

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490110 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.08.30

(51) Int. Cl. C07H 1/00 (2006.01)  
C07H 1/02 (2006.01)  
C07H 21/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.05.08

---

(54) КОНВЕРГЕНТНЫЕ ЖИДКОФАЗНЫЕ СИНТЕЗЫ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

---

(31) 62/845,160

(32) 2019.05.08

(33) US

(62) 202193010; 2020.05.08

(71) Заявитель:  
БАЙОДЖЕН МА ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Ши Сянлинь, Кисман Уильям Ф.,  
Антиа Фироз, Филлон Янник, Чжоу  
Сюань, Янь Умин, Цзянь Хун, Нгуен  
Хиен, Гронке Роберт С. (US), Ичимару  
Таисуке, Хамагаки Такуя, Такахаша  
Дайсуке (JP)

(74) Представитель:

Костюшенкова М.Ю., Строкова О.В.,  
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М.,  
Джермакян Р.В., Угрюмов В.М. (RU)

---

(57) В изобретении описан конвергентный жидкофазный способ производства олигонуклеотидов путем связывания двух или более олигонуклеотидных фрагментов, каждый из которых имеет два или более нуклеотидов. Данным изобретением также предусмотрены стадии реакции, вовлеченные в конвергентный жидкофазный способ.

---

A2

202490110

202490110

A2

## КОНВЕРГЕНТНЫЕ ЖИДКОФАЗНЫЕ СИНТЕЗЫ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

### РОДСТВЕННАЯ ЗАЯВКА

**[01]** В данной заявке заявлено преимущество даты подачи согласно 35 Кодекса США §119 (e) предварительной заявки США № 62/856160, поданной 8 мая 2019 г., все содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

**[02]** Олигонуклеотиды представляют собой короткие олигомеры ДНК или РНК, которые можно химически синтезировать для широкого спектра применений. Недавние разработки в области использования синтетических олигонуклеотидов в качестве терапевтических агентов увеличили потребность в синтетических методах, которые могут производить олигонуклеотиды в больших количествах с высокой эффективностью и чистотой.

**[03]** Традиционно олигонуклеотиды синтезируются на твердофазном автоматическом синтезаторе, использующем химию фосфорамидита, ограниченную масштабом менее 2 моль. Таким образом, твердофазный синтез недостаточен для производства материалов, необходимых для клинической разработки и коммерциализации олигонуклеотидных препаратов по широким показаниям. Кроме того, твердофазный синтез часто требует использования избытка реагентов и, следовательно, увеличивает стоимость, связанную с получением целевых олигонуклеотидов.

**[04]** Следовательно, существует потребность в надежном способе синтеза олигонуклеотидов, который подходит для крупномасштабного производственного процесса с высокой эффективностью и чистотой.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[05]** В данном раскрытии описан конвергентный жидкофазный процесс производства олигонуклеотидов путем связывания двух или более (*например*, трех, четырех, пяти, шести и т.д.) фрагментов олигонуклеотидов, каждый из которых имеет два или более (*например*, три, четыре, пять, шесть и др.) нуклеотидов. Неожиданно было обнаружено, что конвергентный жидкофазный способ данного раскрытия может быть использован для синтеза защищенных олигонуклеотидов с высокой чистотой без необходимости очистки с помощью хроматографии (*например*, колоночной хроматографии), что делает способ пригодным для использования в крупномасштабном производственном процесс. После снятия защиты и стандартной последующей очистки могут быть получены олигонуклеотиды ASO высокой чистоты, подходящие для терапевтического использования. Данным раскрытием также предусмотрены стадии реакции, вовлеченные в конвергентный жидкофазный способ.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ.

**[06]** ФИГ.1 демонстрирует ВЭЖХ с обращенной фазой и МС соединения **1-7-а**, полученного после аммонолиза продукта соединения **1-7**.

**[07]** ФИГ. 2 демонстрирует ВЭЖХ и МС соединения продукта **2-9**, полученного после осаждения.

**[08]** ФИГ. 3 демонстрирует ВЭЖХ и МС соединения продукта **3-5**, полученного после осаждения.

**[09]** ФИГ. 4 демонстрирует ВЭЖХ и МС соединения продукта **4-9**, полученного после осаждения.

- [010] ФИГ. 5 демонстрирует ВЭЖХ и МС соединения **5-2-а**, полученного после аммонолиза соединения продукта **5-2**.
- [011] ФИГ. 6 демонстрирует ВЭЖХ и МС соединения **5-3-а**, полученного после аммонолиза соединения продукта **5-3**.
- [012] ФИГ. 7 демонстрирует ВЭЖХ и МС соединения **5-5-а**, полученного после аммонолиза соединения продукта **5-5**.
- [013] ФИГ. 8 демонстрирует ВЭЖХ и МС соединения **5-6-а**, полученного после аммонолиза соединения продукта **5-6**.
- [014] FIG. 9 демонстрирует ВЭЖХ и МС соединения **1-а**, полученного после аммонолиза соединения продукта **1**.
- [015] ФИГ.10 демонстрирует сравнение ВЭЖХ продукта дезаминирования, полученного во время реакции детритилирования тримера УСС.
- [016] ФИГ.11 демонстрирует сравнение ВЭЖХ продукта дезаминирования, полученного во время реакции детритилирования димера СС.
- [017] ФИГ.12 демонстрирует ВЭЖХ-МС продукта ASO 9.
- [018] ФИГ. 13 демонстрирует МС 6-мерного DMT-dG-dT-dT-dG-dT-dT-OTBDPS.
- [019] ФИГ. 14 демонстрирует МС 10-мерного DMT-Мое G-Мое U- Мое U-Мое U- Мое U-dT- dT- dG- dT-dT-OTBDPS.
- [020] ФИГ.15 демонстрирует МС соединения **1-3А-Н**.
- [021] ФИГ.16 демонстрирует МС соединения **4-3А-Н**.
- [022] ФИГ.17 демонстрирует МС соединения **5-3А-Н**.
- [023] ФИГ.18 демонстрирует ВЭЖХ и МС 15-мерного 5'-АСоAGATATTTTTGTT-3'-OTBDPS.
- [024] ФИГ.19 демонстрирует ВЭЖХ и МС продукта ASO 8.
- [025] ФИГ. 20 демонстрирует МС 5'-DMT-GUUUUUGCAA-NO<sub>2</sub>-бензоил.
- [026] ФИГ. 21 демонстрирует ВЭЖХ и МС соединения **7-а** со снятой защитой LHPG.
- [027] ФИГ. 22 демонстрирует ВЭЖХ и МС соединения **7-б** со снятой защитой LHPG.
- [028] ФИГ. 23 демонстрирует ВЭЖХ и МС соединения **7-с**. со снятой защитой LHPG
- [029] ФИГ. 24 демонстрирует ВЭЖХ и МС соединения **7-д** со снятой защитой LHPG.
- [030] ФИГ. 25 демонстрирует ВЭЖХ и МС ASO-9-1.
- [031] ФИГ. 26 демонстрирует ВЭЖХ и МС соединения **7-е** со снятой защитой LHPG.
- [032] ФИГ. 27 демонстрирует ВЭЖХ и МС ASO-9-2.
- [033] ФИГ. 28 демонстрирует хиральный SFC- МС **8.4**
- [034] ФИГ. 29 демонстрирует SFC-МС рацемической смеси соединения **8.4**.
- [035] ФИГ. 30 демонстрирует ВЭЖХ и МС соединения **8А**
- [036] ФИГ. 31 демонстрирует ВЭЖХ и МС соединения **8.2.12**.
- [037] ФИГ. 32 демонстрирует ВЭЖХ и МС соединения **8В**.
- [038] ФИГ. 33 демонстрирует ВЭЖХ и МС соединения **8С**.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

**[039]** Авторы данного раскрытия впервые разработали конвергентный жидкофазный способ для получения целевых олигонуклеотидов. Удивительно, но конвергентный жидкофазный способ позволяет производить защищенные целевые олигонуклеотиды в крупном масштабе с высокой чистотой без необходимости хроматографической очистки от сборки олигонуклеотидных фрагментов. Конвергентный жидкофазный способ позволяет производить олигонуклеотиды-мишени за счет удлинения в направлении от 3'-конца к 5'-концу (т. е. удлинение 3'-5') или от 5'-конца к 3'-концу (т. е. удлинение 5'-3'). В данном описании также представлены способы селективного снятия защиты с 3'-гидроксильной защищенной группы, которые не влияют на другие чувствительные группы, для минимизации образования побочных продуктов. Авторы данного раскрытия обнаружили, что присутствие воды в реакции детритилирования может приводить к побочным реакциям дезаминирования (например, дезаминированию цитозина или 5-метилцитозина или их производных, обычно используемых в синтезе олигонуклеотидов). Чтобы уменьшить или предотвратить образование побочного продукта (ов) дезаминирования, были разработаны условия реакции для контроля и минимизации уровня воды, чтобы минимизировать дезаминирование во время стадии детритилирования. Кроме того, также было обнаружено, что применение поглотителя катионов (*например*, RSH) в реакции детритилирования облегчает завершение реакции детритилирования (*т.е.*, реакция проходит быстрее). Присутствие поглотителя катионов также снижает предрасположенность реакции к обратному детритилированию (*т. е.*, защитная группа DMT добавляется обратно к 5'-ОН группе со снятой защитой). Также было продемонстрировано, что фосфитилирование 3'-гидроксильной группы можно проводить в жидкой фазе без очистки хроматографией. Олигонуклеотидные фрагменты с четырьмя или пятью нуклеотидами были успешно синтезированы и связаны с полностью защищенными целевыми олигонуклеотидами в жидкой фазе с использованием способов данного раскрытия. Обычно жидкофазные процессы, описанные в данном раскрытии, можно использовать для синтеза больших количеств желаемых защищенных нуклеотидных или олигонуклеотидных продуктов без хроматографической очистки. После снятия защиты и стандартной последующей очистки получают олигонуклеотиды ASO высокой чистоты, подходящие для терапевтического применения.

#### *Определения*

**[040]** Термин «нуклеоснование» означает гетероциклическую основную часть нуклеозида. Нуклеоснования могут встречаться в природе или могут быть модифицированы. В некоторых вариантах реализации нуклеоснование может содержать любой атом или группу атомов, способных образовывать водородную связь с нуклеоснованием другой нуклеиновой кислоты. В частности, нуклеоснование представляет собой гетероциклическое основание, обычно пурины и пиримидины. Помимо «немодифицированных» или «естественных» нуклеоснований, таких как пуриновые нуклеиновые основания аденин (A) и гуанин (G), и пиримидиновые нуклеиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U), многие модифицированные нуклеоснования или нуклеоснования миметики, известные специалистам в данной области, можно включать в соединения, синтезированные описанным в данном документе способом. В определенных вариантах реализации модифицированное нуклеоснование представляет собой нуклеоснование, которое по структуре довольно похоже на исходное нуклеоснование, такое как, например, 7-дезазапурин, 5-метилцитозин или G-зажим. В определенных вариантах реализации миметик нуклеоснований включает более сложные структуры, такие как, например, трициклический феноксазиновый миметик нуклеоснований. Способы получения указанных выше модифицированных нуклеоснований хорошо известны специалистам в данной области.

**[041]** Термин «нуклеозид» означает соединение, содержащее фрагмент гетероциклического основания и фрагмент сахара, которые могут быть модифицированы на 2'-конце.

**[042]** Термин «нуклеотид» означает нуклеозид, содержащий фосфатную, тиофосфатную или дитиофосфатную связывающую группу.

**[043]** Термин «олигонуклеотид» относится к соединению, содержащему множество связанных нуклеозидов. В определенных вариантах реализации один или несколько нуклеозидов из множества модифицированы. В определенных вариантах реализации олигонуклеотид содержит один или несколько рибонуклеозидов (РНК) и/или дезоксирибонуклеозидов (ДНК).

**[044]** Используемый в данном документе термин «целевой олигонуклеотид» относится к олигонуклеотидному продукту, который может быть получен с помощью конвергентного жидкофазного способа согласно данному раскрытию. В определенных вариантах реализации целевой олигонуклеотид содержит по меньшей мере 10 или по меньшей мере 15 нуклеотидов. В определенных вариантах реализации целевой олигонуклеотид содержит от 10 до 500, от 15 до 500, от 15 до 200, от 15 до 100, от 15 до 50, от 15 до 40, от 15 до 30 или от 16 до 30 нуклеотидов.

**[045]** Используемый в данном документе термин «конвергентный синтез» относится к процессу синтеза целевого олигонуклеотида, в котором два или более олигонуклеотидных фрагмента собираются либо в направлении 5'-3', либо в направлении 3'-5'.

**[046]** Используемый в данном документе термин «олигонуклеотидные фрагменты» относится к коротким олигонуклеотидам, которые собираются для образования целевого олигонуклеотида. В определенных вариантах реализации олигонуклеотидный фрагмент содержит от 3 до 10, от 3 до 8, от 3 до 6 или от 4 до 6 нуклеотидов. В определенных вариантах реализации олигонуклеотидный фрагмент содержит 4 или 5 нуклеотидов.

**[047]** Термин «межнуклеозидная связь» означает ковалентную связь между соседними нуклеозидами олигонуклеотида.

**[048]** Термин «гэпмер» означает химерное бессмысловое соединение, в котором внутренняя область, имеющая множество нуклеозидов, поддерживающих расщепление РНКазой Н, расположена между внешними областями, содержащими один или несколько нуклеозидов, при этом нуклеозиды, составляющие внутреннюю область, химически отличаются от нуклеозида или нуклеозидов, составляющих внешние области.

**[049]** Используемый в данном документе термин «алкил» относится к полностью насыщенному разветвленному или неразветвленному углеводородному фрагменту. Предпочтительно алкил содержит от 1 до 20 атомов углерода, более предпочтительно от 1 до 16 атомов углерода, от 1 до 10 атомов углерода, от 1 до 6 атомов углерода или от 1 до 4 атомов углерода. В некоторых вариантах реализации алкил содержит от 6 до 20 атомов углерода. Типичные примеры алкила включают, но не ограничиваются ими, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, н-пентил, изопентил, неопентил, н-гексил, 3-метилгексил, 2,2-диметилпентил, 2,3-диметилпентил, н-гептил, н-октил, н-нонил или н-децил.

**[050]** Термин «арил» относится к моноциклическим, бициклическим или трициклическим ароматическим углеводородным группам, имеющим от 6 до 14 атомов углерода в кольцевой части. В одном варианте реализации термин арил относится к моноциклическим и бициклическим ароматическим углеводородным группам, имеющим от 6 до 10 атомов углерода. Типичные примеры арильных групп включают фенил, нафтил, флуоренил и антраценил.

**[051]** Термин «арил» также относится к бициклической или трициклической группе, в которой по меньшей мере одно кольцо является ароматическим и конденсировано с одним или двумя неароматическими углеводородными кольцами. Неограничивающие примеры включают тетрагидронафталин, дигидронафталин и инданил.

**[052]** Необязательные заместители как для алкильной, так и для арильной группы в каждом случае независимо выбраны из C<sub>1-6</sub>алкила, C<sub>2-6</sub>алкенила, C<sub>2-6</sub>алкинила, 3-7-членного карбоциклила, 3-7-членного гетероциклила, галогена, -CN, -C(O)R<sup>a</sup>, -C(O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -C(O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, -OR<sup>a</sup>, -N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, -N(R<sup>a</sup>)C(O)R<sup>a</sup>, -N(R<sup>a</sup>)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -N(R<sup>a</sup>)C(O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -N(R<sup>a</sup>)C(O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, -N(R<sup>a</sup>)S(O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SR<sup>a</sup>, -S(O)R<sup>a</sup>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -S(O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, и -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>; и

**[053]** R<sup>a</sup> в каждом случае независимо выбран из H, C<sub>1-6</sub>алкила, 3-6-членного моноциклического карбоциклила и 3-6-членного моноциклического гетероциклила.

**[054]** Используемый в данном документе термин «карбоциклил» относится к насыщенным или ненасыщенным моноциклическим или бициклическим углеводородным группам из 3-7 атомов углерода, 3-6 или 5-7 атомов углерода. Термин «карбоциклил» включает циклоалкильные группы и ароматические группы. Термин «циклоалкил» относится к полностью насыщенным моноциклическим или бициклическим углеводородным группам из 3-7 атомов углерода, 3-6 атомов углерода или 5-7 атомов углерода. Примеры моноциклических карбоциклильных групп включают, но не ограничиваются ими, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклопропенил, циклобутенил, циклопентенил, циклогексенил, циклогептенил, циклобутаденил, циклопентаденил, циклогексаденил, циклогептаденил, фенил и циклогептатриенил циклопентил. Примеры бициклических карбоциклильных групп включают бицикло[2.1.1]гексил, бицикло[2.2.1]гептил, бицикло[2.2.1]гептенил, трицикло[2.2.1.0<sup>2,6</sup>]гептанил, 6,6-диметилбицикло[3.1.1]гептил или 2,6,6-триметилбицикло[3.1.1]гептил, спиро[2.2]пентанил и спиро[3.3]гептанил.

**[055]** Термин «мостиковая кольцевая система», используемый в данном документе, означает кольцевую систему, которая имеет карбоциклильное или гетероциклильное кольцо, в которой два несмежных атома кольца соединены (соединены мостиком) одним или несколькими атомами (предпочтительно от одного до трех), выбранными из C, N, O или S. Мостиковая кольцевая система может иметь от 6 до 7 кольцевых членов.

**[056]** Используемый в данном документе термин «спиро-кольцевая система» означает кольцевую систему, которая имеет два кольца, каждое из которых независимо выбрано из карбоциклила или гетероциклила, причем две кольцевые структуры имеют один общий кольцевой атом. Спиرو-кольцевые системы имеют от 5 до 7 членов кольца.

**[057]** Используемый в данном документе термин «гетероциклил» относится к насыщенной или ненасыщенной, моноциклической или бициклической (например, мостиковые или спиро-кольцевые системы) кольцевой системе, которая имеет от 3 до 7 членов в кольце, или, в частности, от 3 до 6 членов в кольце или от 5 до 7 членов в кольце, по крайней мере один из которых является гетероатомом, и до 4 (например, 1, 2, 3 или 4) из которых могут быть гетероатомами, где гетероатомы независимо выбраны из O, S и N, и где C может быть окислен (например, C(O)), N может быть окислен (например, N(O)) или кватернизован, а S может быть необязательно окислен до сульфоксида и сульфона. Ненасыщенные гетероциклические кольца включают гетероарильные кольца. Используемый в данном документе термин «гетероарил» относится к ароматической 5- или 6-членной моноциклической кольцевой системе, имеющей от 1 до 4 гетероатомов, независимо выбранных из O, S и N, и в которой N может быть окисленным (например, N(O)) или кватернизованным, и S может быть необязательно окислен до сульфоксида и сульфона. В одном варианте реализации гетероциклил представляет собой 3-7-членное насыщенное моноциклическое или 3-6-

членное насыщенное моноциклическое или 5-7-членное насыщенное моноциклическое кольцо. В одном варианте реализации гетероциклического представляет собой 3-7-членное моноциклическое или 3-6-членное моноциклическое или 5-7-членное моноциклическое кольцо. В другом варианте гетероциклического представляет собой 6- или 7-членное бициклическое кольцо. Гетероциклическая группа может быть присоединена к гетероатому или атому углерода. Примеры гетероциклических включают азиридины, оксираны, тираны, оксазиридины, диоксираны, азетидины, оксетаны, тиепаны, пирролидины, тетрагидрофураны, тиоланы, имидазолы, пиразолы, оксазолы, изоксазолы, тиазолы, изотиазолы, диоксоланы, дитиоланы, оксатиоланы, пиперидины, тетрагидропиранины, тианы, пиперазины, морфолины, тиоморфолины, диоксаны, дитианы, триоксаны, тритианы, азепаны, оксепаны, тиепаны, дигидрофураны, имидазолы, дигидропиранины, и гетероарильные кольца, включая азирины, оксирены, тирины, диазирины, азетилы, оксетилы, тиетил, пирролы, фураны, тиофены (или тиены), имидазолы, пиразолы, оксазолы, изоксазолы, тиазолы, изотиазолы, фуразаны, оксадиазолы, тиадиазолы, дитиазолы, триазолы, тетразолы, пиридины, пиранины, тиопиранины, пиразины, пиримидины, пиридазины, оксазины, тиазины, диоксины, дитиины, оксатины, триазины, тетразины, азепины, оксепины, тиепины, диазепины и тиазепины и т.п. Примеры бициклических гетероциклических кольцевых систем включают 3-азабицикло[3.1.0]гексаны, 3-азабицикло[3.1.1]гептаны, 2-азаспиро[3.3]гептаны, 2-окса-6-азаспиро[3.3]гептаны и 5-азаспиро[2.3]гексаны.

**[058]** «Галоген» или «галоген» может означать фтор, хлор, бром или йод.

**[059]** Используемый в данном документе термин «практически безводный» относится к содержанию воды около 1000 частей на миллион (частей на миллион) или меньше, предпочтительно 500 частей на миллион или меньше, более предпочтительно 100 частей на миллион или меньше. Содержание воды составляет 500-1000 частей на миллион, 100-500 частей на миллион, 50-100 частей на миллион или менее 50 частей на миллион. Органический раствор или растворитель делают по существу безводным с помощью осушающих агентов или азеотропного удаления воды (азеотропная перегонка).

**[060]** Используемый в данном документе термин «осушающий агент» относится к химическому реагенту, используемому для удаления воды из органического растворителя или органического соединения, или раствора органических соединений. Можно использовать любые подходящие осушители. Примеры осушающих агентов включают, но не ограничиваются ими, хлорид кальция, хлорид калия, сульфат натрия, сульфат кальция, сульфат магния или молекулярные сита. В некоторых вариантах реализации молекулярные сита имеют размер 3Å или 4Å.

**[061]** Используемый в данном документе термин «гидроксильная защитная группа» относится к группе, которая подходит для защиты гидроксильной группы -ОН от взаимодействия с другими реагентами. Примеры гидроксильных защитных групп можно найти в Greene, TW et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4-е изд., John Wiley and Sons (2007).

**[062]** В некоторых вариантах реализации гидроксильные защитные группы могут быть выбраны, например, из ацетила (Ac); бензоила (Bz); бензила (Bn); β-метоксиэтоксиметилового эфира (MEM); метоксиметилового эфира (MOM); метокситритил [(4-метоксифенил)дифенилметила, ММТ]; пара-метоксибензилового эфира (PMB); метилтиометилового эфира; пивалоила (Piv); тетрагидропиранила (THP); тетрагидрофурана (ТГФ); силилового эфира (включая, но не ограничиваясь ими, триметилсилил (TMS), трет-бутилдифенилсилил (TBDPS), трет-бутилдиметилсилил (TBDMS), три-изопропилсилилоксиметил (TOM) и триизопропилсилиловый (TIPS) эфиры); метиловые эфиры и этоксиэтиловые эфиры (EE).

