmula V, en el derivado ácido de GalNAc de fórmula I.

10 2. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que n es un número entero entre 0 y 5 y el grupo protector de éster R¹ es alquilo C₁₋₇ o fenil-alquilo C₁₋₇, en el que el grupo fenilo está opcionalmente sustituido por halógeno o alquilo C₁₋₇, el grupo protector de hidroxilo R² es acetilo y X se selecciona del anión de un ácido sulfónico.

15 3. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el agente de acoplamiento peptídico es anhídrido del ácido *n*-propilfosfónico y la base amínica es una amina terciaria.

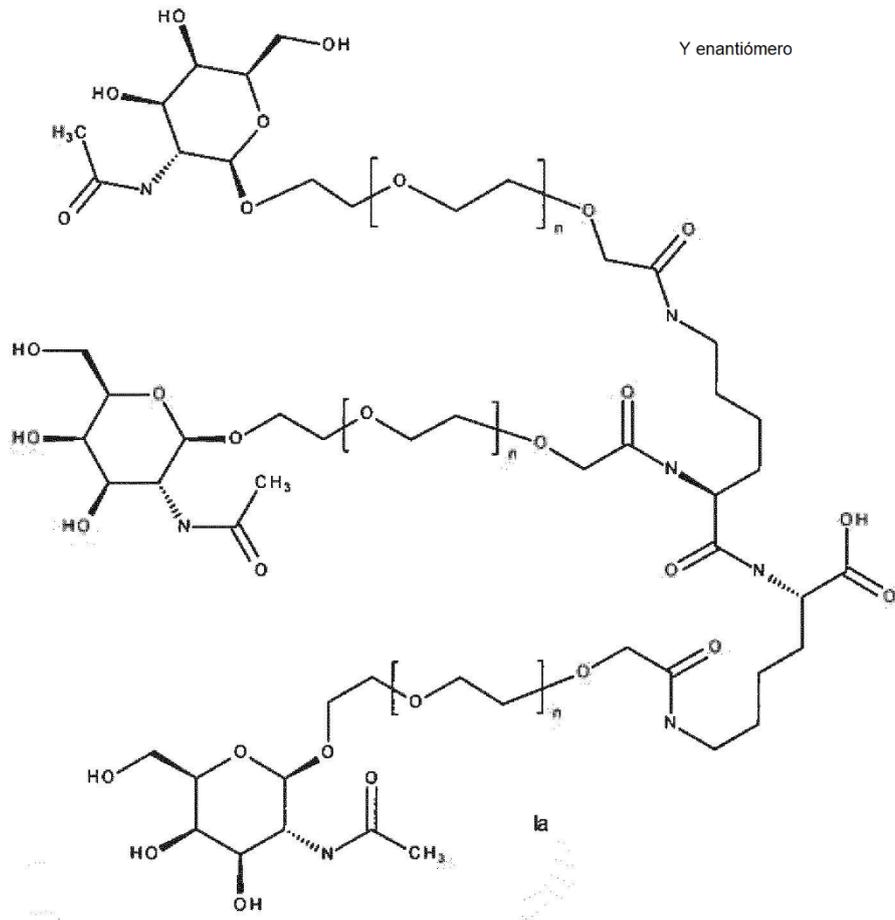
4. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el acoplamiento en la etapa a) tiene lugar en un disolvente orgánico que es un disolvente aprótico polar a una temperatura de reacción de 20 °C a 70 °C.

20 5. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la base mineral para la eliminación del grupo protector de éster R¹ en la etapa b) es un hidróxido alcalino.

6. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las etapas a) y b) se combinan y se realizan en una etapa sin aislar el éster de GalNAc de fórmula V.

25 7. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la transformación opcional de la sal ácida de GalNAc de fórmula V, en el derivado ácido de GalNAc de fórmula I se realiza por medio de intercambio catiónico o por medio de tratamiento con un ácido.

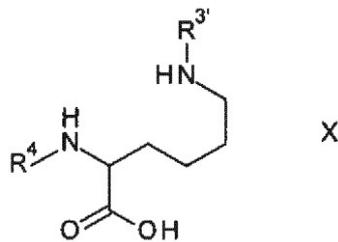
30 8. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el derivado ácido de GalNAc de fórmula I es un enantiómero de fórmula Ia.



en el que n es como anteriormente o una sal, un enantiómero correspondiente y/o un isómero óptico del mismo.