**[063]** В определенных вариантах реализации гидроксильная защитная группа защищает 3'-гидроксил нуклеозида (называемый 3'-гидроксильной защитной группой). В определенных вариантах реализации 3'-гидроксильные защитные группы включают силилгидроксильную защитную группу, такую как триметилсилил, триэтилсилил, триизопропилсилил, диметилизопропилсилил, диэтилизопропилсилил, диметилтексилсилил, трет-бутилдиметилсилил, трет-бутилдифенилсилил, трибензилсилил, три-п-ксилилсилил, трифенилсилил, дифенилметилсилил, ди-трет-бутилметилсилил, три(триметилсилил)силил, трет-бутилметоксифенилсилил и трет-бутоксидифенилсилил. В определенных вариантах реализации 3'-гидроксильная защитная группа представляет собой TBDPS. В определенных вариантах реализации 3'-гидроксильная защитная группа представляет собой большую гидрофобную защитную группу (LHPG), такую как описанные в данном документе.

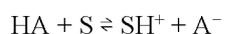
**[064]** В определенных вариантах реализации гидроксильная защитная группа защищает 5'-гидроксил нуклеозида (называемый 5'-гидроксильной защитной группой). Примеры 5'-гидроксильных групп включают, но не ограничиваются ими, как описано в данном документе (*например*, R<sup>15</sup> в любом из аспектов или вариантов реализации). В конкретном варианте реализации 5'-гидроксильная защитная группа представляет собой неустойчивую к кислотам 4,4'-диметокситригил (или бис-(4-метоксифенил)фенилметил) (DMT или DMTr) защитную группу. В определенных вариантах реализации 5'-гидроксильная защитная группа представляет собой большую гидрофобную защитную группу (LHPG), такую как описанные в данном документе.

**[065]** Используемый в данном документе термин «азеотропная дистилляция» относится к удалению воды из органического раствора или растворителя путем дистилляции с использованием агента разделения материалов. Агент разделения материалов включает, но не ограничивается ими, бензол, толуол.

**[066]** Используемый в данном документе термин «селективное осаждение» относится к методу очистки, при котором желаемый продукт отделяется от одной или нескольких примесей в растворе путем добавления раствора к растворителю, который осаждает продукт, оставляя одну или несколько примесей в растворе. Как альтернативный вариант, растворитель может быть добавлен к раствору, содержащему неочищенный продукт и одну или несколько примесей, для осаждения продукта. В определенных вариантах реализации желаемое соединение или олигонуклеотид по данному раскрытию содержит гидрофобную группу (*например*, гидрофобную 3'-гидроксильную защитную группу или гидрофобную 5'-гидроксильную защитную группу (*например*, группу LHPG, описанную в данном документе)) и добавление полярного растворителя (*например*, CH<sub>3</sub>CN в раствор, содержащий соединение или олигонуклеотид и одну или несколько примесей, для осаждения желаемого олигонуклеотида. В определенных вариантах реализации желаемое соединение или олигонуклеотид по данному раскрытию может быть очищено путем добавления соразтворителя или смеси растворителей (*например*, гептана, трет-бутилметилового эфира (ТБТЭ или МБТЭ), смеси гептан/МБТЭ (*например*, смеси гептан/МБТЭ) с объемным соотношением гептана к МБТЭ в диапазоне от 20:1 до 1:20, от 9:1 до 1:9 или от 4:1 до 1:4, или смесь гептан/МБТЭ с объемным соотношением гептана к МБТЭ, равным 9:1, 4:1, 2:1, 1:1, 2:5, 1:2, 1:4 или 1:9) к раствору, содержащему неочищенный продукт и одну или несколько примесей в органическом растворителе (*например*, дихлорметан (DCM) или этилацетат (EtOAc)) для осаждения продукта. Как альтернативный вариант, раствор, содержащий неочищенный продукт и одну или несколько примесей, может быть добавлен к неполярному или менее полярному растворителю или смеси растворителей для осаждения продукта. Подходящий соразтворитель можно определить на основании гидрофобности продукта. В определенных вариантах реализации соразтворитель менее полярен, чем органический растворитель, в котором растворен продукт.

**[067]** Используемый в данном документе термин «экстракция» относится к методу очистки, при котором желаемый продукт отделяется от одной или нескольких примесей в растворе путем контактирования раствора с растворителем, в котором растворяется продукт; в то время как одна или несколько примесей нерастворимы. Как альтернативный вариант, раствор, содержащий продукт и одну или несколько примесей, может контактировать с растворителем, в котором растворимы одна или несколько примесей; пока продукт нерастворим. В определенных вариантах реализации раствор (*например*, реакционная смесь или раствор неочищенного продукта), содержащий продукт и одну или несколько примесей в органическом растворителе (*например*, DCM, EtOAc или ТГФ) или смеси органических растворителей, может контактировать (экстрагироваться или промываться) водой или водным раствором (*например*, раствором NaHCO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O или раствором NaCl/H<sub>2</sub>O) для удаления гидрофильных примесей.

**[068]** Используемый в данном документе термин «сильная кислота» относится к кислоте, которая полностью диссоциирует в растворах, как показано ниже:



S представляет собой молекулу растворителя. Примеры сильной кислоты включают, но не ограничиваются ими, HCl, HBr, HI, трифлатную кислоту, перхлорную кислоту, CCl<sub>3</sub>COOH, CHCl<sub>2</sub>COOH и CH<sub>2</sub>ClCOOH. В определенных вариантах реализации сильная кислота представляет собой сильную органическую кислоту, такую как CF<sub>3</sub>COOH, CHCl<sub>2</sub>COOH и CH<sub>2</sub>ClCOOH.

**[069]** Используемый в данном документе термин «основание» относится к веществу, которое может продуцировать гидроксид-ион (OH<sup>-</sup>) в водных растворах, или к веществу, которое может отдавать пару несвязывающих электронов. Примеры оснований включают, но не ограничиваются ими, гидроксид щелочного металла, гидроксид щелочноземельного металла, алкиламины (*например*, трет-бутиламин, втор-бутиламин, триметиламин, триэтиламин, диизопропилэтиламин, 2-метилпропан-2-амин), 8-диазабицикло [5.4.0]ундец-7-ен (DBU), имидазол, N-метилимидазол, пиридин и 3-пиколин.

**[070]** Используемый в данном документе термин «соль» относится к органической или неорганической соли соединения, нуклеотида или олигонуклеотида, описанного в данном документе. В определенных вариантах реализации соль представляет собой его фармацевтически приемлемую соль. Фраза «фармацевтически приемлемый» указывает на то, что вещество или композиция должны быть химически и/или токсикологически совместимыми с другими ингредиентами, входящими в состав, и/или с млекопитающим, которое лечится ими. В определенных вариантах реализации соль соединения, нуклеотида или олигонуклеотида, описанного в данном документе, представляет собой натриевую соль, калиевую соль или соль аммония. В определенных вариантах реализации соль представляет собой натриевую соль или соль аммония.

### **Способы данного раскрытия**

#### **I. Синтез фрагментов:**

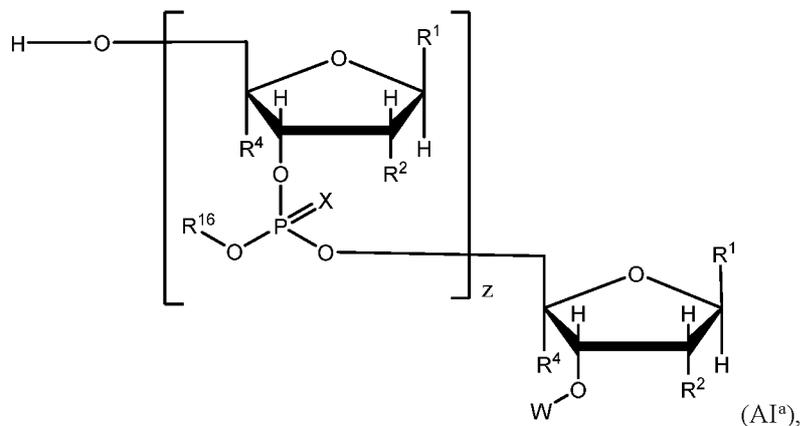
**[071]** Описанный в данном документе способ включает поэтапное добавление нуклеотидов в жидкой (растворной) фазе с образованием желаемых олигонуклеотидных фрагментов. В определенных вариантах реализации каждое добавление нуклеотида включает по меньшей мере три реакции (связывание, сульфуризацию или окисление и снятие защиты) для добавления нуклеотида к растущему олигонуклеотиду. Во-первых, 5' конец первого нуклеотида соединяется с 3' концом второго нуклеотида с образованием димера. Затем димер сульфурится или окисляется с образованием фосфотиоата (*т.е.*, связи P=S) или

фосфодиэфира (*m.e.*, связи P=O) Затем с 5'-гидроксильной группы второго нуклеотида снимается защита и процесс повторяется для добавления следующего нуклеозида.

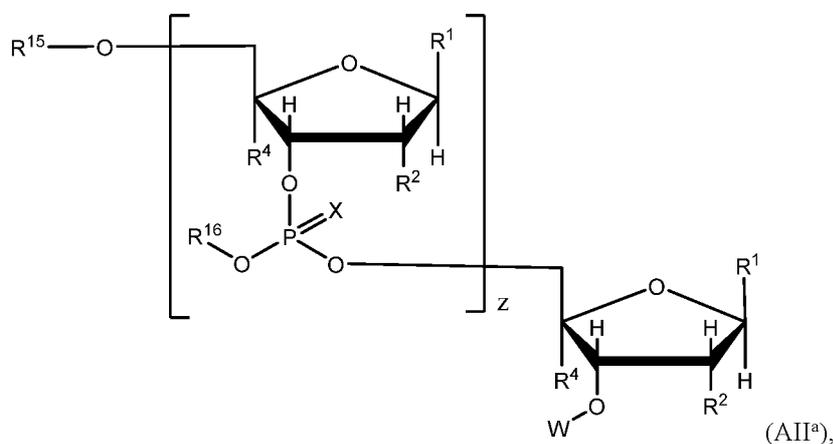
*a. 5'-Реакции снятия защиты:*

**[072]** В первом аспекте данное раскрытие обеспечивает способ снятия защиты для удаления 5'-гидроксильной защитной группы на нуклеotide, нуклеозиде или олигонуклеotide. В одном варианте реализации способ снятия защиты представляет собой способ детритилирования для удаления 5'-тритильной группы. Обнаружено, что, когда реакция детритилирования проводится в безводных или практически безводных условиях, может быть достигнуто значительное уменьшение побочных реакций (*например*, дезаминирования нуклеоснований цитозина или 5-метилцитозина или их производных, обычно используемых для синтеза олигонуклеотидов) (см. Пример 3). Данный способ детритилирования также включает добавление поглотителя катионов для облегчения завершения реакции. В результате продукт с высокой чистотой может быть получен без необходимости хроматографии (*например*, колоночной хроматографии). Уровень воды в реакции детритилирования можно контролировать с помощью осушителя (*например*, молекулярных сит), азеотропной дистилляции или других подходящих методов, известных в данной области. Как альтернативный вариант, растворители, кислоты и другие реагенты, используемые в реакции детритилирования, субстраты, которые должны быть подвергнуты реакции детритилирования, и реакционная емкость могут быть высушены до уровня остаточной воды перед использованием в реакции детритилирования.

**[073]** Первый вариант реализации первого аспекта представляет собой жидкофазный способ получения соединения формулы (AI<sup>a</sup>):



или его соли, включающий снятие защиты с соединения формулы (AII<sup>a</sup>):



или его соли, в котором реакцию снятия защиты проводят в безводном или по существу безводном растворе и в котором:

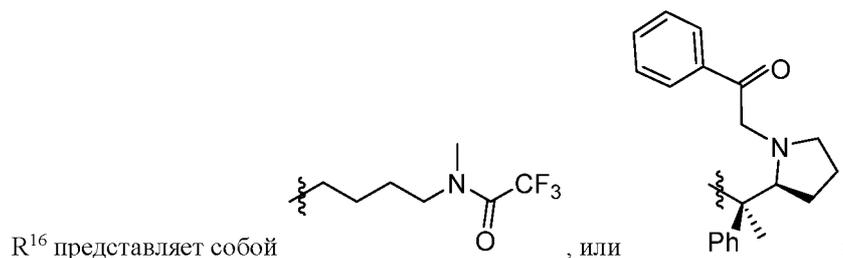
$R^1$  в каждом случае независимо представляет собой нуклеобазу, где  $NH_2$  нуклеобазы, если присутствует, защищено аминозащитной группой;

$R^2$ , в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и  $C_{1-6}$ -алкокси, необязательно замещенного  $C_{1-6}$ -алкокси;

$R^4$  в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой  $R^2$ ;

$R^{15}$  представляет собой защитную группу гидроксила;

$R^{16}$  в каждом случае независимо представляет собой  $C_{1-6}$ -алкильную группу,  $C_{2-6}$ -алкенильную группу, фенильную или бензильную группу, каждая из которых необязательно замещена  $-CN$ ,  $-NO_2$  или галогеном; или



$Z$  равно 0 или целому числу от 1 до 200;

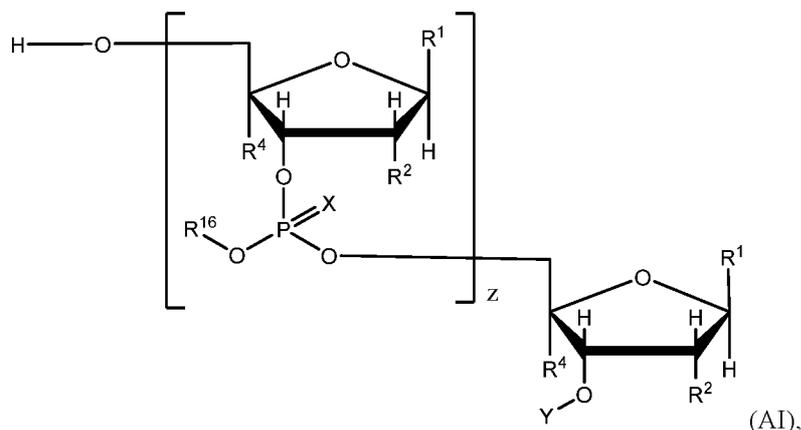
$X$  в каждом случае независимо представляет собой O или S;

$W$  представляет собой H, Y или Z;

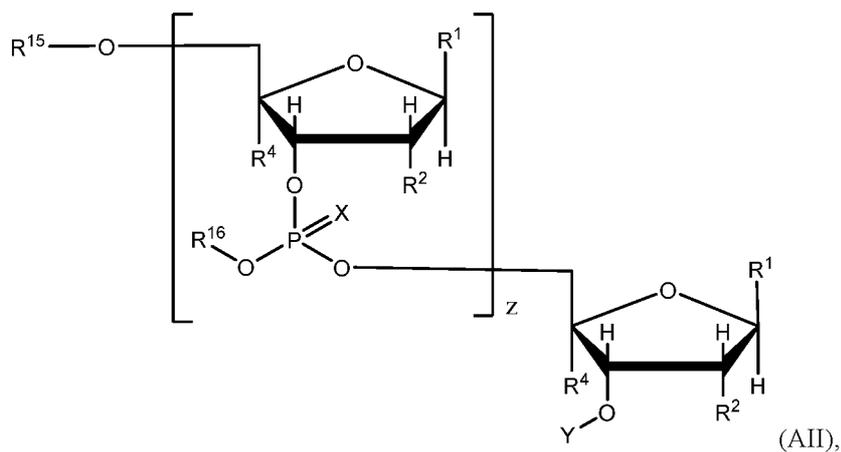
$Y$  представляет собой гидрофобную защитную группу гидроксила, содержащую алкильную цепь; и

$Z$  представляет собой защитную группу гидроксила.

**[074]** Первый вариант реализации первого аспекта также включает жидкофазный способ получения соединения формулы (AI):

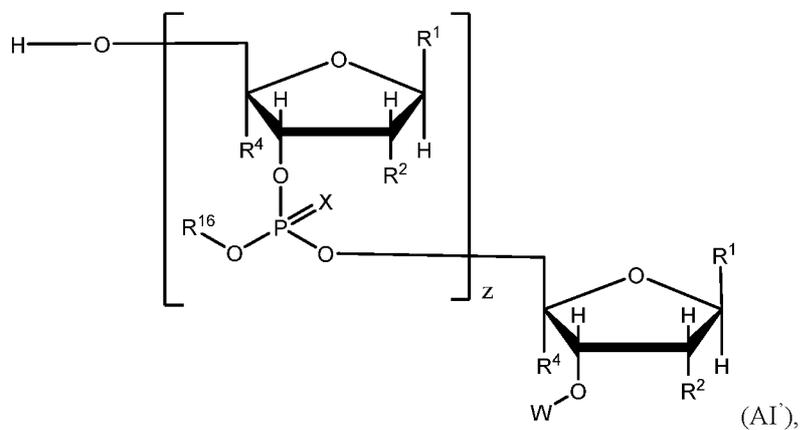


или его соли, включающий снятие защиты с соединения формулы (AII):

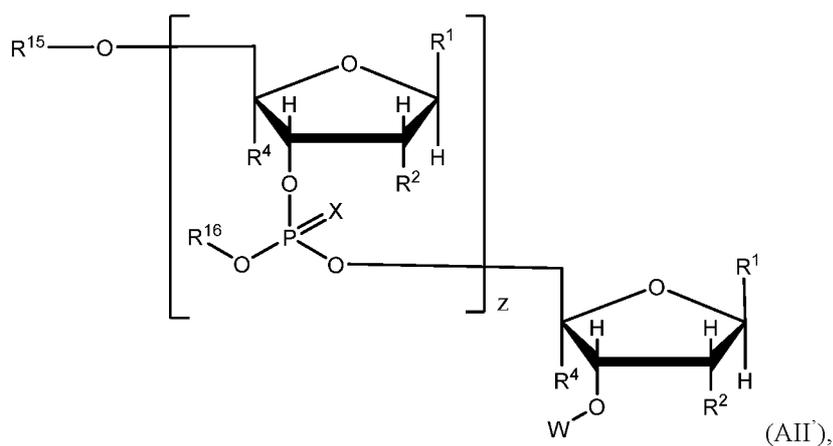


или его соли, в которой реакцию снятия защиты проводят в безводном или по существу безводном растворе и в котором переменные такие, как определено выше для формул (AI<sup>a</sup>) и (AII<sup>a</sup>).

**[075]** Также в первый вариант реализации включен жидкофазный способ получения соединения формулы (AI<sup>z</sup>):

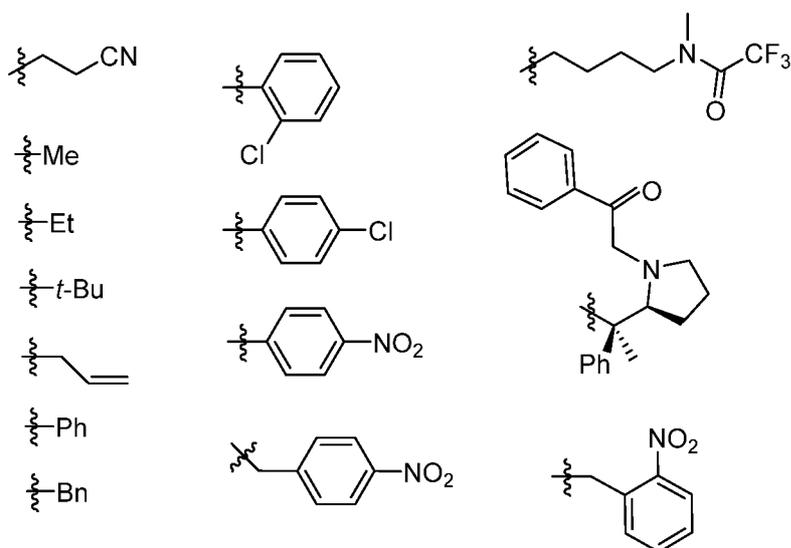


или его соли, включающий снятие защиты с соединения формулы (AII<sup>z</sup>):



или его соли, в которой реакцию снятия защиты проводят в безводном или по существу безводном растворе и где W представляет собой H или Z; Z представляет собой силилгидроксильную защитную группу; а остальные переменные такие, как определено выше для формул (AI<sup>a</sup>) и (AII<sup>a</sup>).

**[076]** В конкретном варианте реализации R<sup>16</sup> является одним из следующих:



См. *Nat Biotechnol.* 2017 Sep;35(9):845-851; *J. Org. Chem.* 1999, 64, 7515-7522; *Biopolymers (Peptide Science)*, 2001, 60, 3, каждый из которых включен в данный документ в качестве ссылки.

**[077]** Во втором варианте реализации реакцию снятия защиты проводят в присутствии осушающего агента. В реакции снятия защиты можно использовать любые подходящие осушающие агенты. В некоторых вариантах реализации осушающий агент выбран из хлорида кальция, хлорида калия, сульфата натрия, сульфата кальция, сульфата магния и молекулярных сит.

**[078]** В третьем варианте осушающий агент, используемый во втором варианте, представляет собой молекулярные сита.

**[079]** В четвертом варианте размер молекулярных сит третьего варианта составляет 3Å или 4Å. В предпочтительном варианте размер молекулярных сит составляет 3Å.

**[080]** В пятом варианте реализации безводный или по существу безводный раствор для реакции снятия защиты получают путем удаления воды с использованием азеотропной дистилляции перед реакцией снятия защиты.

**[081]** Как альтернативный вариант, растворители, кислоты или растворы кислот и другие реагенты или растворы, содержащие реагенты, которые будут использоваться в реакции детритилирования, субстраты или растворы субстратов, которые должны быть подвергнуты реакции детритилирования, и реакционная емкость может быть высушена по отдельности или вместе взятые перед реакцией детритилирования.

**[082]** В шестом варианте реализации реакцию снятия защиты проводят в присутствии поглотителя, выбранного из поглотителя катионов, содержащего группу -SH, силанового поглотителя (такого как HSiPh<sub>3</sub>, HSiBu<sub>3</sub>, триизопропилсилана и т. д.), силоксана, полистирола, фурана, пиррола и индола.

**[083]** В конкретном варианте реализации реакцию снятия защиты проводят в присутствии поглотителя, выбранного из 1-додекантиола, циклогексантиола, 1-октантиола, триизопропилсилана, индола, 2,3-диметилфурана, дифенилсилана, 2-меркаптоимидазола, дифенилметилсилана, фенилсилана, 5-метоксииндола, метилфенилсилана, хлордиметилсилана, 1,1,3,3-тетраметилдисилоксана, 1-тиоглицерина, трифенилсилана, *трет*-бутилдиметилсилана, бутилсилана, метилдиэтоксисилана, 1,1,3,3,5,5-гексаметилтрисилоксана, гексилсилана, (меркаптометил)полистирола или диметилфенилсилана.

**[084]** В седьмом варианте реализации поглотитель катионов шестого варианта реализации представляет собой соединение формулы RSH, где R представляет собой алкил, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил или гетероарильную группу, каждая из которых необязательно замещена.

[085] В восьмом варианте реализации группа RSH седьмого варианта реализации представляет собой  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{SH}$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SH}$ , циклогексантиол ( $\text{C}_6\text{SH}$ ), или  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ .

[086] Девятый вариант реализации данного раскрытия представляет собой способ, описанный в любом из вариантов с первого по восьмой, где  $\text{R}^{15}$  представляет собой 4,4'-диметокситритильную (DMT) группу.

[087] В десятом варианте реализации реакцию снятия защиты проводят путем взаимодействия соединения формулы (AII) с реагентом детритилирования. Можно использовать любые подходящие осушители.

[088] В одиннадцатом варианте реализации реагент детритилирования десятого варианта реализации представляет собой сильную органическую кислоту.

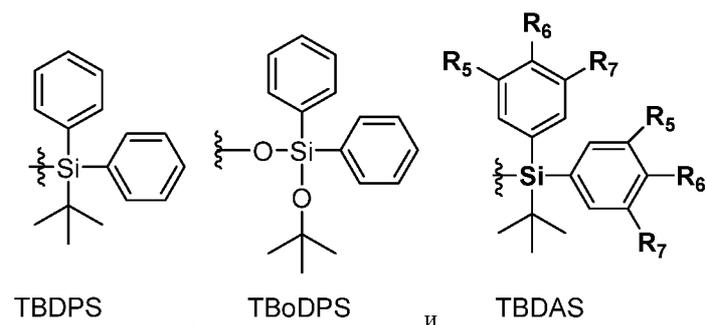
[089] В двенадцатом варианте реализации реагент детритилирования выбран из  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CHCl}_2\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{ClCOOH}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , метансульфоновой кислоты (MSA), бензолсульфоновой кислоты (BSA),  $\text{CClF}_2\text{COOH}$ ,  $\text{CHF}_2\text{COOH}$ ,  $\text{PhSO}_2\text{H}$  (фенилсульфиновая кислота) и т.д. В предпочтительном варианте реализации реагентом детритилирования является  $\text{CH}_2\text{ClCOOH}$ . В другом конкретном варианте реализации реагентом детритилирования является  $\text{CF}_3\text{COOH}$ . В еще одном конкретном варианте реализации реагентом детритилирования является  $\text{CHCl}_2\text{COOH}$ .

[090] В определенных вариантах реализации реагент детритилирования представляет собой лимонную кислоту. В определенных вариантах реализации реагент детритилирования представляет собой насыщенный раствор лимонной кислоты.

[091] Тринадцатый вариант реализации первого аспекта представляет собой способ, описанный в любом из раскрытых выше вариантов реализации, где W представляет собой Z.

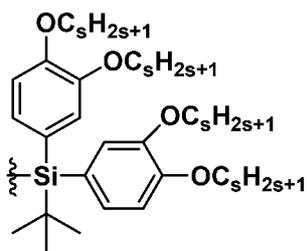
[092] В четырнадцатом варианте реализации группа Z представляет собой силильную защитную группу гидроксила. Примеры силильных защитных групп включают, но не ограничиваются ими, триметилсилил, триэтилсилил, триизопропилсилил, диметилизопропилсилил, диэтилизопропилсилил, диметилтексилсилил, трет-бутилдиметилсилил, трет-бутилдифенилсилил, трибензилсилил, три-п-ксилилсилил, трифенилсилил, дифенилметилсилил, ди-трет-бутилметилсилил, три(триметилсилил)силил, трет-бутилметоксифенилсилил и трет-бутоксифенил.

[093] В пятнадцатом варианте реализации силилгидроксильная защитная группа четырнадцатого варианта реализации выбрана из TBDPS, TBoDPS и TBDAS.



где каждый из  $\text{R}_5$ ,  $\text{R}_6$  и  $\text{R}_7$  независимо представляет собой H,  $\text{C}_{1-30}$ алкил или  $\text{C}_{1-30}$ алкокси.

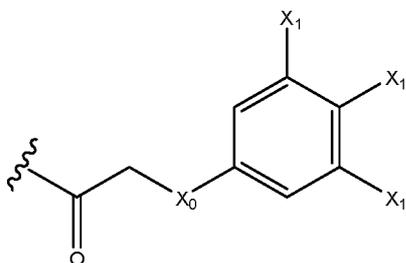
[094] В шестнадцатом варианте реализации силильная защитная группа четырнадцатого варианта реализации представляет собой:



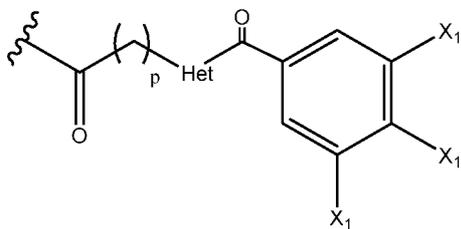
где  $s$  равно целому числу от 1 до 30.

[095] В семнадцатом варианте реализации  $Z$ -группа четырнадцатого варианта реализации представляет собой TBDPS.

[096] Восемнадцатый вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из вариантов с первого по двенадцатый, где  $W$  представляет собой  $Y$ , представленный следующей формулой:

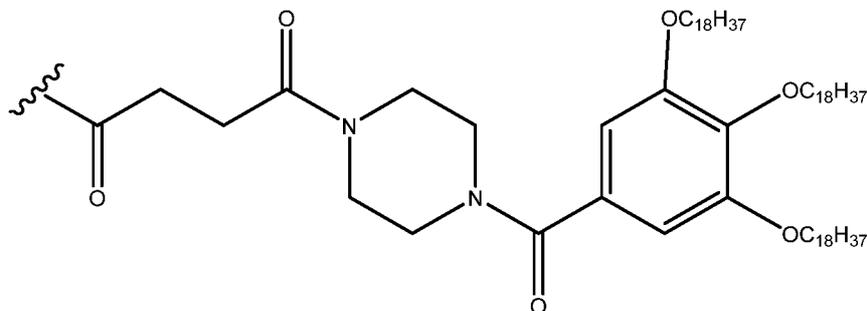


где  $X_0$  представляет собой  $C_{1-10}$ алкил, где одна или более групп  $CH_2$  независимо замещены  $C(O)$ ,  $C(O)NH_2$ , циклоалкильной или гетероциклической группой; и  $X_1$  представляет собой  $C_{1-25}$ алкил или  $C_{1-25}$ алкокси. В конкретном варианте реализации  $Y$  представлен следующей формулой:



где  $p$  равно целому числу от 1 до 10;  $Het$  представляет собой насыщенный гетероцикл; а остальные переменные такие, как описано выше. В более конкретном варианте реализации  $Het$  представляет собой пиперазин.

[097] В девятнадцатом варианте реализации  $Y$  восемнадцатого варианта реализации представлен следующей формулой:



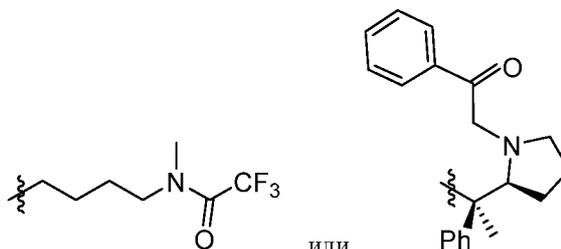
**[098]** Двадцатый вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из вариантов реализации с первого по девятнадцатый, в котором соединение формулы (AI) или (AI') или его соль не очищается с помощью хроматографии (*например*, колоночной хроматографии).

**[099]** Двадцать первый вариант реализации раскрывает способ, описанный в вариантах реализации с первого по двадцатый, в котором соединение формулы (AI) или (AI') или его соль очищают селективным осаждением и/или экстракцией. В определенном варианте реализации соединение формулы (AI) или его соль очищают селективным осаждением. В определенных вариантах реализации селективное осаждение соединения формулы (AI) или его соли может быть достигнуто путем добавления ацетонитрила к раствору сырого продукта в ДХМ. В альтернативном варианте реализации раствор сырого продукта можно добавить в ацетонитрил для осаждения желаемого продукта.

**[0100]** В некоторых вариантах реализации соединение формулы (AI') или его соль очищают селективным осаждением. В определенных вариантах реализации соединение формулы (AI') или его соль очищают экстракцией раствора, содержащего соединение формулы (AI') или его соль, в органическом растворителе (МБТЭ, EtOAc, смесь гептан/МБТЭ, ДХМ и т. д.) с водным раствором (*например*, NaHCO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O или NaCl/H<sub>2</sub>O) в дополнение к селективному осаждению. В определенных вариантах реализации экстракцию проводят перед селективным осаждением. В альтернативном варианте экстракцию проводят после селективного осаждения. В определенных вариантах реализации селективное осаждение соединения формулы (AI') или его соли может быть достигнуто путем добавления гептана или смеси гептан/МБТЭ к раствору сырого продукта в ДХМ или EtOAc. В альтернативном варианте раствор сырого продукта можно добавить в гептан или смесь гептан/МБТЭ для осаждения желаемого продукта. Можно использовать смесь гептан/МБТЭ с подходящим объемным соотношением (*например*, объемным соотношением, описанным в данном документе).

**[0101]** В некоторых вариантах реализации для способов первого аспекта или любых вариантов реализации, описанных в нем (*например*, способа, описанного в любом из вариантов с первого по двадцать первый), z равно от 1 до 150, от 1 до 100, от 1 до 50, от 1 до 20, от 1 до 10 или от 1 до 5.

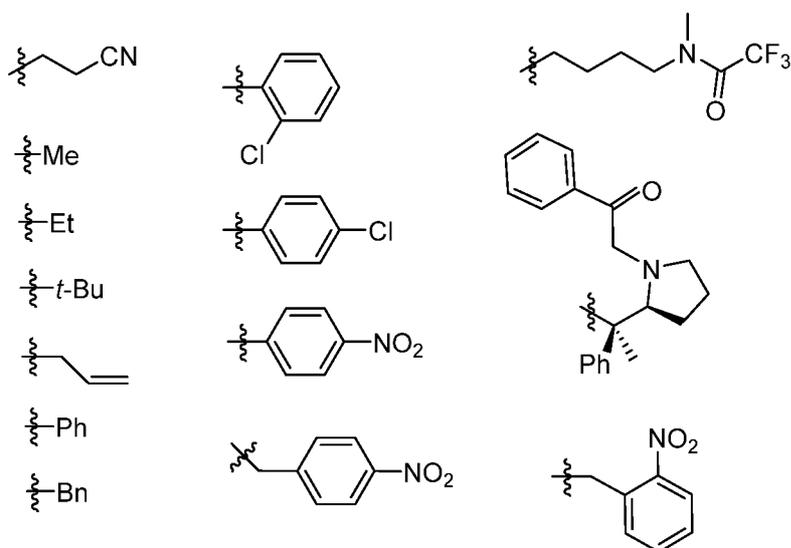
**[0102]** В некоторых вариантах реализации для способов в первом аспекте или в любых вариантах реализации, описанных в нем (*например*, в способе, описанном в любом из вариантов с первого по двадцать первый), R<sup>16</sup> для каждого случая независимо представляет собой C<sub>1-6</sub>алкильную группу, C<sub>2-6</sub>алкенильную группу, фенильную или бензильную группу, каждая из которых необязательно замещена -CN, -NO<sub>2</sub> или



галогеном; или R<sup>16</sup> представляет собой

, или

варианте реализации R<sup>16</sup> представляет собой одно из следующих:



**[0103]** В некоторых вариантах реализации для способов первый аспект или любые варианты реализации, описанные в нем (*например*, способ, описанный в любом из вариантов с первого по двадцать первый):

каждый  $R^2$  независимо выбран из H, галогена или  $C_{1-4}$ -алкокси, необязательно замещенного  $C_{1-4}$ -алкокси;

$R^4$  представляет собой H; и

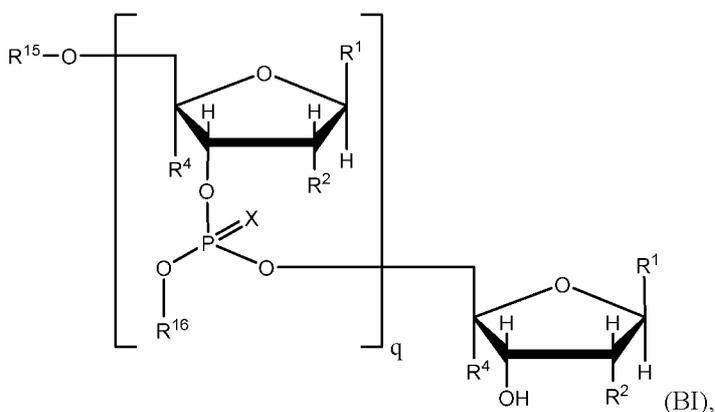
$R^{16}$  представляет собой  $-CH_2CH_2CN$ .

**[0104]** В конкретном варианте реализации  $R^2$  представляет собой  $-OCH_2CH_2OMe$ .

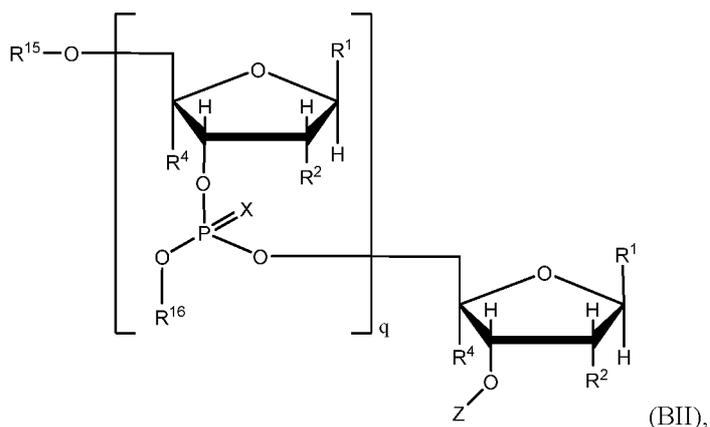
*b. 3'-Реакции снятия защиты:*

**[0105]** Во втором аспекте данное раскрытие описывает жидкофазный способ снятия защиты с удалением 3'-гидроксильной защитной группы на олигонуклеотиде. В одном варианте реализации способ снятия защиты представляет собой процесс десилилирования. Обнаружено, что способ десилилирования по данному изобретению может выборочно удалить силильную защитную группу 3'-гидроксильной группы, не затрагивая другие чувствительные группы олигонуклеотида, такие как 5'-тримильная группа, различные защитные группы нуклеоснований (*например*, бензоильная или изобутирильная группа), цианозтильную и  $-OCH_2CH_2OMe$  (также известная как метоксиэтильная (МОЕ)) группы.

**[0106]** В двадцать втором варианте реализации второй аспект данного раскрытия относится к жидкофазному способу получения соединения формулы (BI):



или его соли, включающий снятие защиты с соединения формулы (BI):



или его соли с образованием соединения формулы (BI) или его соли, где:

$R^1$  в каждом случае независимо представляет собой нуклеобазу, где  $NH_2$  нуклеобазы, если присутствует, защищено аминозащитной группой;

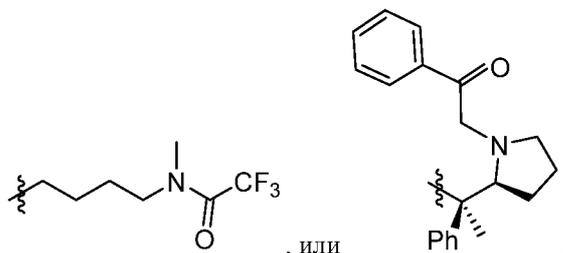
$R^2$ , в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и  $C_{1-6}$ алкокси, необязательно замещенного  $C_{1-6}$ алкокси;

$R^4$  в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой  $R^2$ ;

$R^{15}$  представляет собой защитную группу гидроксила;

$R^{16}$  в каждом случае независимо представляет собой  $C_{1-6}$ алкильную группу,  $C_{2-6}$ алкенильную группу, фенильную или бензильную группу, каждая из которых необязательно замещена  $-CN$ ,  $-NO_2$  или галогеном; или

$R^{16}$  представляет собой

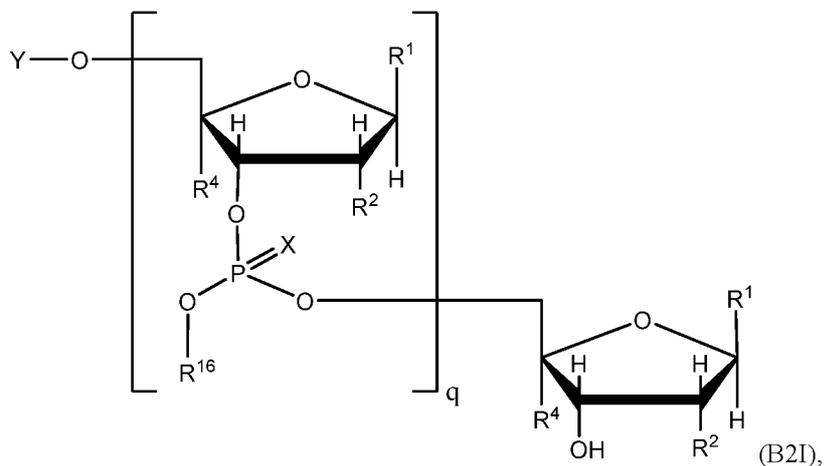


$q$  равно целому числу от 1 до 200;

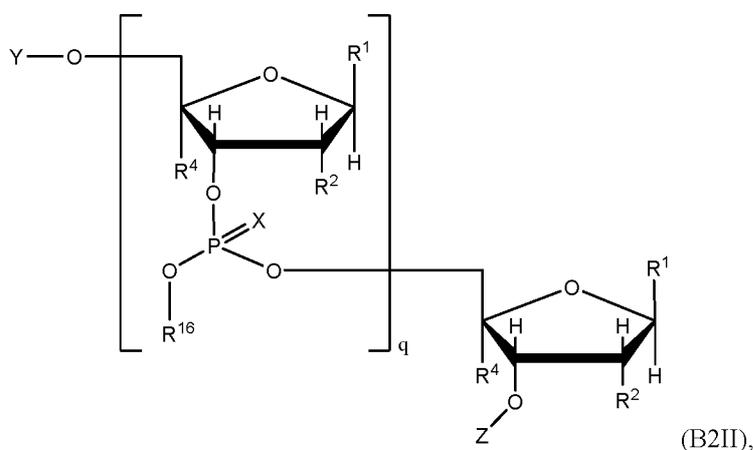
$X$  в каждом случае независимо представляет собой O или S; и

$Z$  представляет собой защитную группу гидроксила (например, силильную защитную группу гидроксила).

**[0107]** В двадцать третьем варианте реализации второй аспект данного раскрытия относится к жидкофазному способу получения соединения формулы (B2I):



или его соли, включающему снятие защиты с соединения формулы (B2I):



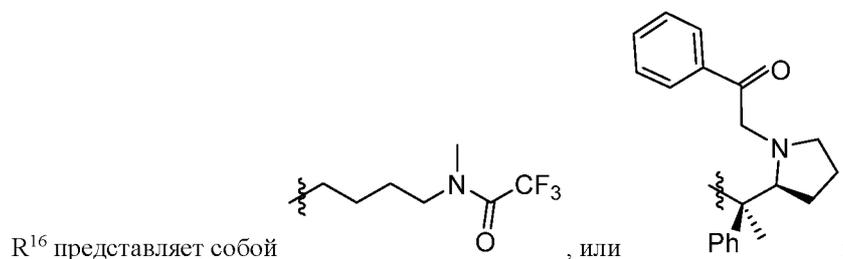
или его соли с образованием соединения формулы (B2I) или его соли, где:

$R^1$  в каждом случае независимо представляет собой нуклеобазу, где  $NH_2$  нуклеобазы, если присутствует, защищено аминозащитной группой;

$R^2$ , в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и  $C_{1-6}$ алкокси, необязательно замещенного  $C_{1-6}$ алкокси;

$R^4$  в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой  $R^2$ ;

$R^{16}$  в каждом случае независимо представляет собой  $C_{1-6}$ алкильную группу,  $C_{2-6}$ алкенильную группу, фенильную или бензильную группу, каждая из которых необязательно замещена  $-CN$ ,  $-NO_2$  или галогеном;  
или



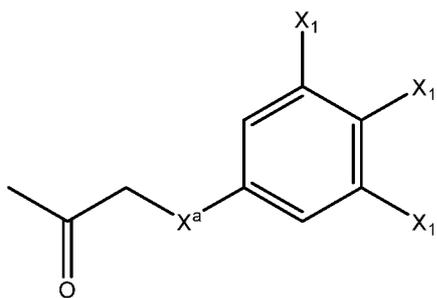
$q$  равно целому числу от 1 до 200;

$X$  в каждом случае независимо представляет собой O или S;

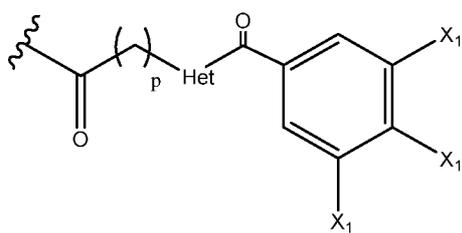
$Y$  представляет собой гидрофобную защитную группу гидроксила, содержащую алкильную цепь; и

$Z$  представляет собой защитную группу гидроксила.

**[0108]** В двадцать четвертом варианте реализации Y двадцать третьего варианта реализации представлен следующей формулой:

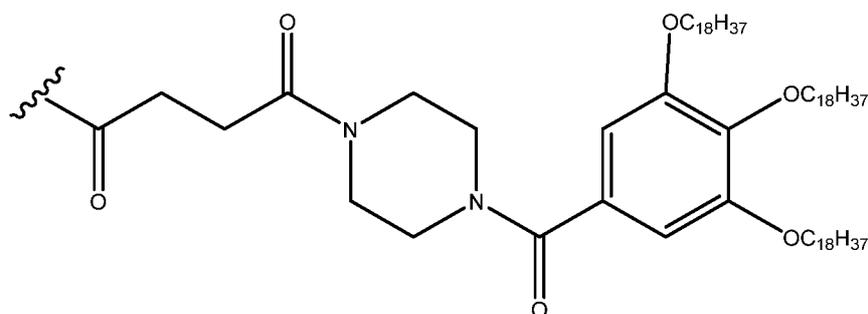


где  $X^a$  представляет собой  $C_{1-10}$ алкил, где одна или более групп  $CH_2$  независимо замещены  $C(O)$ ,  $C(O)NH_2$ , циклоалкильной или  $C_{1-6}$ гетероциклической группой; и  $X_1$  представляет собой  $C_{1-25}$ алкил или  $C_{1-25}$ алкокси. В конкретном варианте реализации Y представлен следующей формулой:



где  $p$  равно целому числу от 1 до 10; Het представляет собой насыщенный гетероцикл; а остальные переменные такие, как описано выше. В более конкретном варианте реализации Het представляет собой пиперазин.

**[0109]** В двадцать пятом варианте реализации Y двадцать третьего варианта реализации представлен следующей формулой:



**[0110]** В двадцать шестом варианте реализации реакцию снятия защиты проводят путем взаимодействия соединения формулы (VII) или (B2II) или его соли с HF в присутствии основания.

**[0111]** В двадцать седьмом варианте реализации основание в двадцать шестом варианте реализации представляет собой имидазол или пиридин, где имидазол или пиридин необязательно замещены.

**[0112]** Двадцать восьмой вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из вариантов реализации с двадцать второго по двадцать седьмой, где используется избыточное количество основания относительно HF.

**[0113]** В двадцать девятом варианте реализации реакцию снятия защиты проводят путем взаимодействия соединения формулы (VII) или (B2II) или его соли с HF в присутствии пиридина и имидазола.

**[0114]** В тридцатом варианте реализации молярное соотношение имидазола к HF двадцать девятого варианта реализации находится в диапазоне от 1,1:1 до 5:1. В некоторых вариантах реализации молярное соотношение имидазола к HF находится в диапазоне от 1,1:1 до 3:1, от 1,5:1 до 3:1 или от 1,5:1 до 2,5:1.

**[0115]** В тридцать первом варианте реализации молярное соотношение имидазола к HF тридцатого варианта реализации составляет 2:1.