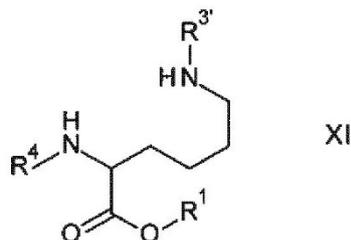
5 9. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento para producir la triamina de fórmula II comprende las etapas de:

a1) transformación del ácido carboxílico de fórmula X



10

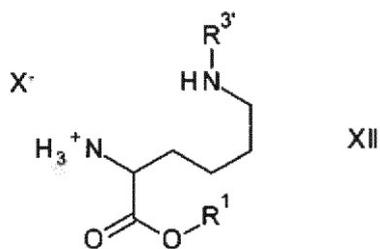
en la que R³ y R⁴ son diferentes e independientes entre sí y son grupos protectores de amino, en un éster de fórmula XI



15

en la que R¹ es un grupo protector de éster y R³ y R⁴ son como anteriormente;

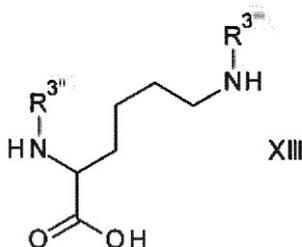
b1) eliminación del grupo protector de amino R⁴ y posteriormente formación de una sal amínica de fórmula XII



5

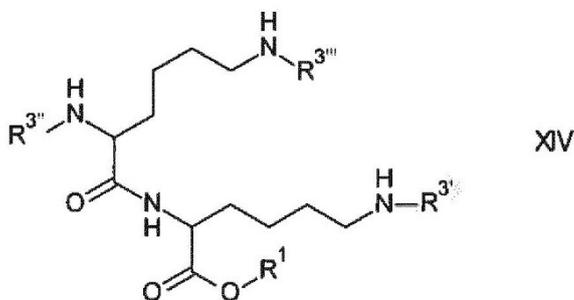
en la que R¹ y R^{3'} son como anteriormente y X es un anión ácido;

c1) acoplamiento de la sal amínica de fórmula XII con un derivado de ácido hexanoico de fórmula XIII



10

en la que R^{3''} y R^{3'''} son grupos protectores de amino, para formar la triamina protegida de fórmula XIV



15

en la que R^{3'}, R^{3''}, R^{3'''} y R¹ son como anteriormente;

d1) conversión de la triamina protegida de fórmula XIV, con un ácido, en la sal triamínica de fórmula II.

20 10. Procedimiento de la reivindicación 9, en el que R^{3'}, R^{3''} y R^{3'''} son grupos protectores iguales que se pueden escindir en condiciones ácidas y R⁴ es un grupo protector que se puede escindir en condiciones básicas o por medio de hidrogenólisis.

25 11. Procedimiento de la reivindicación 10, en el que R^{3'}, R^{3''} y R^{3'''} son Boc y R⁴ es FMOC.

12. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la transformación en la etapa a1) tiene lugar con alcohol bencílico en presencia de un agente activador, un catalizador de aminas y un disolvente orgánico aprótico a una temperatura de reacción de 20 °C a 50 °C.

30 13. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el grupo protector de amino R⁴ es FMOC y su eliminación en la etapa b1) se realiza con una amina alifática secundaria en un disolvente aprótico polar a una temperatura de reacción de 20 °C a 50 °C.

35 14. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la formación posterior de la sal amínica de fórmula XII en la etapa b1) se efectúa con un ácido sulfónico.

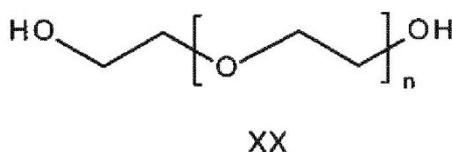
15. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el acoplamiento en la etapa c1) se realiza con anhídrido del ácido *n*-propilfosfónico como agente de acoplamiento en presencia de una amina terciaria y un disolvente aprótico polar a una temperatura de reacción de 20 °C a 50 °C.

5 16. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que en la etapa d1) la sal triamínica de fórmula II se forma con un ácido sulfónico en un disolvente aprótico polar a una temperatura de reacción de 20 °C a 80 °C.

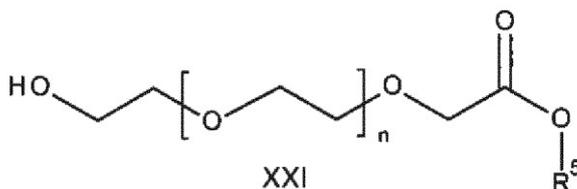
10 17. Procedimiento de la reivindicación 16, en el que se selecciona un disolvente aprótico polar que impide la cristalización de la sal triamínica de fórmula II.

18. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento para producir el ácido tetrahidropiránico de fórmula III comprende:

15 a2) la transformación del diol de fórmula XX

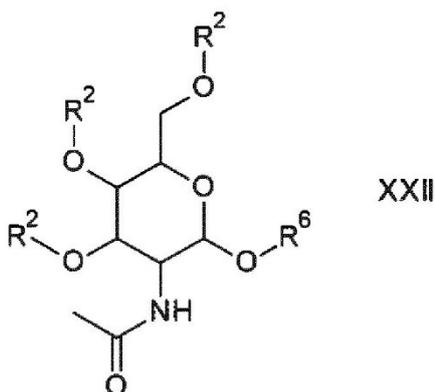


20 en la que n es como anteriormente, en el éster alcohólico de fórmula XXI

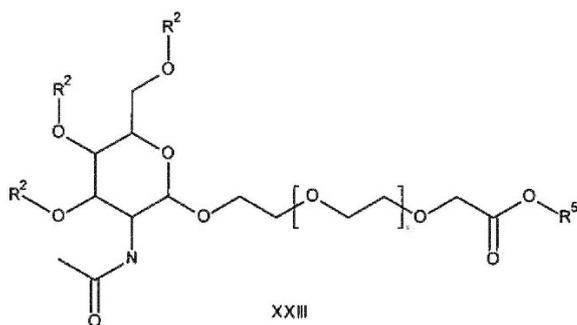


en la que n es como anteriormente y R⁵ es un grupo protector de éster;