**[0116]** В тридцать втором варианте реализации для способа, описанного в любом из двадцать девятого - тридцать первого вариантов реализации, молярное соотношение пиридина к HF находится в диапазоне от 1,1:1 до 20:1. В некоторых вариантах реализации молярное соотношение пиридина к HF находится в диапазоне от 5:1 до 20:1 или от 5:1 до 15:1. В конкретном варианте реализации молярное соотношение пиридина к HF составляет 10:1.

**[0117]** Тридцать третий вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из вариантов реализации с двадцать второго по тридцать второй, где Z представляет собой силилгидроксильную защитную группу. В определенных вариантах реализации силильные защитные группы включают, но не ограничиваются ими, группы, описанные выше в четырнадцатом варианте реализации.

**[0118]** В тридцать четвертом варианте реализации защитная группа силилгидроксила представляет собой TBDPS, ToBDPS или TBDAS, как описано в пятнадцатом, шестнадцатом или семнадцатом варианте реализации. В определенных вариантах реализации силилгидроксильная защитная группа представляет собой TBDPS.

**[0119]** В определенных вариантах реализации описанная выше реакция снятия защиты (например, в любом из вариантов с двадцать третьего по тридцать четвертый) проводится в подходящем органическом растворителе, *например*, ТГФ.

**[0120]** Тридцать пятый вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из вариантов с двадцать второго по тридцать четвертый, в котором соединение формулы (B1) или (B2I) или его соль не очищается хроматографией (*например*, колоночной хроматографией).

**[0121]** В тридцать шестом варианте реализации соединение формулы (B1) или (B2I) или его соль очищают селективным осаждением и/или экстракцией. В определенном варианте реализации соединение формулы (B2I) или его соль очищают селективным осаждением. В определенных вариантах реализации селективное осаждение соединения формулы (B2I) или его соли может быть достигнуто путем добавления ацетонитрила к раствору сырого продукта в ДХМ. В альтернативном варианте реализации раствор сырого продукта можно добавить в ацетонитрил для осаждения желаемого продукта.

**[0122]** В определенных вариантах реализации соединение формулы (B1) или его соль очищают селективным осаждением. В определенных вариантах реализации соединение формулы (B1) или его соль очищают путем экстракции раствора, содержащего соединение формулы (B1) или его соль, в органическом растворителе (МБТЭ, EtOAc, смесь гептан/МБТЭ, ДХМ и т. д.) с водным раствором (*например*, NaHCO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O или NaCl/H<sub>2</sub>O) в дополнение к селективному осаждению. В определенных вариантах реализации экстракцию проводят перед селективным осаждением. В альтернативном варианте экстракцию проводят после селективного осаждения. В определенных вариантах реализации селективное осаждение соединения формулы (B1) или его соли может быть достигнуто путем добавления гептана или смеси гептан/МБТЭ к раствору сырого продукта в ДХМ или EtOAc. В альтернативном варианте раствор сырого продукта можно добавить в гептан или смесь гептан/МБТЭ для осаждения желаемого продукта. Можно использовать смесь гептан/МБТЭ с подходящим объемным соотношением (*например*, объемным соотношением, описанным в данном документе).

[0123] В некоторых вариантах реализации для способа, описанного во втором аспекте, или в любых вариантах реализации, описанных в нем (*например*, двадцать второго, с двадцать шестого по тридцать шестой), R<sup>15</sup> представляет собой 4,4'-диметокситритильную (DMT) группу.

[0124] В некоторых вариантах реализации для способа, описанного во втором аспекте или любых вариантах реализации, описанных в нем (*например*, варианты с двадцать второго по тридцать шестой), каждый R<sup>2</sup> независимо выбран из H или C<sub>1-4</sub>алкокси, необязательно замещенного C<sub>1-4</sub>алкокси; R<sup>4</sup> представляет собой H; и R<sup>16</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN.

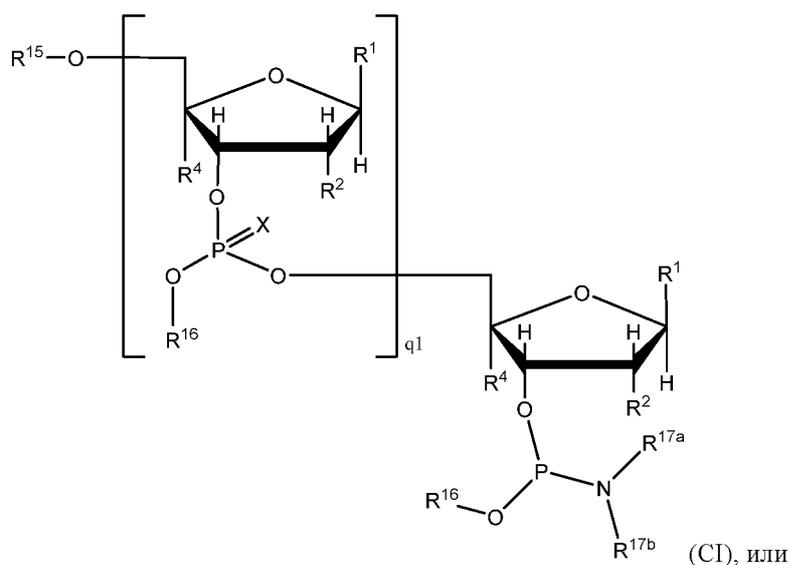
[0125] В некоторых вариантах реализации для способа, описанного во втором аспекте, или в любых вариантах реализации, описанных в нем (*например*, двадцать второго, с двадцать шестого до тридцать шестого вариантов реализации), каждый R<sup>2</sup> независимо выбран из H, галогена или C<sub>1-4</sub>алкокси, необязательно замещенного C<sub>1-4</sub>алкокси; R<sup>4</sup> представляет собой H; R<sup>15</sup> представляет собой 4,4'-диметокситритил; и R<sup>16</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN. В конкретном варианте реализации R<sup>2</sup> представляет собой MOE.

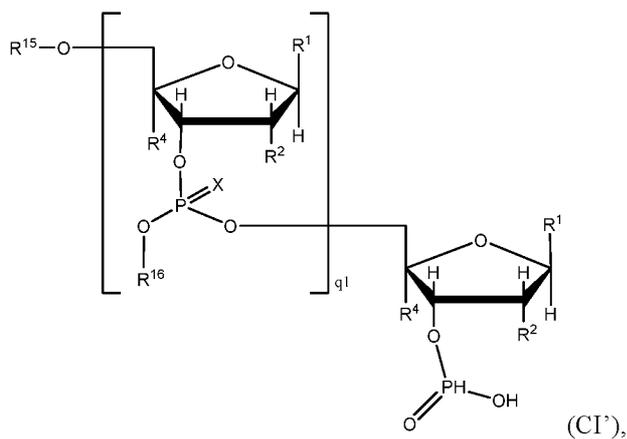
[0126] В некоторых вариантах реализации для способа, описанного во втором аспекте или любых вариантах реализации, описанных в нем (*например*, с двадцать второго по тридцать шестой вариантах реализации), каждый R<sup>2</sup> независимо выбран из H, галогена (*например*, F) или C<sub>1-4</sub>алкокси, необязательно замещенного C<sub>1-4</sub>алкокси; R<sup>4</sup> представляет собой H; и R<sup>16</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN. В конкретном варианте реализации R<sup>2</sup> представляет собой -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> (MOE).

### с. Реакции фосфитилирования

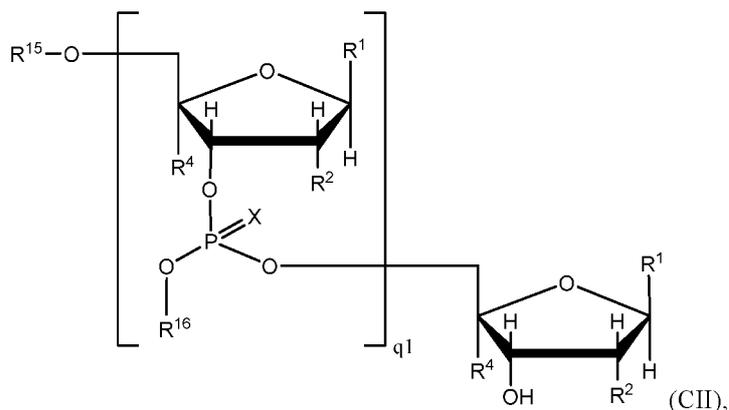
[0127] Третий аспект данного раскрытия относится к способу жидкофазного фосфитилирования олигонуклеотида, описанного в данном документе. Способ включает взаимодействие 3'-ОН-группы с фосфордиамидитом или Н-фосфонатом (НО)P(O)H. Способы фосфитилирования данного раскрытия могут быть использованы для синтеза олигонуклеотидных фрагментов с 3 или более нуклеотидами с высокой чистотой без хроматографической очистки.

[0128] Тридцать седьмой вариант реализации раскрывает жидкостный способ получения соединения формулы (CI) или (CI'):





или его соли, включающий взаимодействие соединения формулы (CII):



или его соли с фосфордиамидитом  $(R^{16}O)P(NR^{17a}R^{17b})_2$  или Н-фосфонатом  $(HO)P(O)H$  с образованием соединения формулы (CI) или (CI'), соответственно, где:

$R^1$  в каждом случае независимо представляет собой нуклеобазу, где  $NH_2$  нуклеобазы, если присутствует, защищено аминозащитной группой;

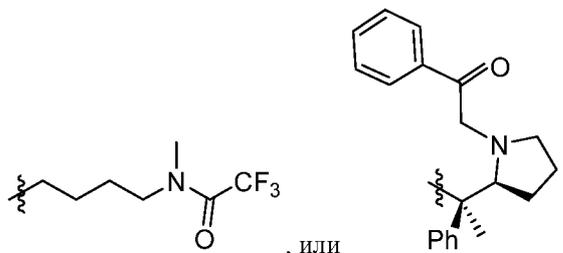
$R^2$ , в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и  $C_{1-6}$ -алкокси, необязательно замещенного галогеном или  $C_{1-6}$ -алкокси;

$R^4$  в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой  $R^2$ ;

$R^{15}$  представляет собой защитную группу гидроксила;

$R^{16}$  в каждом случае независимо представляет собой  $C_{1-6}$ -алкильную группу,  $C_{2-6}$ -алкенильную группу, фенильную или бензильную группу, каждая из которых необязательно замещена  $-CN$ ,  $-NO_2$  или галогеном;

или



$R^{16}$  представляет собой

, или

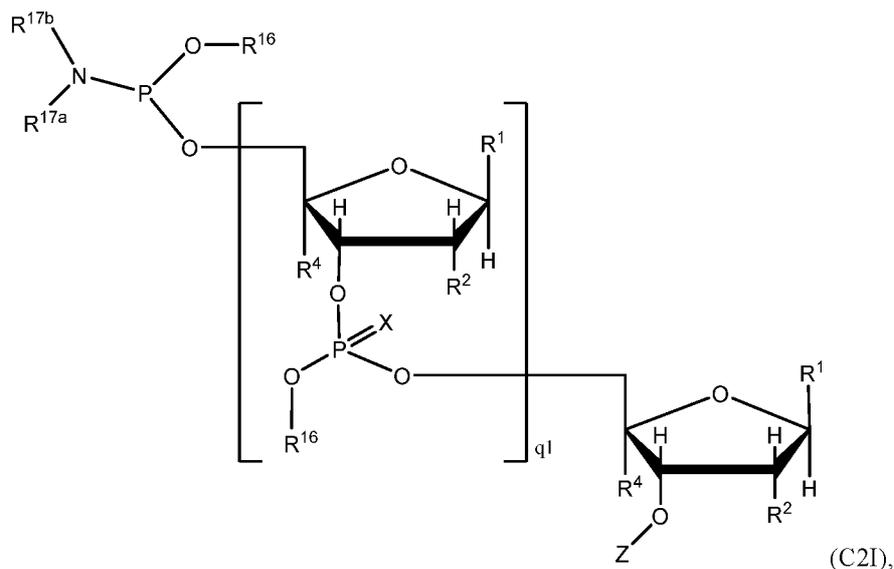
$R^{17a}$  и  $R^{17b}$  независимо представляют собой  $C_{1-6}$ -алкил;

$q1$  равно целому числу от 2 до 200;

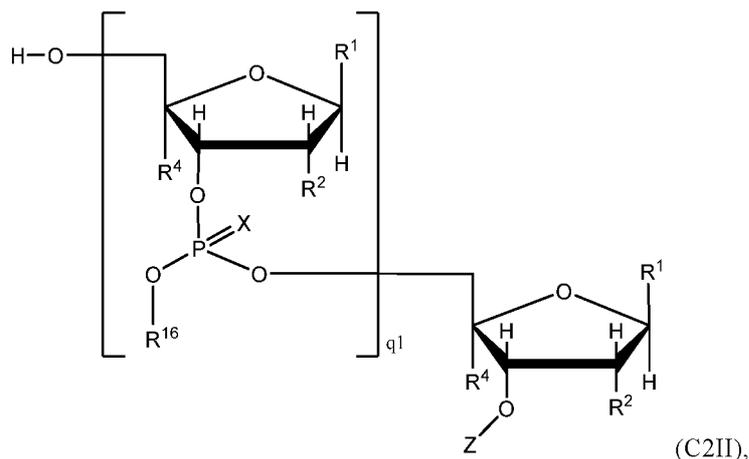
$X$  в каждом случае независимо представляет собой O или S; и

$Z$  представляет собой силильную защитную группу гидроксила.

[0129] Тридцать восьмой вариант реализации раскрывает жидкостный способ получения соединения формулы (C2I):



или его соли, включающий взаимодействие соединения формулы (C2II):



или его соли с фосфордиамидитом  $(R^{16}O)P(NR^{17a}R^{17b})_2$  с образованием соединения формулы (C2I) или его соли, где:

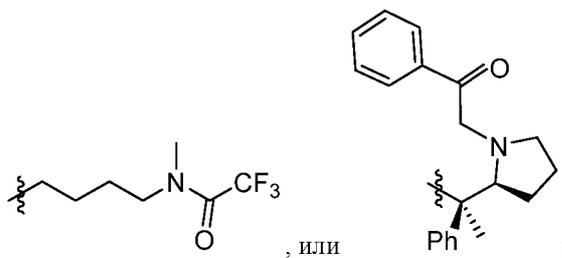
$R^1$  в каждом случае независимо представляет собой нуклеобазу, где  $NH_2$  нуклеобазы, если присутствует, защищено аминозащитной группой;

$R^2$ , в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и  $C_{1-6}$ -алкокси, необязательно замещенного галогеном или  $C_{1-6}$ -алкокси;

$R^4$  в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой  $R^2$ ;

$R^{16}$  в каждом случае независимо представляет собой  $C_{1-6}$ -алкильную группу,  $C_{2-6}$ -алкенильную группу, фенильную или бензильную группу, каждая из которых необязательно замещена  $-CN$ ,  $-NO_2$  или галогеном;

или



R<sup>16</sup> представляет собой

, или

R<sup>17a</sup> и R<sup>17b</sup> независимо представляют собой C<sub>1-6</sub>-алкил;

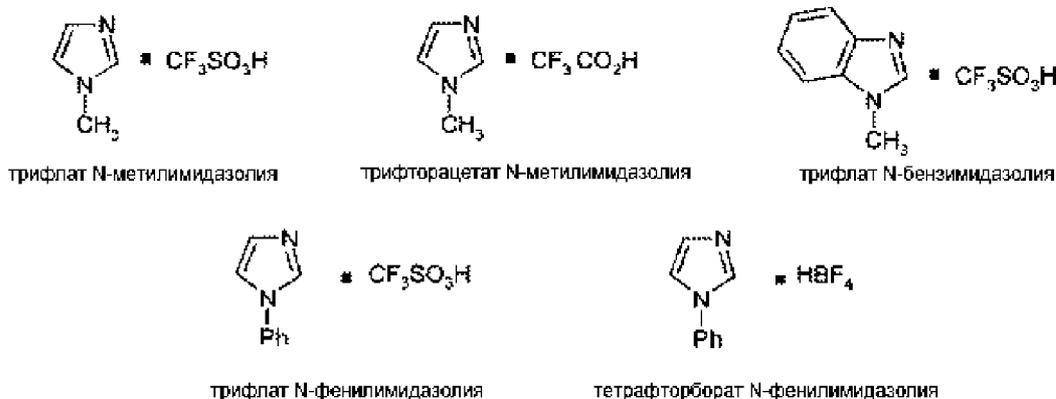
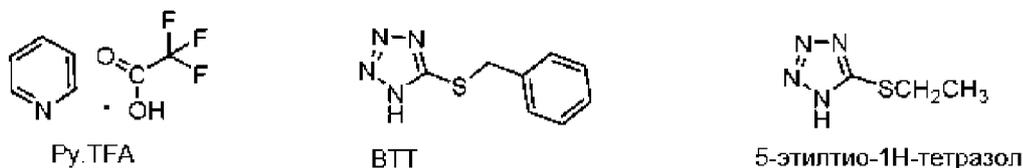
q1 равно целому числу от 2 до 200;

X в каждом случае независимо представляет собой O или S; и

Z представляет собой силильную защитную группу гидроксила.

**[0130]** В некоторых вариантах реализации для способа, описанного в тридцать восьмом варианте реализации, каждый R<sup>2</sup> независимо выбран из H, F или C<sub>1</sub>-алкокси, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-алкокси; R<sup>4</sup> представляет собой H; R<sup>16</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN; R<sup>17a</sup> и R<sup>17b</sup> независимо представляют собой C<sub>1</sub>-алкил; и Z представляет собой описанную в данном документе силилгидроксилзащитную группу. В некоторых вариантах реализации Z выбран из TBDPS, TBoDPS и TBDAS. В конкретном варианте R<sup>2</sup> представляет собой H, R<sup>4</sup> представляет собой H; R<sup>16</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN; R<sup>17a</sup> и R<sup>17b</sup> оба представляют собой -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; и Z представляет собой TBDPS. В другом конкретном варианте R<sup>2</sup> представляет собой MOE, R<sup>4</sup> представляет собой H; R<sup>16</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN; R<sup>17a</sup> и R<sup>17b</sup> оба представляют собой -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; и Z представляет собой TBDPS.

**[0131]** Тридцать девятый вариант реализации раскрывает способ, описанный в третьем аспекте, или любых вариантах реализации, описанных выше (например, тридцать седьмой или тридцать восьмой вариант реализации), в котором реакцию проводят в присутствии активатора. В данном контексте активатор представляет собой химический реагент, который облегчает реакцию между фосфордиамидитом или H-фосфонатом и 3'-гидроксильной группой олигонуклеотида (*например*, соединения формулы (CII) или (C2II)). Примеры активаторов включают, но не ограничиваются ими, следующие реагенты:



**[0132]** В сороковом варианте реализации данное раскрытие обеспечивает способ, описанный в тридцать девятом варианте реализации, где активатором является трифторацетат пиридина (Py•ТФУ) или трифлат N-метилимидазолия.

**[0133]** Сорок первый вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из вариантов с тридцать четвертого по тридцать шестой, где соединение формулы (C1), (C1') или (C2I) не очищается хроматографией (например, колоночной хроматографией).

**[0134]** Сорок второй вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из вариантов с тридцать четвертого по тридцать шестой, где соединение формулы (C1), (C1') или (C2I) или его соль очищают селективным осаждением и/или экстракцией. В некоторых вариантах реализации соединение формулы (C1), (C1') или (C2I) или его соль очищают селективным осаждением. В определенных вариантах реализации соединение формулы (C1), (C1') или (C2I) или его соль очищают экстракцией раствором, содержащим соединение формулы (C1), (C1') или (C2I), или его соль в органическом растворителе (МБТЭ, EtOAc, смесь гептан/МБТЭ, ДХМ и т.д.) с водным раствором (например, NaHCO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O или NaCl/H<sub>2</sub>O) в дополнение к селективному осаждению. В определенных вариантах реализации экстракцию проводят перед селективным осаждением. В альтернативном варианте экстракцию проводят после селективного осаждения. В определенных вариантах реализации селективное осаждение соединения формулы (C1), (C1') или (C2I) или его соли может быть достигнуто путем добавления гептана или смеси гептан/МБТЭ к раствору сырого продукта в ДХ или EtOAc. В альтернативном варианте раствор сырого продукта можно добавить в гептан или смесь гептан/МБТЭ для осаждения желаемого продукта. Можно использовать смесь гептан/МБТЭ с

подходящим объемным соотношением (*например*, объемным соотношением, описанным в данном документе).

**[0135]** В некоторых вариантах реализации для способа, описанного в третьем аспекте или в любых вариантах реализации, описанных выше (*например*, тридцать седьмой вариант), переменные для формулы (CI), (CI') или (CII) имеют значения, указанные ниже:

каждый  $R^2$  независимо выбран из H, F или  $C_{1-4}$ -алкокси, необязательно замещенного  $C_{1-4}$ -алкокси;

$R^4$  представляет собой H;

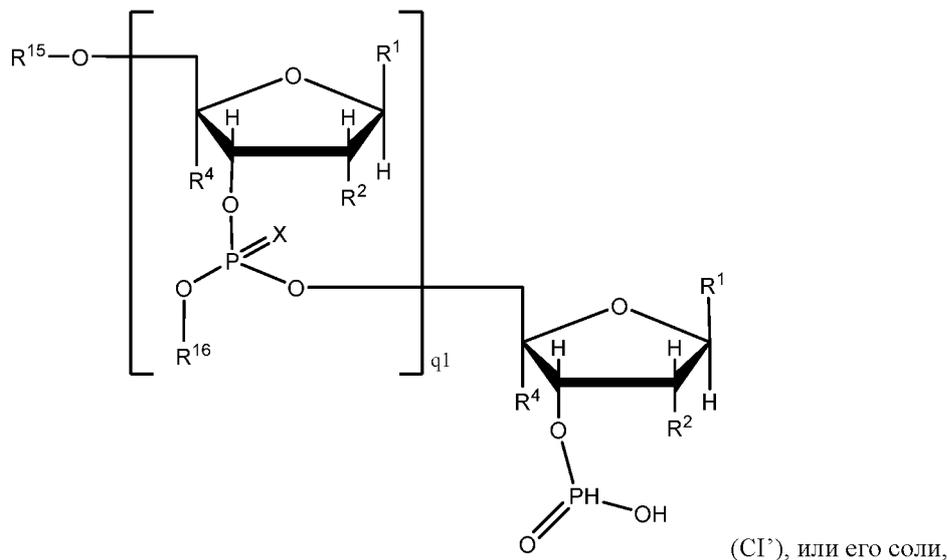
$R^{15}$  представляет собой 4,4'-диметокситригил;

$R^{16}$  представляет собой  $-CH_2CH_2CN$ ; и

$R^{17a}$  и  $R^{17b}$  независимо представляют собой  $C_{1-6}$ -алкил;

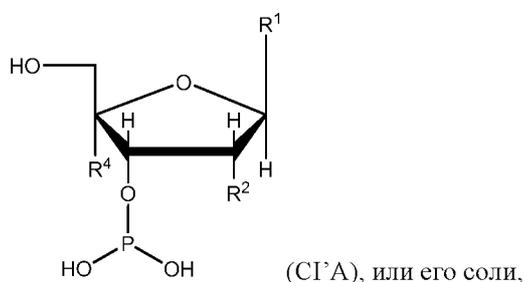
**[0136]** В конкретном варианте реализации  $R^2$  представляет собой MOE. В другом конкретном варианте  $R^2$  представляет собой H;  $R^4$  представляет собой H;  $R^{16}$  представляет собой  $-CH_2CH_2CN$ ; и  $R^{17a}$  и  $R^{17b}$  оба представляют собой  $-CH(CH_3)_2$ . В другом конкретном варианте реализации  $R^2$  представляет собой MOE,  $R^4$  представляет собой H;  $R^{16}$  представляет собой  $-CH_2CH_2CN$ ; и  $R^{17a}$  и  $R^{17b}$  оба представляют собой  $-CH(CH_3)_2$ .

**[0137]** Сорок третий вариант реализации раскрывает жидкостный способ получения соединения формулы (CI'):

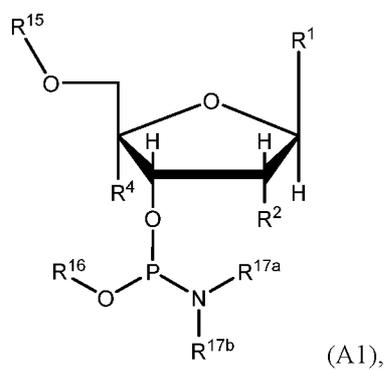


состоящий из стадий:

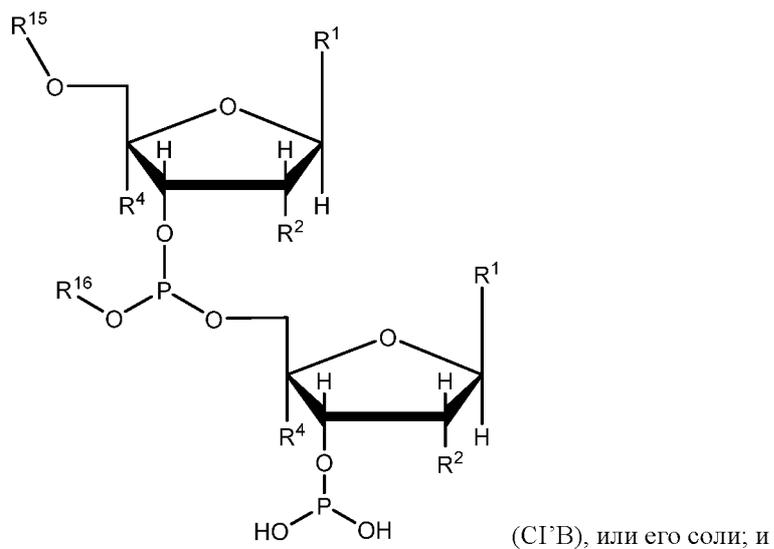
1) взаимодействие соединения формулы (CI'A):



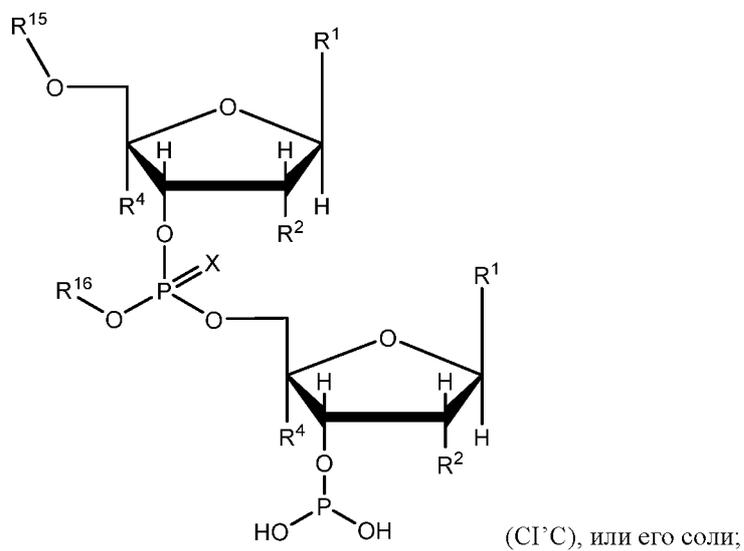
с соединением формулы (A1):



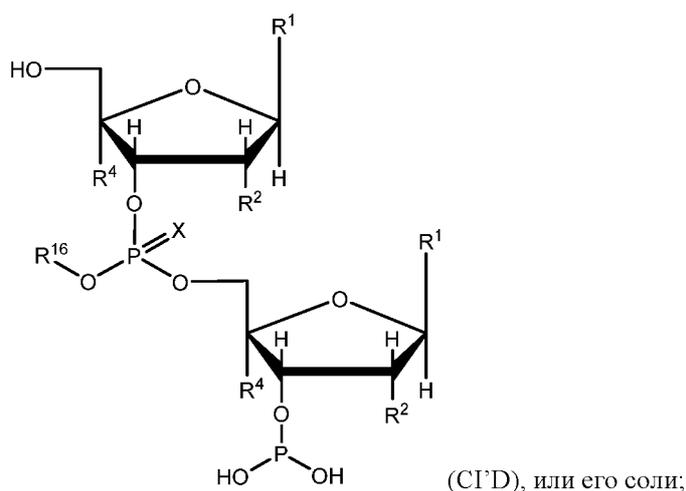
или его соль с образованием соединения формулы (C1'В):



3) сульфуризация или окисление соединения формулы (C1'В) или его соли с помощью агента сульфуризации или окисления с образованием соединения формулы (C1'С):



4) снятие защиты с соединения формулы (C1'С) или его соли с образованием соединения формулы (C1'Д):



5) начиная с соединения формулы (CID), повторяя шаги 1), 2) 3) и 4) для q1-3 раз, с последующим повторением шагов 1), 2) и 3) с получением фрагмента формулы (CI') или его соли, где:

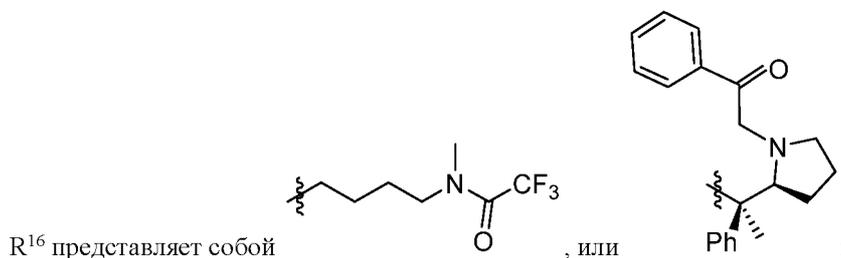
R<sup>1</sup> в каждом случае независимо представляет собой нуклеоснование, где NH<sub>2</sub> нуклеоснования, если присутствует, защищено аминокзащитной группой;

R<sup>2</sup>, в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и C<sub>1-6</sub>алкокси, необязательно замещенного C<sub>1-6</sub>алкокси;

R<sup>4</sup> в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой R<sup>2</sup>;

R<sup>15</sup> представляет собой защитную группу гидроксила (*например*, DMT группа);

R<sup>16</sup> в каждом случае независимо представляет собой C<sub>1-6</sub>алкильную группу, C<sub>2-6</sub>алкенильную группу, фенильную или бензильную группу, каждая из которых необязательно замещена -CN, -NO<sub>2</sub> или галогеном; или

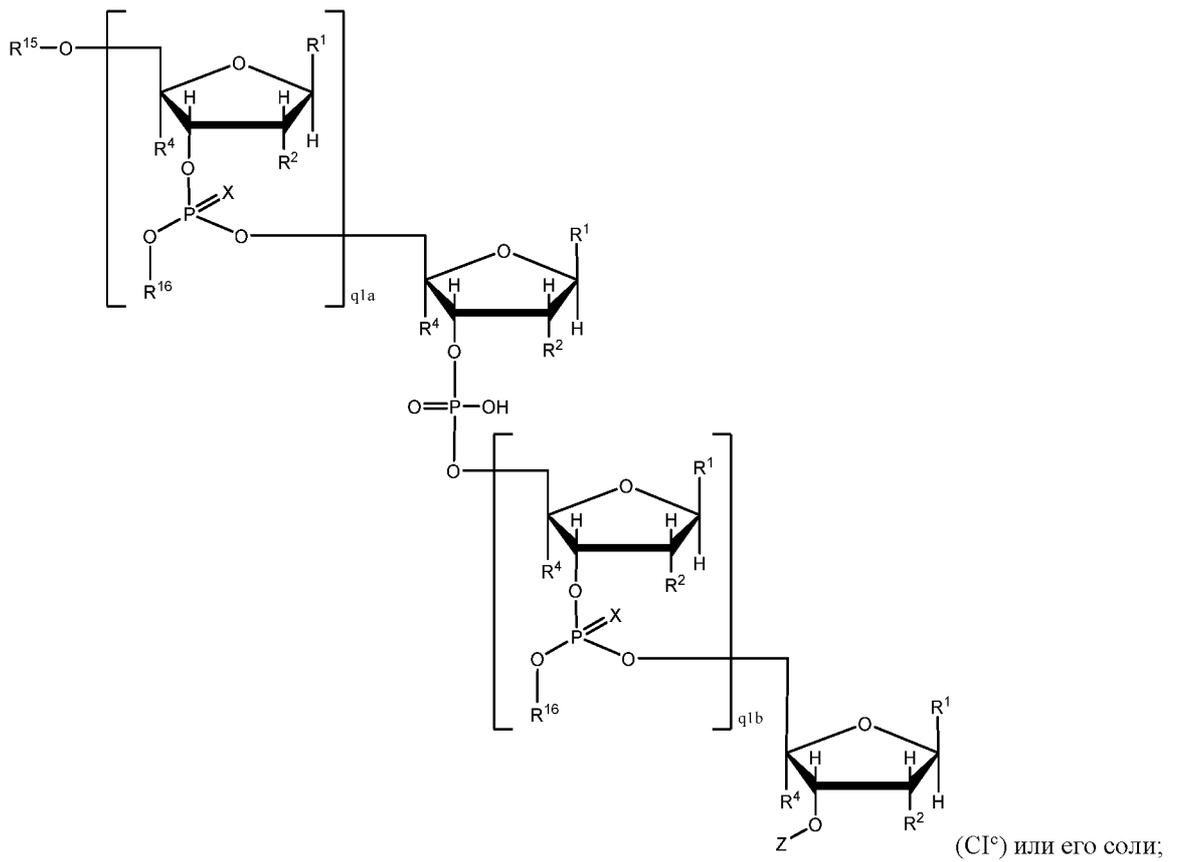


R<sup>17a</sup> и R<sup>17b</sup> независимо представляют собой C<sub>1-6</sub>алкил;

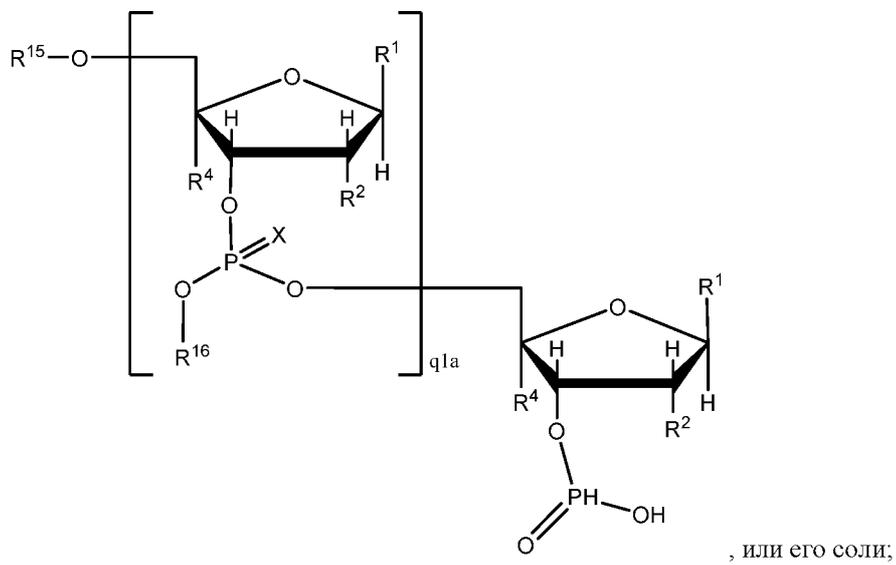
q1 равно целому числу от 2 до 200; и

X в каждом случае независимо представляет собой O или S;

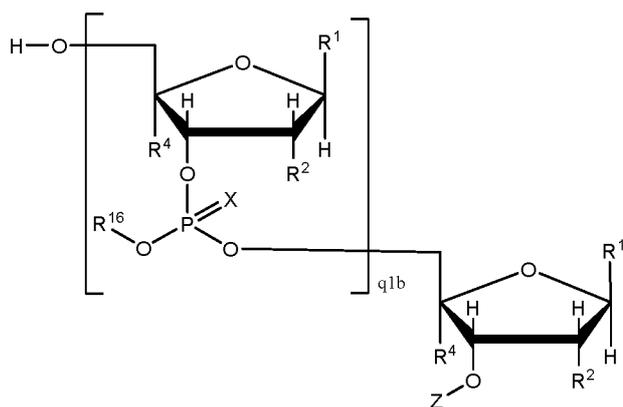
**[0138]** Сорok четвертый вариант реализации раскрывает жидкофазный способ получения олигонуклеотида формулы (CI<sup>o</sup>):



включающий связывание олигонуклеотидного фрагмента формулы (CI<sup>a</sup>):



с олигонуклеотидным фрагментом формулы (CI<sup>b</sup>):



(C1<sup>b</sup>) или его соль с образованием

олигонуклеотида формулы (C1<sup>c</sup>), или его соли, где:

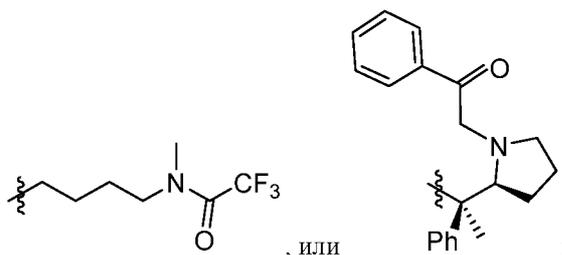
R<sup>1</sup> в каждом случае независимо представляет собой нуклеобазу, где NH<sub>2</sub> нуклеобазы, если присутствует, защищено аминозащитной группой;

R<sup>2</sup>, в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и C<sub>1-6</sub>-алкокси, необязательно замещенного C<sub>1-6</sub>-алкокси;

R<sup>4</sup> в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой R<sup>2</sup>;

R<sup>15</sup> представляет собой защитную группу гидроксила;

R<sup>16</sup> в каждом случае независимо представляет собой C<sub>1-6</sub>-алкильную группу, C<sub>2-6</sub>-алкенильную группу, фенильную или бензильную группу, каждая из которых необязательно замещена -CN, -NO<sub>2</sub> или галогеном; или



R<sup>16</sup> представляет собой

, или

q1a равно целому числу от 2 до 20;

q1b равно целому числу от 2 до 20;

X в каждом случае независимо представляет собой O или S; и

Z представляет собой защитную группу гидроксила.

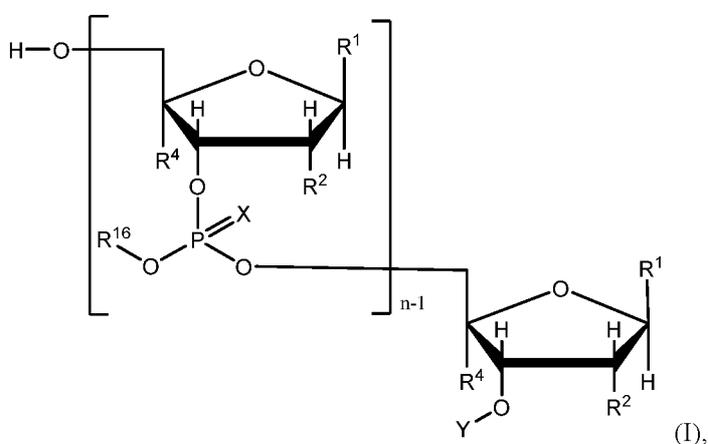
**[0139]** В определенных вариантах реализации реакцию сочетания сорок четвертого варианта реализации проводят в присутствии ацилхлорида. В конкретном варианте реализации реакцию сочетания между олигонуклеотидом формулы (C1<sup>a</sup>) и олигонуклеотидом формулы (C1<sup>b</sup>) проводят в присутствии пивалоилхлорида. В другом конкретном варианте реализации реакцию сочетания проводят в присутствии пивалоилхлорида и основания (*например*, пиридина).

**[0140]** В определенных вариантах реализации для способа, описанного в сорок третьем или сорок пятом варианте, хроматография не используется для очистки продукта реакции любой из описанных в нем стадий реакции. В определенных вариантах реализации продукт реакции любой из описанных в нем стадий реакции очищают путем селективного осаждения и/или экстракции, как описано в данном документе (*например*, как описано в двадцать первом, тридцать пять или сорок второй вариант реализации).

d. Синтезы 3'-олигонуклеотидных фрагментов

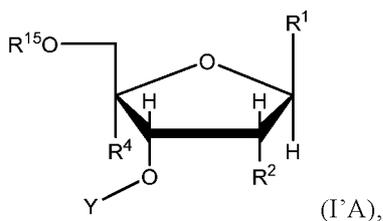
**[0141]** В четвертом аспекте данное раскрытие описывает жидкофазный способ получения олигонуклеотидного фрагмента, несущего гидрофобную гидроксильную защитную группу на 3'-конце (обозначаемый в данном документе как «3'-фрагмент»). Неожиданно было обнаружено, что способы согласно данному раскрытию для синтеза 3'-фрагмента можно использовать для получения олигонуклеотидного фрагмента, содержащего от 3 до 20 (*например*, от 3 до 10, от 3 до 8, от 3 до 5 или от 4 до 5) нуклеотидов с высокой чистотой без хроматографической очистки. В некоторых вариантах реализации используется гидрофобная 3'-гидроксильная защитная группа, которая облегчает разделение продукта олигонуклеотидного фрагмента путем селективного осаждения. В некоторых вариантах реализации жидкофазный способ включает (1) стадию снятия защиты с 5'-ОН, (2) стадию сочетания и (3) стадию окисления или сульфуризации, при этом стадии (1), (2) и (3) повторяются до тех пор, пока желаемое количество нуклеотидов не будет связано вместе с образованием 3'-олигонуклеотидного фрагмента.

**[0142]** Сорок пятый вариант реализации раскрывает жидкофазный способ получения олигонуклеотидного фрагмента формулы (I),

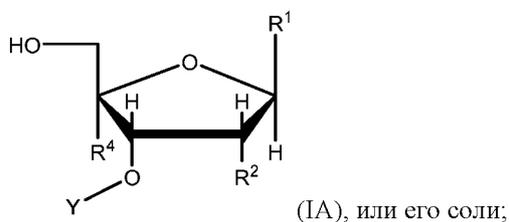


или его соли, включающий стадии:

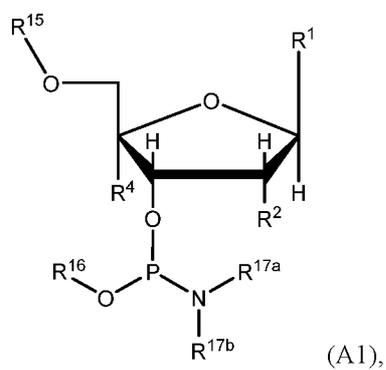
1) снятия защиты с соединения формулы (I<sup>A</sup>):



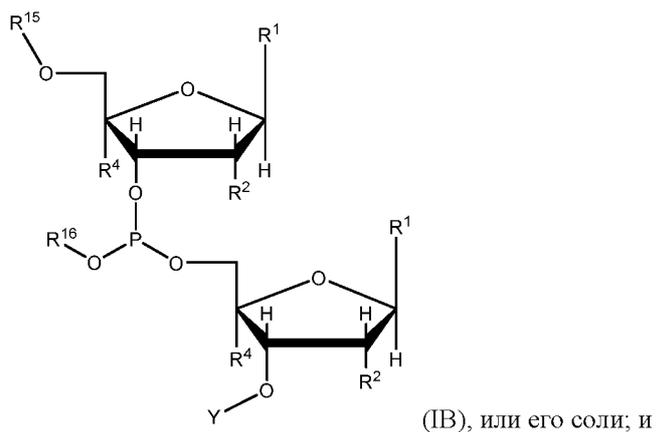
или его соли с образованием соединения формулы (IA):



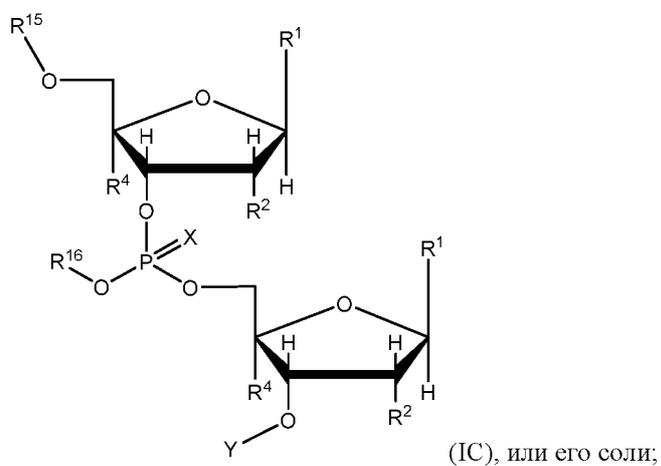
2) взаимодействия соединения формулы (IA) или его соли с соединением формулы (A1):



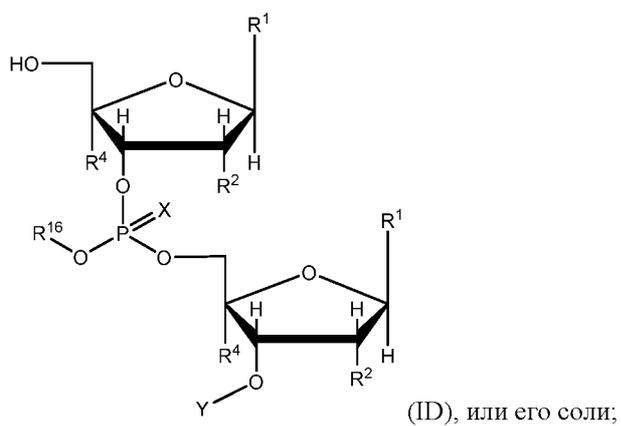
или его солью с образованием соединения формулы (IB):



3) сульфуризации или окисления соединения формулы (IB) или его соли с помощью агента сульфуризации или окисления с образованием соединения формулы (IC):



4) снятия защиты с соединения формулы (IC) или его соли с образованием соединения формулы (ID):



5) начиная с соединения формулы (ID), повторяя стадии 2), 3) и 4) n-2 раз, чтобы получить фрагмент формулы (I) или его соль, где:

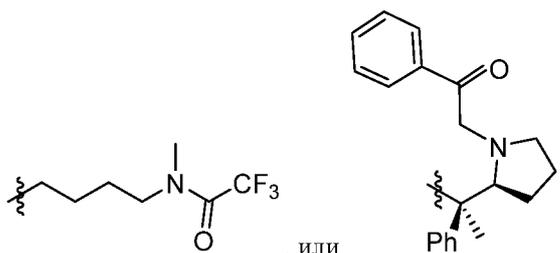
R<sup>1</sup> в каждом случае независимо представляет собой нуклеоснование, где NH<sub>2</sub> нуклеоснования, если присутствует, защищено аминозащитной группой;

R<sup>2</sup>, в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и C<sub>1-6</sub>алкокси, необязательно замещенного C<sub>1-6</sub>алкокси;

R<sup>4</sup> в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой R<sup>2</sup>;

R<sup>15</sup> представляет собой защитную группу гидроксила;

R<sup>16</sup> в каждом случае независимо представляет собой C<sub>1-6</sub>алкильную группу, C<sub>2-6</sub>алкенильную группу, фенильную или бензильную группу, каждая из которых необязательно замещена -CN, -NO<sub>2</sub> или галогеном; или



R<sup>16</sup> представляет собой

R<sup>17a</sup> и R<sup>17b</sup> независимо представляют собой C<sub>1-6</sub>алкил;

n равно целому числу от 2 до 20;

X в каждом случае независимо представляет собой O или S;

Y представляет собой гидрофобную защитную группу гидроксила, содержащую алкильную цепь.