25 b2) el acoplamiento del éster alcohólico de fórmula XXI con un derivado tetrahidropiránico de fórmula XXII



30 en la que R² y R⁶ independientes entre sí son grupos protectores de hidroxilo para formar un éster tetrahidropiránico de fórmula XXIII



en la que n, R² y R⁵ son como anteriormente;

5 c2) la eliminación del grupo estérico para formar el ácido tetrahidropiránico de fórmula III.

19. Procedimiento de la reivindicación 18, en el que el grupo protector de hidroxilo R² es acetilo, el grupo protector de éster R⁵ es bencilo y el grupo protector de hidroxilo R⁶ es acetilo.

10 20. Procedimiento de las reivindicaciones 18 o 19, en el que en una primera etapa de la etapa a2) se desprotona el diol de fórmula XX con un alcoholato de metal alcalino en presencia de un disolvente aprótico polar o prótico polar a una temperatura de reacción de 50 °C a 120 °C.

15 21. Procedimiento de las reivindicaciones 18 o 19, en el que en una segunda etapa de la etapa a2) se introduce un resto de ácido acético con un ácido acético halogenado o con una sal del mismo en presencia de un disolvente aprótico polar o prótico polar a una temperatura de reacción de 50 °C a 120 °C.

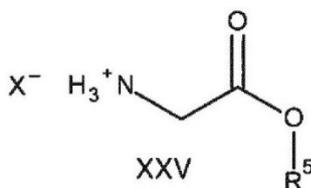
20 22. Procedimiento de las reivindicaciones 18 o 19, en el que en una tercera etapa de la etapa a2) se forma el éster alcohólico de fórmula XXI en la que R⁵ es bencilo con un halogenuro de bencilo o un sulfoniléster de bencilo en un disolvente aprótico polar a una temperatura de reacción de 20 °C a 120 °C.

25 23. Procedimiento de la reivindicación 18 o 19, en el que en la etapa b2) se acopla el éster alcohólico de fórmula XXI con el derivado tetrahidropiránico de fórmula XXII en presencia de un ácido sulfónico halogenado en presencia de un disolvente aprótico polar a una temperatura de reacción de 0 °C a 140 °C.

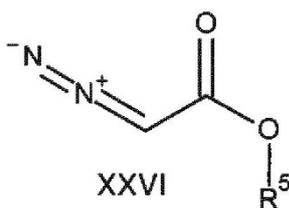
24. Procedimiento de la reivindicación 18 o 19, en el que en la etapa c2) se elimina el grupo benciléster por hidrogenación catalítica con hidrógeno en presencia de un catalizador de hidrogenación.

30 25. Procedimiento de la reivindicación 18, en el que la formación del éster alcohólico de fórmula XXI comprende:

a3) la diazotación de un 2-aminoacetato de fórmula XXV



35 en la que R⁵ es como anteriormente y X es un átomo de halógeno con un nitrito para formar el compuesto 2-diazo de fórmula XXVI



40 en la que R⁵ es como anteriormente; y

b3) la transformación del compuesto 2-diazo de fórmula XXVI con el diol de fórmula XX.

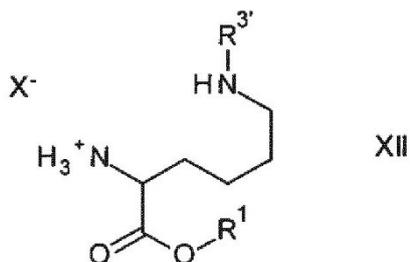
26. Procedimiento de la reivindicación 25, en el que la diazotación en la etapa a3) se realiza con un nitrito alcalino en presencia de una mezcla de disolventes de agua y un disolvente aprótico no polar a una temperatura de reacción de -10 °C a 10 °C.

5

27. Procedimiento de la reivindicación 25 o 26, en el que la transformación del compuesto 2-diazo con el diol de fórmula XX en la etapa b3) se realiza en presencia de un ácido de Lewis y un disolvente aprótico no polar a una temperatura de reacción de -10 °C a 10 °C.

10

28. Sal amínica de fórmula XII



en la que R¹ es bencilo, R^{3'} es Boc y X es el anión del ácido metanosulfónico.

15

29. Procedimiento para la preparación de conjugados de oligonucleótidos con GalNAc que comprende las etapas de:

a3) preparación del derivado ácido de GalNAc de fórmula I o la sal ácida de GalNAc de fórmula V de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 y

20

b3) conjugación del derivado ácido de GalNAc de fórmula I o la sal ácida de GalNAc de fórmula V en condiciones de acoplamiento peptídico con un oligonucleótido.

30. Procedimiento de la reivindicación 29 en el que se usa la sal ácida de GalNAc de fórmula V.