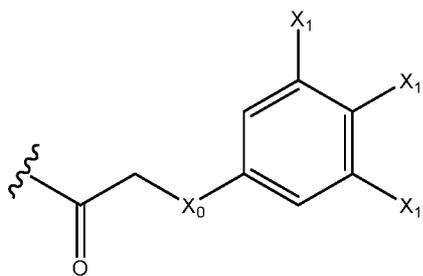
**[0143]** Сорок шестой вариант реализации раскрывает способ, описанный в сорок пятом варианте реализации, где фрагмент формулы (I) не очищается хроматографией (*например*, колоночной хроматографией).

**[0144]** Сорок седьмой вариант реализации раскрывает способ, описанный в сорок пятом или сорок шестом варианте реализации, в котором фрагмент формулы (I) очищают селективным осаждением и/или экстракцией. В определенных вариантах реализации фрагмент формулы (I) очищают селективным осаждением. В конкретном варианте реализации фрагмент формулы (I) очищают путем добавления CH<sub>3</sub>CN к реакционной смеси, содержащей неочищенный продукт, с последующей фильтрацией для выделения продукта фрагмента.

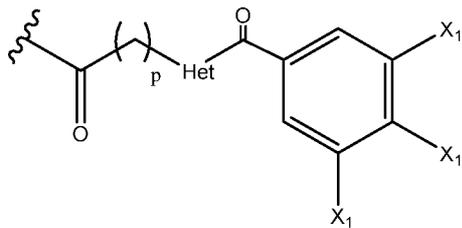
**[0145]** Сорок восьмой вариант реализации раскрывает способ, описанный в сорок пятом, сорок шестом или сорок седьмом варианте реализации, где хроматография (*например*, колоночная хроматография) не используется для очистки продукта реакции на любой из стадий 1), 2), 3) и 4).

**[0146]** Сорок девятый вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из вариантов с сорок пятого по сорок восьмой, где продукт реакции любой из стадий 1), 2), 3) и 4) очищают селективным осаждением (*например*, как описано в двадцать первом, тридцать пять или сорок втором варианте реализации).

**[0147]** В пятидесятом варианте реализации для способов, описанных в любом из с сорок пятого по сорок девятый вариантов реализации, Y представлен следующей формулой:

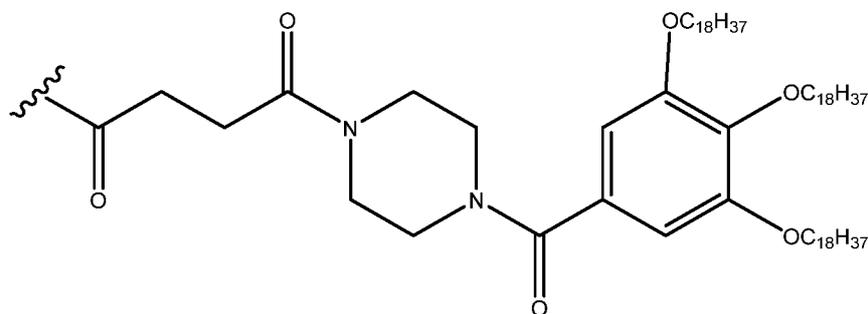


где  $X_0$  представляет собой  $C_{1-10}$ алкил, где одна или более групп  $CH_2$  независимо замещены  $C(O)$ ,  $C(O)NH_2$ , циклоалкильной или гетероциклической группой; и  $X_1$  представляет собой  $C_{1-25}$ алкил или  $C_{1-25}$ алкокси. В конкретном варианте реализации  $Y$  представлен следующей формулой:



где  $p$  равно целому числу от 1 до 10;  $Het$  представляет собой насыщенный гетероцикл; а остальные переменные такие, как описано выше. В более конкретном варианте реализации  $Het$  представляет собой пиперазин.

**[0148]** В пятьдесят первом варианте реализации раскрыт способ, описанный в любом из вариантов с сорок пятого по сорок девятый, где  $Y$  представляет собой:



**[0149]** В некоторых вариантах реализации для способа, описанного в четвертом аспекте или любых вариантах реализации, описанных в нем (*например*, с сорок пятого по пятьдесят первый варианты реализации), реакции снятия защиты на стадии 1) и/или стадии 4) проводят, как описано в первом аспекте или любых вариантах реализации, описанных в нем (*например*, варианты реализации со второго по двенадцатый).

**[0150]** В некоторых вариантах реализации для способа, описанного в четвертом аспекте или в любых вариантах реализации, описанных в нем (*например*, с сорок пятого по пятьдесят первый варианты реализации), реакция сочетания на стадии 2) может быть проведена в присутствии активатора, описанного в данном документе. (*например*, активаторы, описанные в тридцать девятом варианте). В определенных вариантах реализации активатор представляет собой 4,5-дицианоимидазол (DCI) или 5-этилтио-1H-тетразол (ETT).

**[0151]** В определенных вариантах реализации для способа, описанного в четвертом аспекте или в любых вариантах реализации, описанных в нем (*например*, с сорок пятого по пятьдесят первый варианты реализации), реакция сульфуризации на стадии 3) осуществляется с использованием сульфуризирующего агента, такого как 3-амино-1,2,4-дигидро-5-тион (ксантангидрид или ADTT), 3-(N,N-

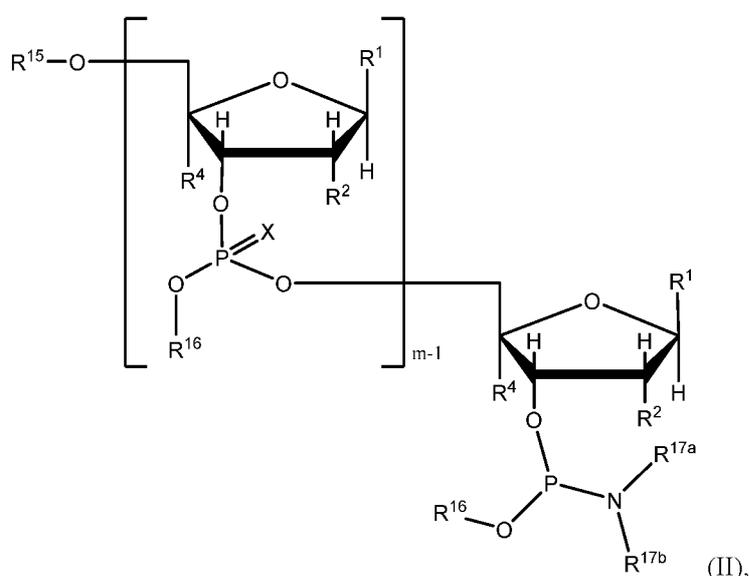
диметиламинометилиден)амино) -3Н-1,2,4-дитиазол (DDTT), фенилацетилдисульфид (PADS), 3Н-1,2-бензодитиол-3-он 1,1-диоксид (Beaucage реагент) или фенил-3Н-1,2,4-дитиазол-3-он (POS). В конкретном варианте реализации сульфурезующим агентом является DDTT. В конкретном варианте реализации сульфурезующий агент представляет собой гидрид ксантана. В определенных вариантах реализации реакцию сульфурезации проводят в присутствии основания, как описано в данном документе. В определенных вариантах реализации основание представляет собой пиридин или имидазол. В определенных вариантах реализации этап сульфурезации на стадии 3) проводят в присутствии DDTT и 4,5-дицианоимидазола (DCI).

**[0152]** В определенных вариантах реализации для способа, описанного в четвертом аспекте или любых вариантах реализации, описанных в нем (*например*, с сорок пятого по пятьдесят первый варианты реализации), реакцию окисления на стадии 3) проводят с использованием стандартных окислителей, известных в литературе. Примеры окислителей включают, но не ограничиваются ими, трет-бутилгидропероксид (t-BuOOH), (1S)-(+)-(10-камфорсульфонил) оксазирин (CSO), I<sub>2</sub> и раствор окислителя йод-пиридин в воде. В конкретном варианте реализации окислитель представляет собой трет-БуООН.

*e. Синтез 5'-олигонуклеотидных фрагментов*

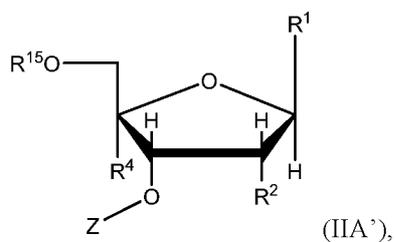
**[0153]** В пятом аспекте данное раскрытие описывает жидкофазный способ получения олигонуклеотидного фрагмента (5'-фрагмента), имеющего фосфорамидитную группу, которая может быть связана с 3'-фрагментом, описанным выше. Неожиданно было обнаружено, что способы данного раскрытия для получения 5'-фрагментов можно использовать для синтеза олигонуклеотидного фрагмента, содержащего от 3 до 20 (*например*, от 3 до 10, от 3 до 8, от 3 до 5 или от 4 до 5) нуклеотидов с высокой чистотой без хроматографической очистки. В некоторых вариантах реализации способы включают селективное снятие защиты с 3'-гидроксильной защитной группы. В некоторых вариантах реализации жидкофазный способ включает (1) стадию снятия защиты с 5'-ОН, (2) стадию сочетания и (3) стадию окисления или сульфурезации, при этом стадии (1), (2) и (3) повторяются до тех пор, пока желаемое количество нуклеотидов не будет связано вместе с образованием 5'-олигонуклеотидного фрагмента.

**[0154]** В пятьдесят втором варианте реализации раскрывается жидкофазный способ получения олигонуклеотидного фрагмента формулы (II),

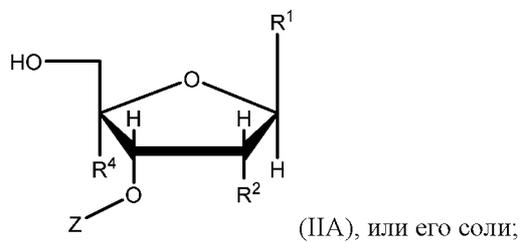


или его соли, включающий стадии:

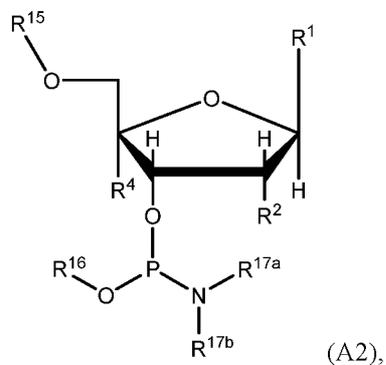
1') снятия защиты с соединения формулы (III')



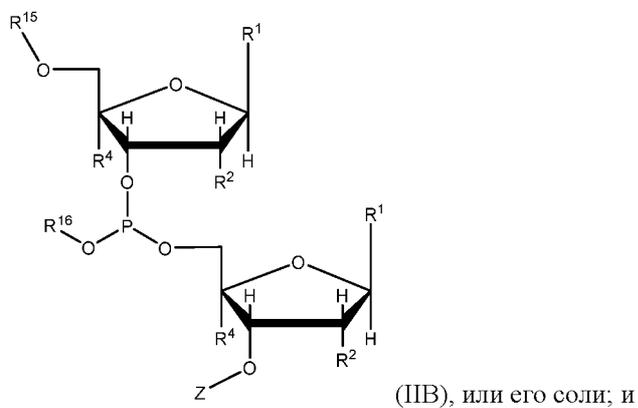
или его соли с образованием соединения формулы (IIA):



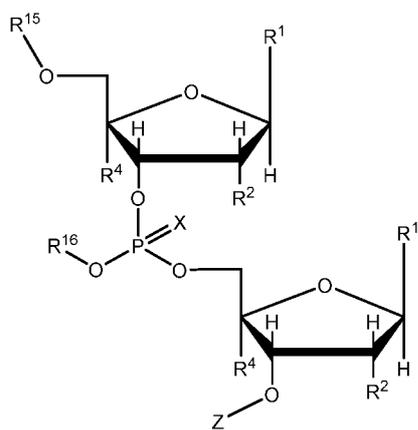
2') взаимодействия соединения формулы (IIA) или его соли с соединением формулы (A2):



или его солью с образованием соединения формулы (IIB):

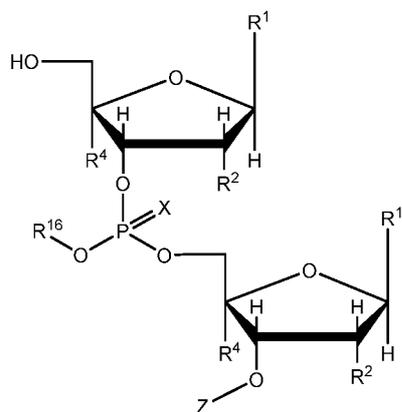


3') сульфуризации или окисления с образованием соединения формулы (IIB), или его соли с помощью агента сульфуризации или окисления с образованием соединения формулы (IIC):



(IIC), или его соли,

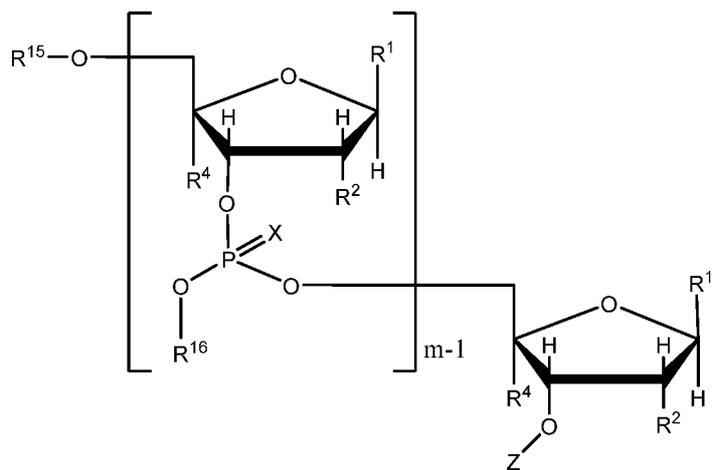
4') снятия защиты с соединения формулы (IIC) или его соли с образованием соединения формулы (IID):



(IID), или его соли;

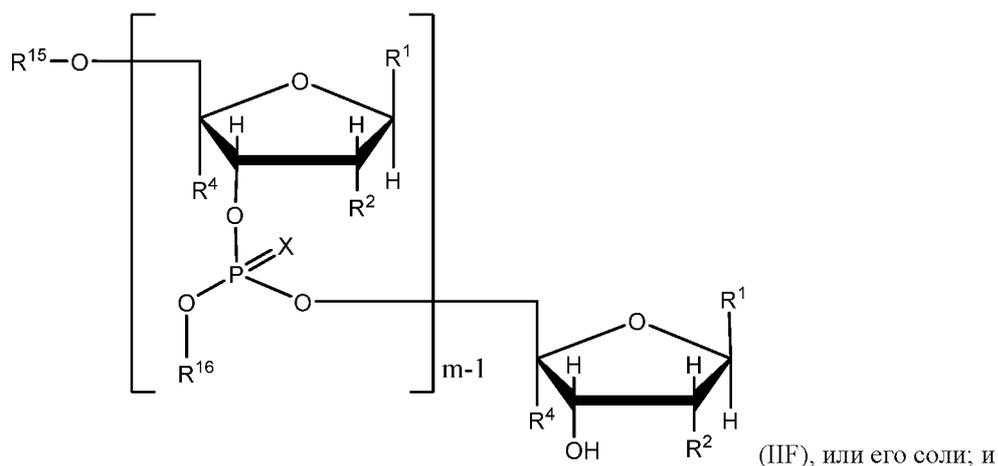
5') когда  $m$  равно 3, начиная с соединения формулы (IID) или его соли, повторяя стадию 2') и стадию 3') с образованием соединения формулы (IIE) или его соли, или

когда  $m$  больше 3, начиная с соединения формулы (IID) или его соли, повторяя стадии 2'), 3') и 4') в течение  $m-3$  раз, затем следует стадия 2') и стадия 3') с образованием соединения формулы (IIE):



(IIE), или его соли,

6') снятия защиты с соединения формулы (IIE) или его соли с образованием соединения формулы (IIF):



7') взаимодействия соединения формулы (IIF) или его соли с фосфордиамидитом  $(R^{16}O)P(NR^{17a}R^{17b})_2$  с получением фрагмента формулы (II) или его соли:

где:

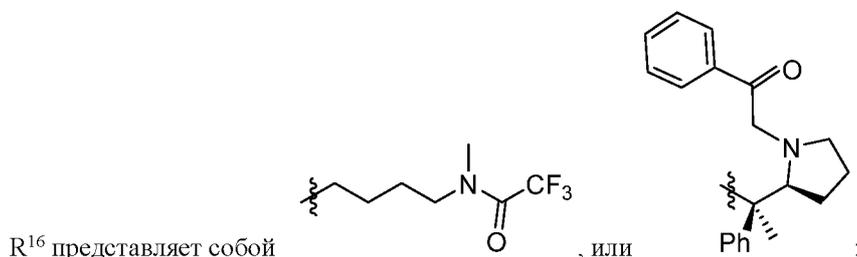
$R^1$  в каждом случае независимо представляет собой нуклеобазу, где  $NH_2$  нуклеобазы, если присутствует, защищено аминозащитной группой;

$R^2$ , в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и  $C_{1-6}$ алкокси, обязательно замещенного  $C_{1-6}$ алкокси;

$R^4$  в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой  $R^2$ ;

$R^{15}$  представляет собой защитную группу гидроксила;

$R^{16}$  в каждом случае независимо представляет собой  $C_{1-6}$ алкильную группу,  $C_{2-6}$ алкенильную группу, фенильную или бензильную группу, каждая из которых обязательно замещена  $-CN$ ,  $-NO_2$  или галогеном; или



$R^{17a}$  и  $R^{17b}$  независимо представляют собой  $C_{1-6}$ алкил;

$m$  равно целому числу от 2 до 20;

$X$  в каждом случае независимо представляет собой O или S; и

$Z$  представляет собой силильную защитную группу гидроксила.

**[0155]** В пятьдесят третьем варианте реализации для способа, описанного в пятьдесят втором варианте реализации, фрагмент формулы (II) не очищается хроматографией (*например*, колоночной хроматографией).

**[0156]** Пятьдесят четвертый вариант реализации раскрывает способ, как описано в пятьдесят втором или пятьдесят третьем варианте реализации, где фрагмент формулы (II) очищают экстракцией и/или селективным осаждением, как описано в данном документе (*например*, как описано в двадцать первом варианте, тридцать пятом или сорок втором вариантах).

**[0157]** В пятьдесят пятом варианте реутилизации раскрыт способ, описанный в вариантах с пятьдесят второго по пятьдесят четвертый, где хроматография не используется для очистки продукта реакции на любой из стадий 1'), 2'), 3'), 4'), 5'), 6') и 7').

**[0158]** В пятьдесят шестом варианте реализации раскрыт способ, описанный в вариантах реализации с пятьдесят второго по пятьдесят пятый, где продукт реакции любого из стадий 1'), 2') 3'), 4'), 5'), 6') и 7') очищают экстракцией и/или селективным осаждением, как описано в данном документе (*например*, как описано в двадцать первом, тридцать пятом или сорок втором вариантах реализации).

**[0159]** В некоторых вариантах реализации реакции снятия защиты на стадии 1 ') и стадии 4') проводят, как описано в первом аспекте или в любых вариантах реализации, описанных в нем (*например*, в любом из вариантов со второго по двенадцатый).

**[0160]** В некоторых вариантах реализации реакцию сочетания на стадии 2') проводят, как описано в четвертом аспекте. В определенных вариантах реализации реакцию сочетания проводят в присутствии активатора, описанного в данном документе (*например*, активаторов, описанных в тридцать девятом варианте реализации). В определенных вариантах реализации активатор представляет собой 4,5-дицианоимидазол (DCI) или 5-этилтио-1Н-тетразол (ЕТТ).

**[0161]** В некоторых вариантах реализации реакцию сульфуризации или окисления на стадии 3') проводят, как описано в четвертом аспекте.

**[0162]** В некоторых вариантах реализации реакцию снятия защиты на стадии 6 ') проводят, как описано во втором аспекте или в любых вариантах реализации, описанных в нем (*например*, в любом из вариантов с двадцать шестого по тридцать четвертый).

**[0163]** В некоторых вариантах реализации реакцию фосфитилирования на стадии 7') проводят, как описано в третьем аспекте или в любых вариантах реализации, описанных в нем (*например*, в любом из вариантов с тридцать девятого по сорок второй).

## **II. Синтез целевых олигонуклеотидов**

### ***д) 3'-5' элонгация:***

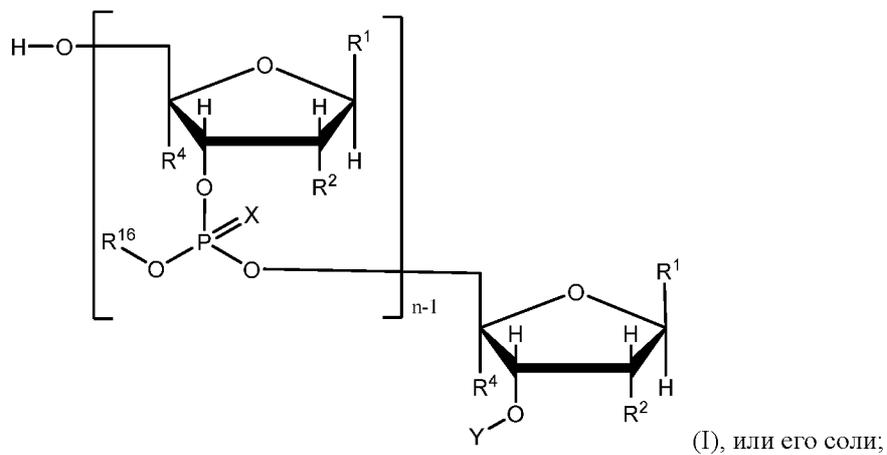
**[0164]** В шестом аспекте данное раскрытие описывает жидкофазный конвергентный синтез целевых олигонуклеотидов, где целевой олигонуклеотид собирается в направлении от 3'-конца к 5'-концу (3'-5' направление). Было продемонстрировано, что конвергентный жидкофазный синтез согласно данного раскрытия успешно используется для синтеза целевых олигонуклеотидов в больших количествах. Кроме того, защищенный целевой олигонуклеотид высокой чистоты может быть получен способами данного раскрытия без хроматографической очистки.

**[0165]** В определенных вариантах реализации описанный в данном документе конвергентный жидкофазный способ включает постадийное добавление олигонуклеотидных фрагментов в жидкой (растворной) фазе для синтеза целевого олигонуклеотида. Например, сначала связывают 5-мерный и 4-мерный фрагменты для синтеза 9-мерного фрагмента, который затем вступает в реакцию с другим 5-мерным фрагментом для синтеза 14-мерного олигонуклеотида. 14-мерный олигонуклеотид может быть дополнительно связан с другим фрагментом до тех пор, пока не будет получена желаемая длина целевого олигонуклеотида. В определенных вариантах реализации 5-мерный фрагмент, имеющий 3'-гидрофобную гидроксилзащитную группу (3'-LHPG) (3'-концевой фрагмент), сначала соединяется с 5-мерным фрагментом с образованием 10-мерного фрагмента, имеющего 3'-LHPG группу, которая затем дополнительно реагирует с 4-мерным фрагментом с образованием 14-мерного фрагмента, который, в свою очередь, соединяется с другим 4-мерным фрагментом с образованием целевого 18-мерного олигонуклеотида. В определенных вариантах реализации 3'-концевой фрагмент, содержащий *n* нуклеотидов (*например*, 5-мерный фрагмент), синтезируется путем связывания одного

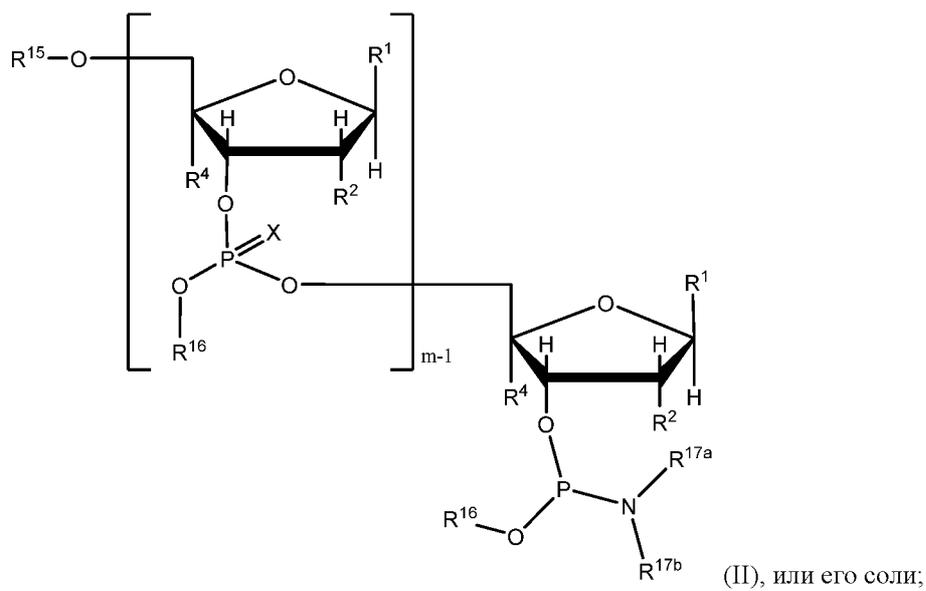
нуклеотида, имеющего 3'-LHPG-группу, с фрагментом, содержащим n-1 нуклеотидов (*например*, 4-мерным фрагментом)

**[0166]** В пятьдесят седьмом варианте реализации раскрыт конвергентный жидкофазный способ для получения целевого олигонуклеотида, включающий стадии:

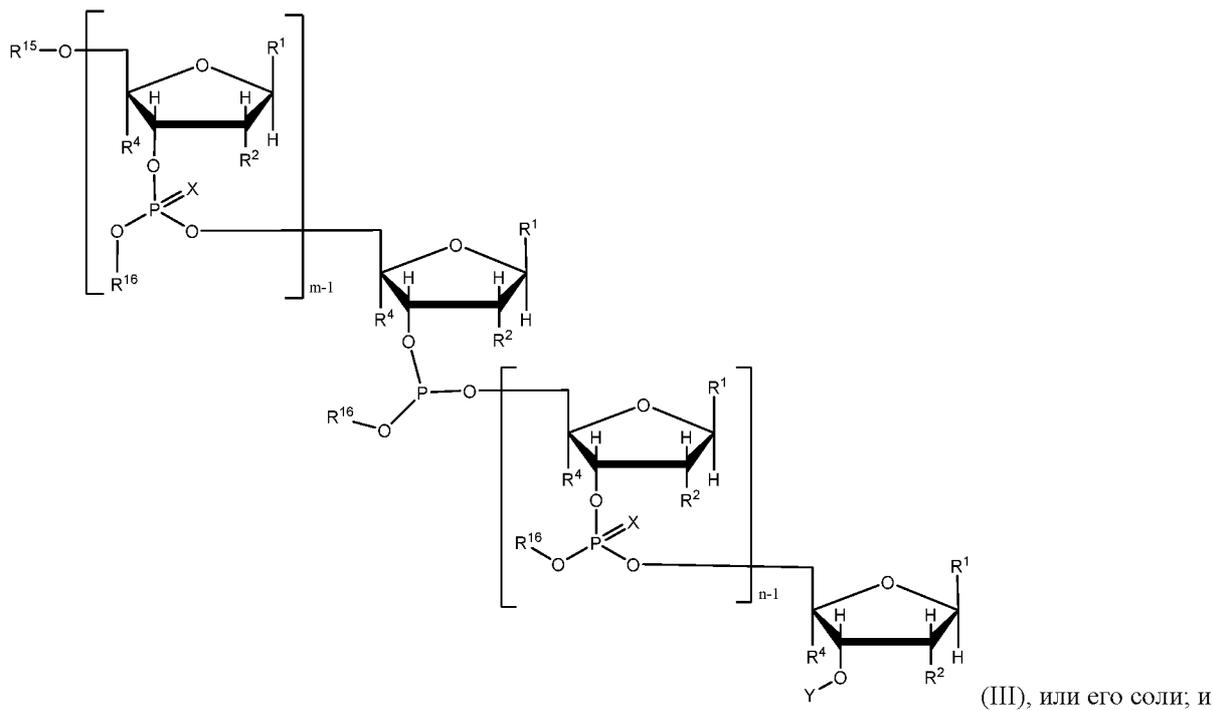
а) связывание олигонуклеотидного фрагмента формулы (I):



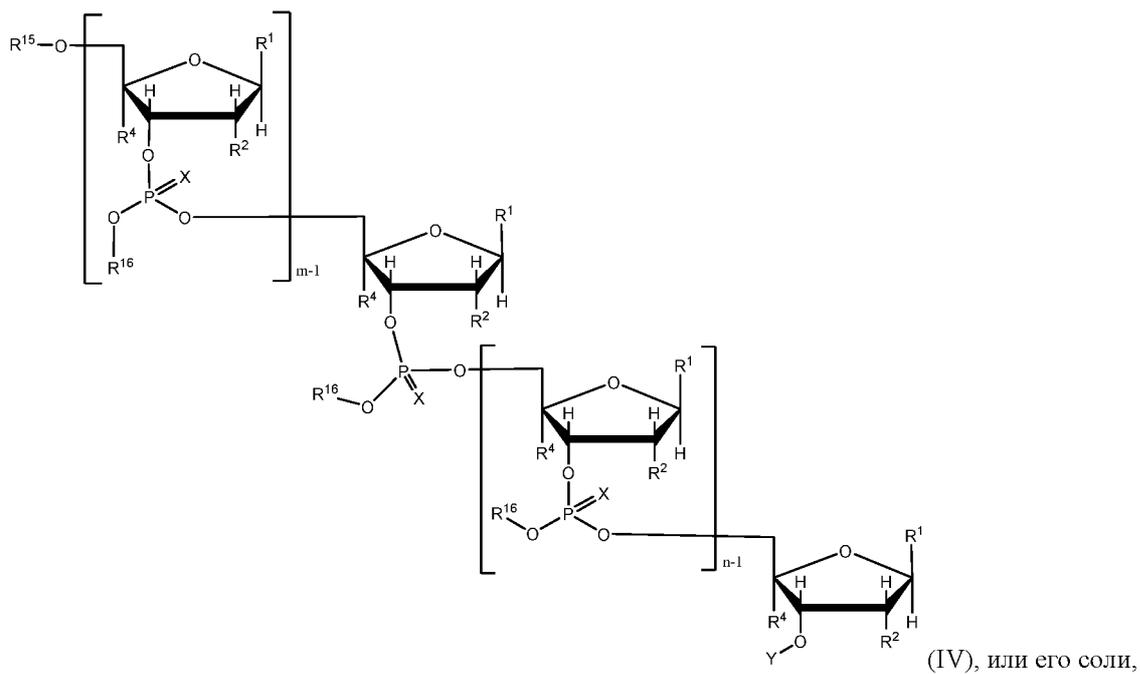
с олигонуклеотидным фрагментом формулы (II):



в растворе с образованием олигонуклеотида формулы (III):



b) сульфуризация или окисление олигонуклеотида формулы (III) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (IV):



где:

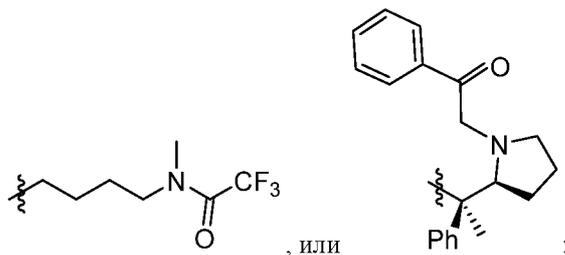
$R^1$  в каждом случае независимо представляет собой нуклеобазу, где  $NH_2$  нуклеобазы, если присутствует, защищено аминозащитной группой;

$R^2$ , в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и  $C_{1-6}$ алкокси, необязательно замещенного  $C_{1-6}$ алкокси;

$R^4$  в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой  $R^2$ ;

$R^{15}$  представляет собой защитную группу гидроксила;

$R^{16}$  в каждом случае независимо представляет собой  $C_{1-6}$ алкильную группу,  $C_{2-6}$ алкенильную группу, фенильную или бензильную группу, каждая из которых необязательно замещена  $-CN$ ,  $-NO_2$  или галогеном; или



$R^{16}$  представляет собой

$R^{17a}$  и  $R^{17b}$  независимо представляют собой  $C_{1-6}$ алкил;

$n$  равно целому числу от 2 до 200;

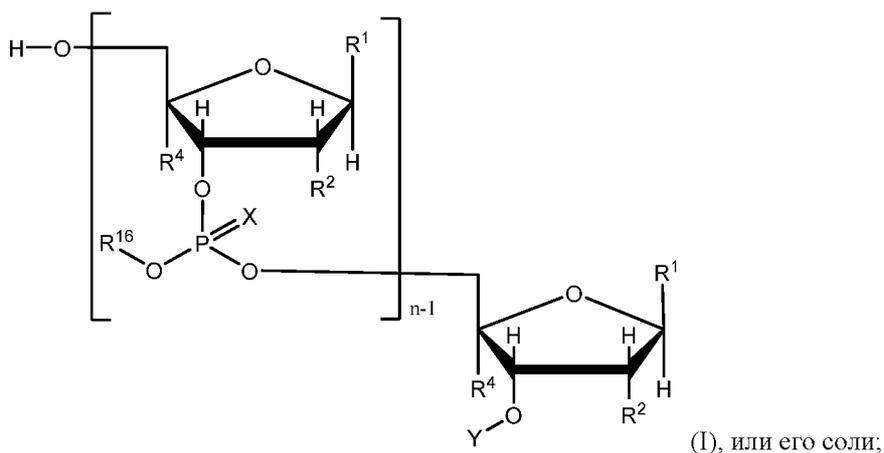
$m$  равно целому числу от 2 до 20;

$X$  в каждом случае независимо представляет собой  $O$  или  $S$ ;

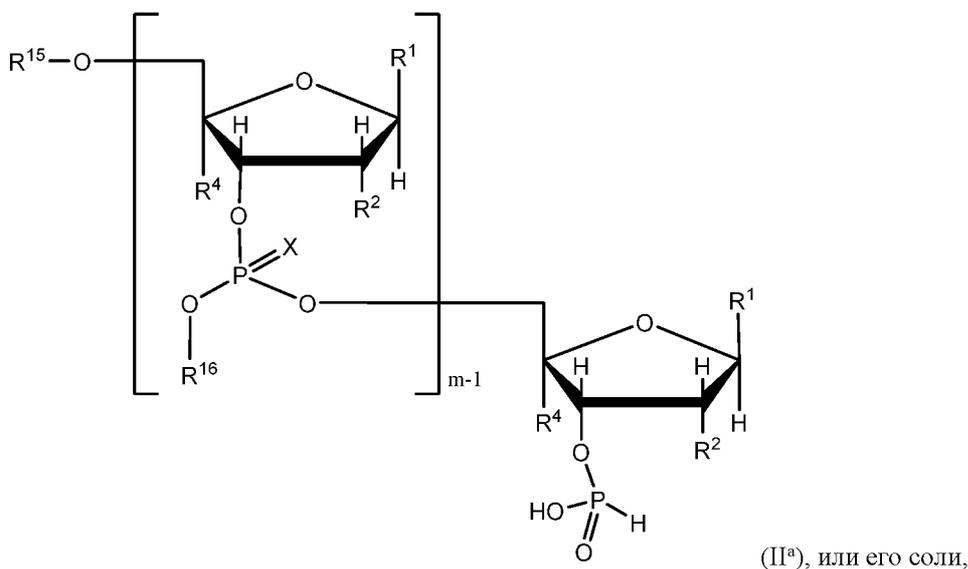
$Y$  представляет собой гидрофобную защитную группу гидроксила, содержащую алкильную цепь.

**[0167]** В пятьдесят седьмой вариант реализации также включен конвергентный жидкофазный способ для получения целевого олигонуклеотида, включающий стадии:

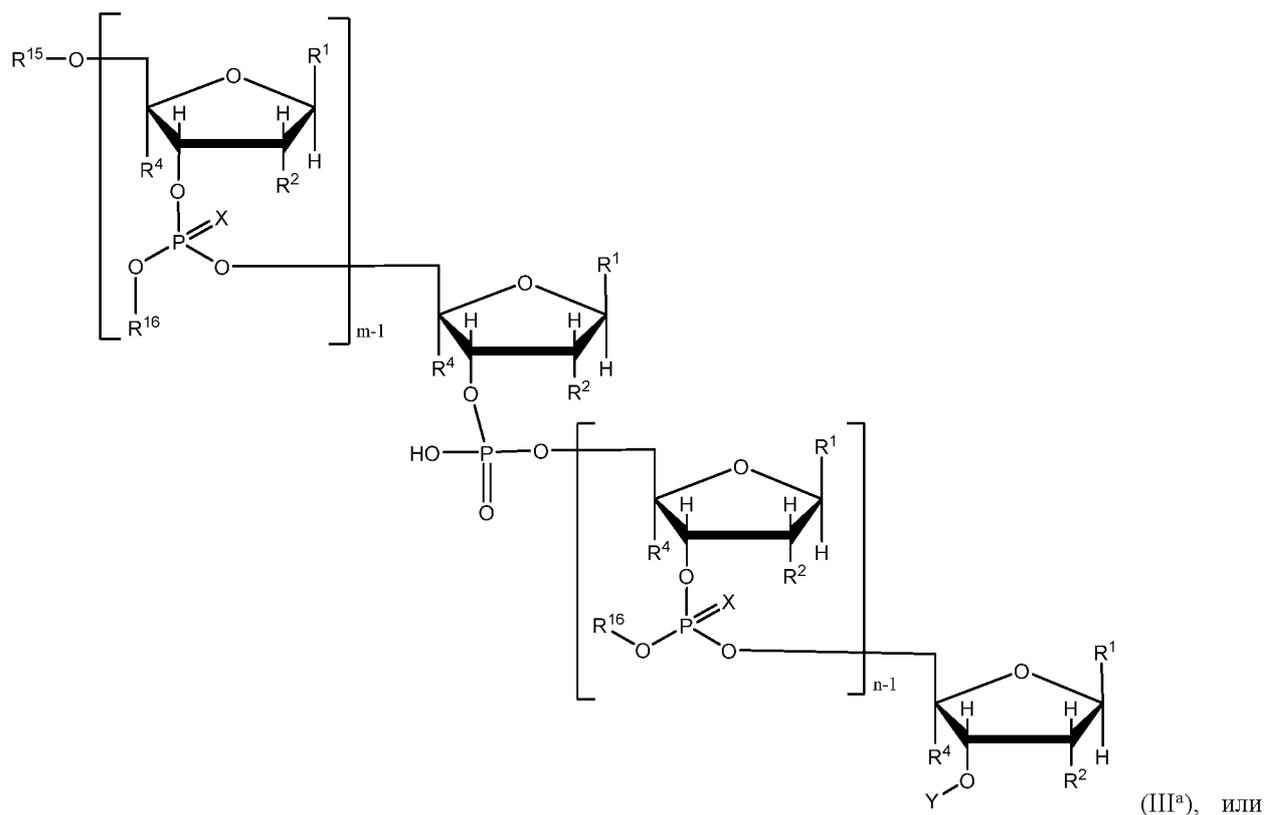
а) связывание олигонуклеотидного фрагмента формулы (I):



с олигонуклеотидным фрагментом формулы (II<sup>a</sup>):



в растворе с образованием олигонуклеотида формулы (III<sup>a</sup>):



его соли; где:

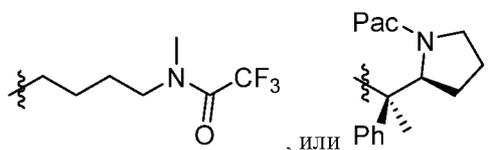
R<sup>1</sup> в каждом случае независимо представляет собой нуклеобазу, где NH<sub>2</sub> нуклеобазы, если присутствует, защищено аминозащитной группой;

R<sup>2</sup>, в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и C<sub>1-6</sub>-алкокси, необязательно замещенного C<sub>1-6</sub>-алкокси;

R<sup>4</sup> в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой R<sup>2</sup>;

R<sup>15</sup> представляет собой защитную группу гидроксила;

R<sup>16</sup> в каждом случае независимо представляет собой C<sub>1-6</sub>-алкильную группу, C<sub>2-6</sub>-алкенильную группу, фенильную или бензильную группу, каждая из которых необязательно замещена -CN, -NO<sub>2</sub> или галогеном; или



R<sup>16</sup> представляет собой

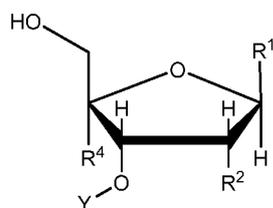
n равно целому числу от 2 до 200;

m равно целому числу от 2 до 20;

X в каждом случае независимо представляет собой O или S;

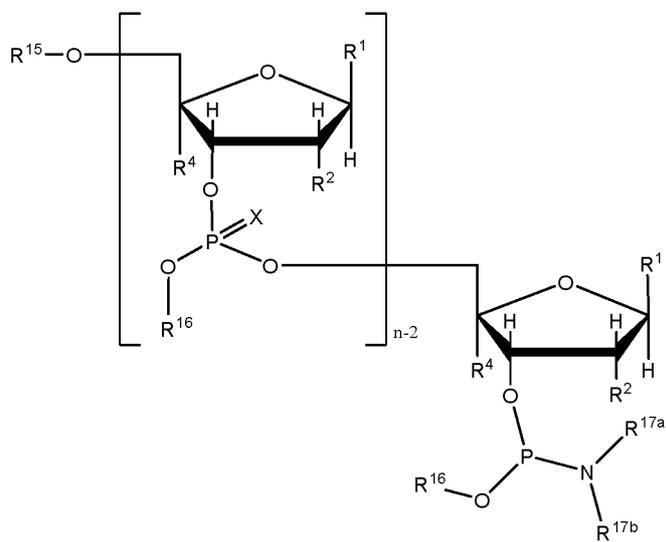
Y представляет собой гидрофобную защитную группу гидроксила, содержащую алкильную цепь.

**[0168]** В пятьдесят восьмом варианте реализации раскрыт способ, описанный в пятьдесят седьмом варианте реализации, где фрагмент формулы (I) может быть синтезирован путем связывания нуклеотида формулы (Ia1):



(Ia1), или его соли;

с олигонуклеотидным фрагментом формулы (Ia2):



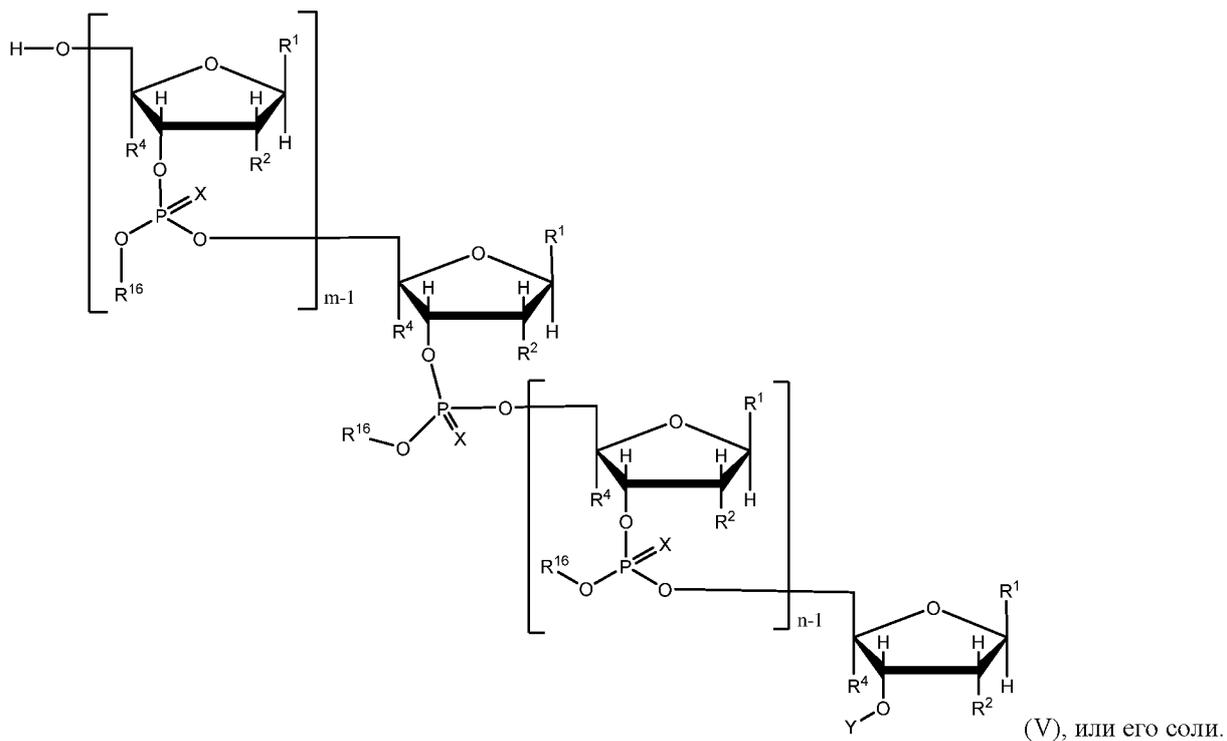
(Ia2), или его соли,

в растворе с образованием олигонуклеотида формулы (I) или его соли.

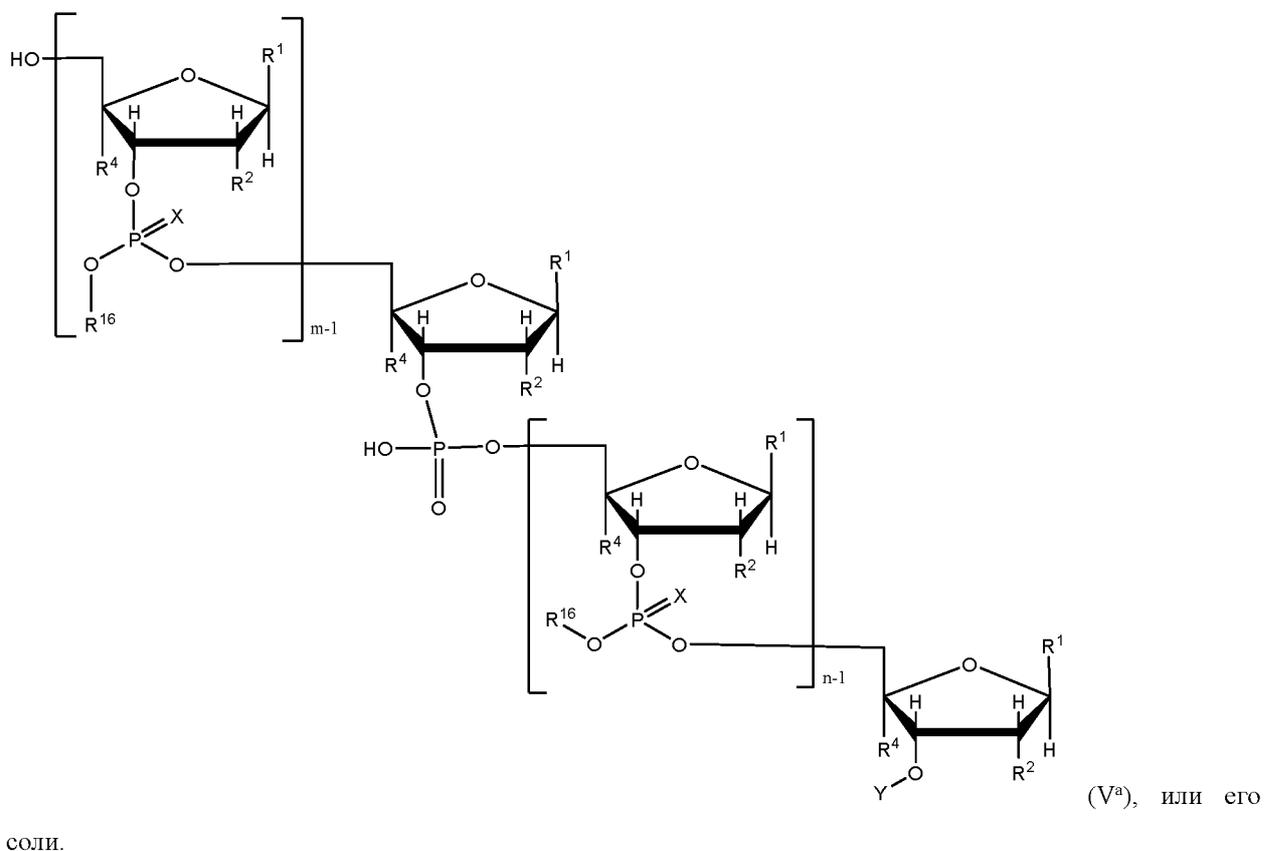
**[0169]** В определенных вариантах реализации для способа, описанного в пятьдесят восьмом варианте осуществления,  $n$  равно целому числу от 3 до 20. В конкретном варианте  $n$  равно от 3 до 6. В другом конкретном варианте  $n$  равно 5.

**[0170]** В определенных вариантах реализации для способа, описанного в пятьдесят восьмом варианте реализации, фрагмент (I) не очищается хроматографией. В другом варианте реализации фрагмент (I) очищают селективным осаждением и/или экстракцией (например, как описано в сорок шестом и сорок седьмом вариантах реализации).

**[0171]** В пятьдесят девятом варианте реализации раскрыт способ, описанный в пятьдесят седьмом или пятьдесят восьмом варианте реализации, дополнительно включающий стадию с) снятия защиты с олигонуклеотида формулы (IV) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (V):

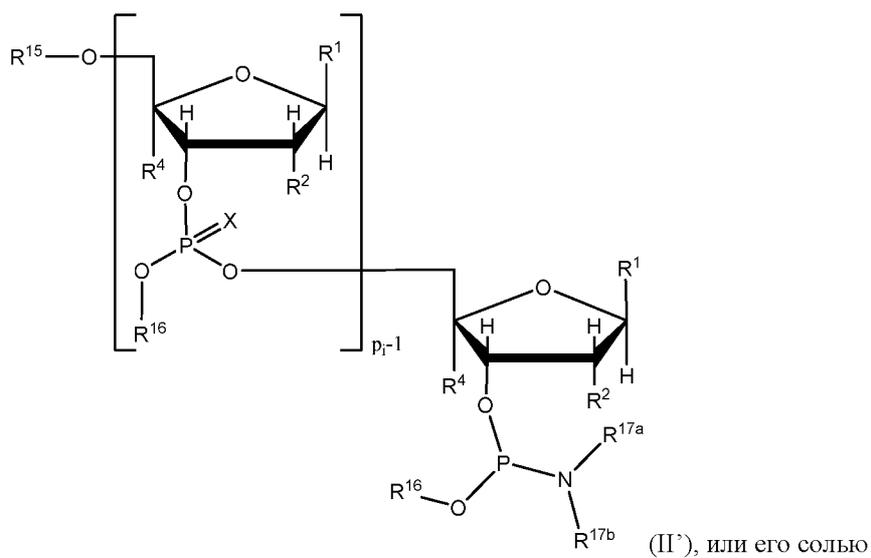


**[0172]** В пятьдесят девятом варианте реализации также предусмотрен способ, описанный в пятьдесят седьмом или пятьдесят восьмом варианте реализации, дополнительно включающий стадию б) снятия защиты с олигонуклеотида формулы (III<sup>a</sup>) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (V<sup>a</sup>):

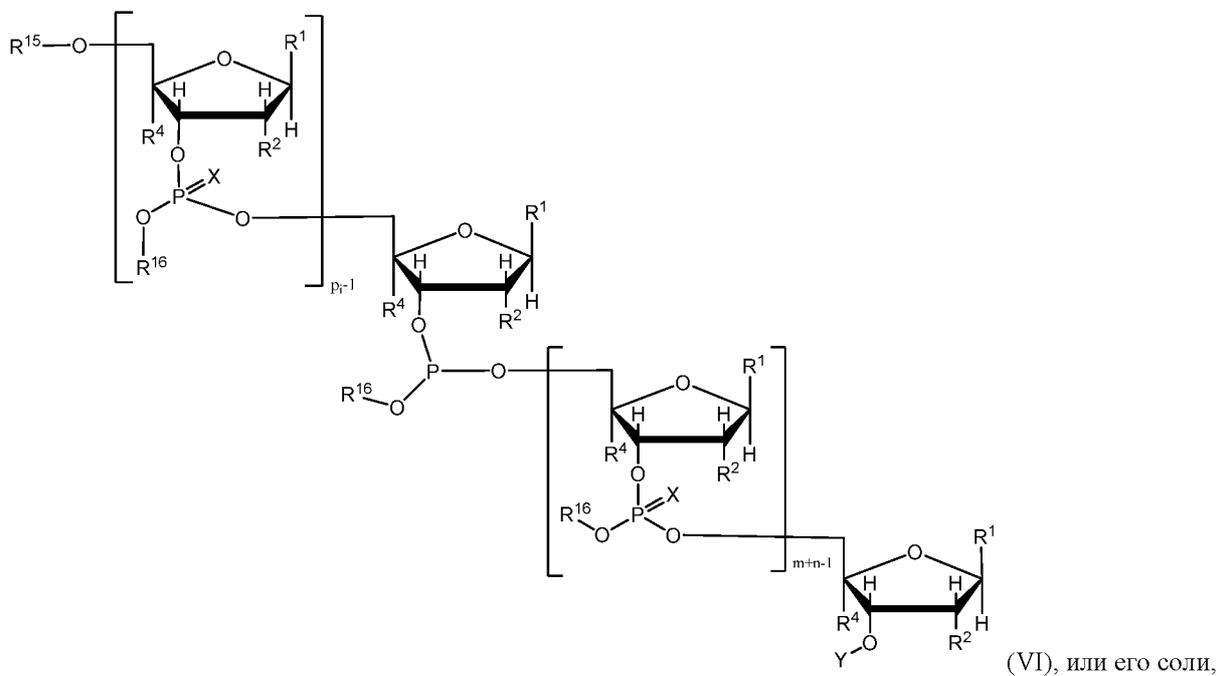


**[0173]** Шестидесятый вариант реализации раскрывает способ, описанный в пятьдесят девятом варианте реализации, дополнительно содержащий:

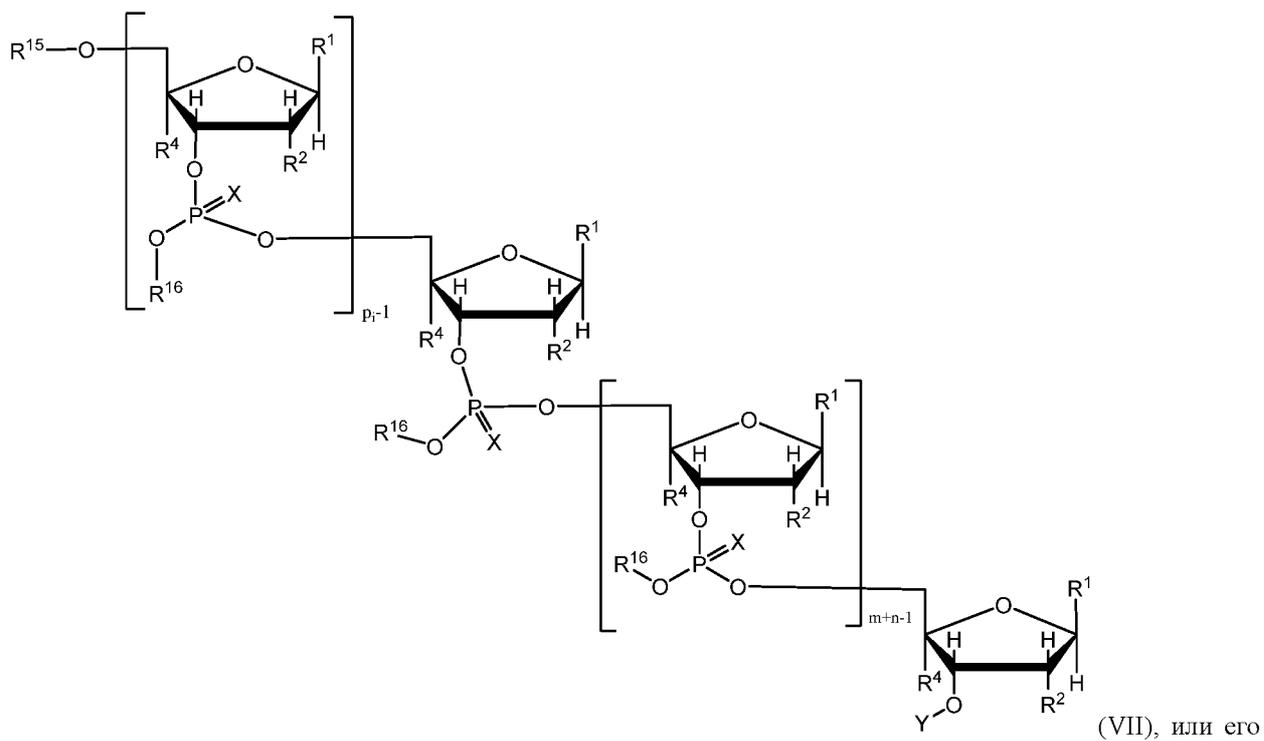
d) связывание олигонуклеотида формулы (V) или его соли с олигонуклеотидным фрагментом формулы (II<sup>o</sup>): .



с образованием олигонуклеотида формулы (VI):

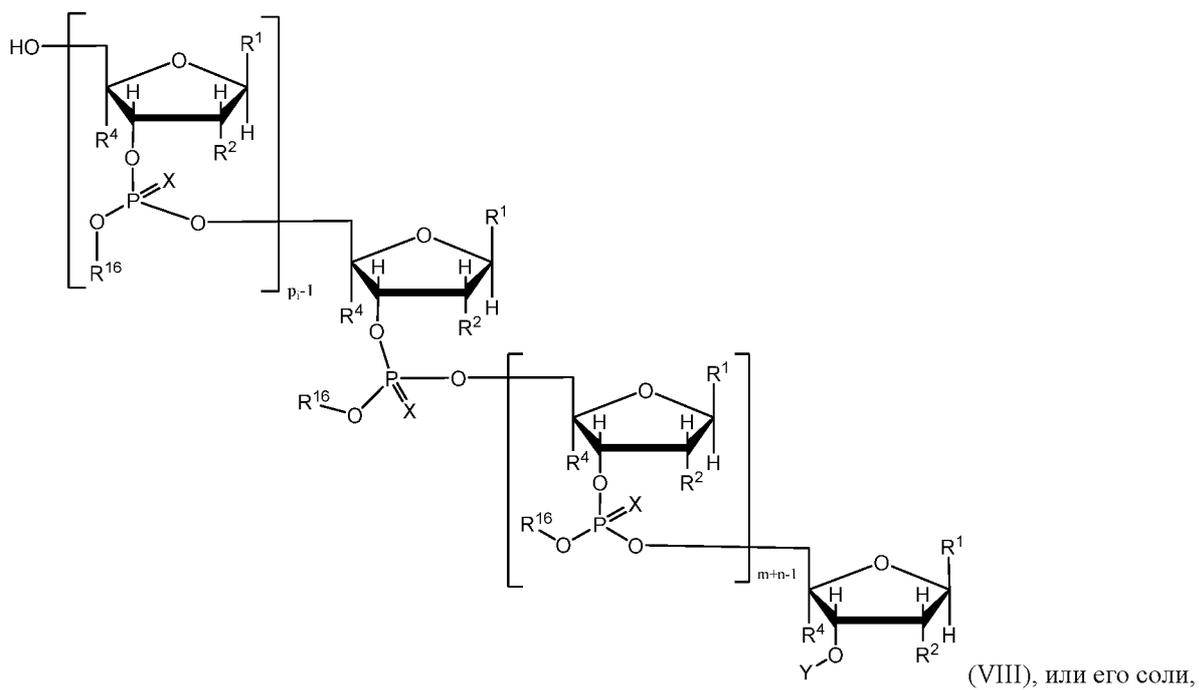


e) сульфуризацию или окисление олигонуклеотида формулы (VI) с образованием олигонуклеотида формулы (VII):

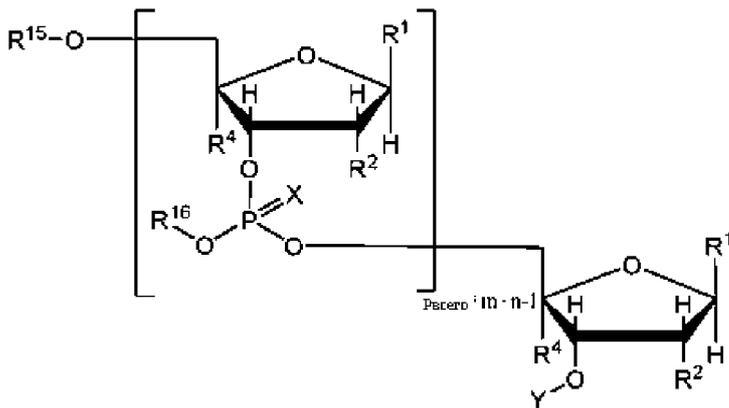


соли,

f) снятие защиты с олигонуклеотида формулы (VII) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (VIII):



g) повторение стадий d), e) и f) в течение г-1 раз с последующим повторением стадий d) и e) с образованием олигонуклеотида формулы (IX):



(IX), или его соли

где:

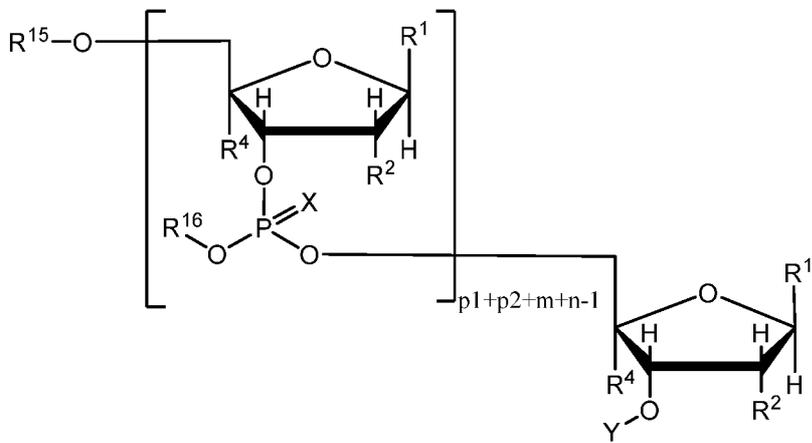
$r$  равно целому числу от 1 до 50;

$p_i$  для каждого случая независимо равно целому числу от 2 до 20,

$i$  равно целому числу от 1 до  $r$ , и

$$p_{\text{всего}} = \sum_{i=1}^r p_i$$

**[0174]** Шестьдесят первый вариант реализации раскрывает способ, описанный в шестидесятом варианте реализации, где  $r$  равно 2 и олигонуклеотид формулы (IX) представлен формулой (X):



(X),

где  $p_1$  и  $p_2$ , каждое независимо, равно целому числу от 2 до 20. В определенных вариантах реализации  $m$ ,  $n$ ,  $p_1$  и  $p_2$ , каждое независимо, равны целым числам от 3 до 10, от 3 до 6 или от 4 до 6. В определенных вариантах реализации  $m$ ,  $n$ ,  $p_1$  и  $p_2$  каждое независимо равны 4 или 5. В определенных вариантах реализации,  $m$  и  $n$  оба равны 5; а  $p_1$  и  $p_2$  оба равны 4,

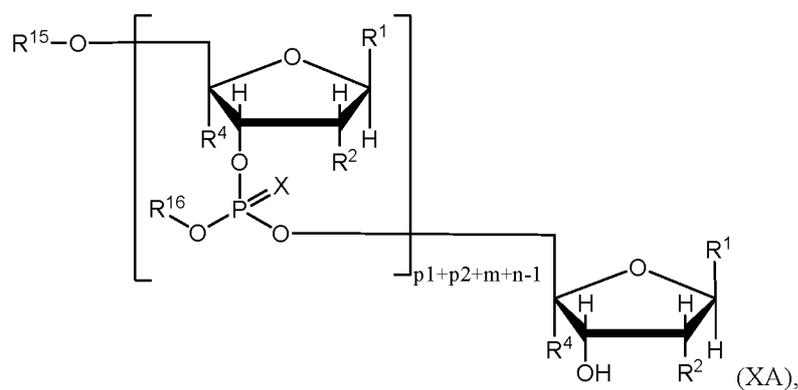
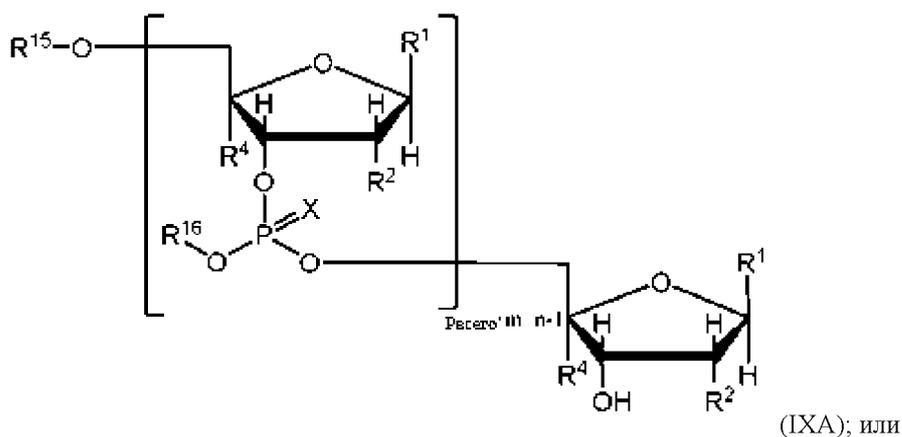
**[0175]** Шестьдесят второй вариант реализации раскрывает способ, описанный в пятьдесят седьмом-шестидесятом первом, где хроматография (*например*, колоночная хроматография) не используется для очистки продукта реакции на любой из стадий а), б), с), д), е), ф) и г).

**[0176]** Шестьдесят третий вариант реализации раскрывает способ, описанный в вариантах реализации с пятьдесят седьмого по шестидесяты второй, где продукт реакции любой из стадий а), б), с), д), е), ф) и г)

очищается. экстракцией и/или селективным осаждением, как описано в данном документе (например, как описано в двадцать первом, тридцать пятом, сорок втором, сорок шестом и сорок седьмом вариантах реализации).

**[0177]** В определенных вариантах реализации способ, описанный в вариантах реализаций с шестидесятого по шестьдесят третий, дополнительно включает стадию:

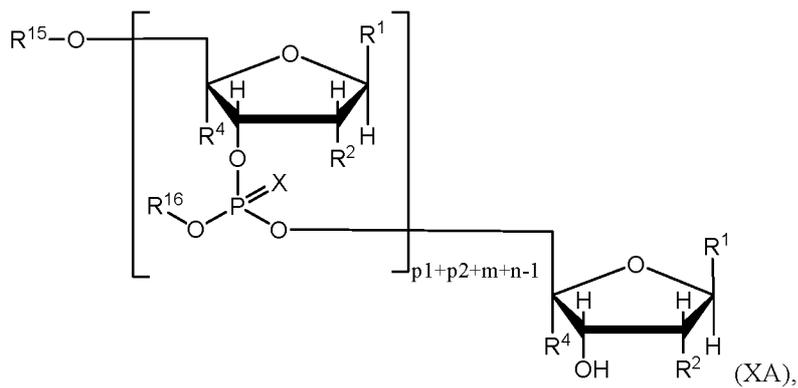
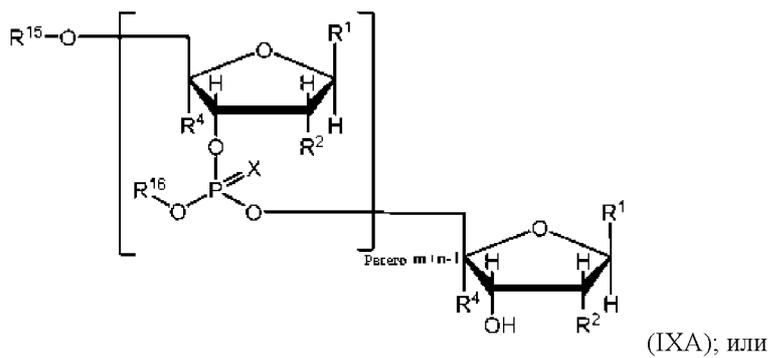
h1) снятия защиты с олигонуклеотида (IX) или (X) с образованием олигонуклеотида формулы (IXA) или (XA):



или его соль.

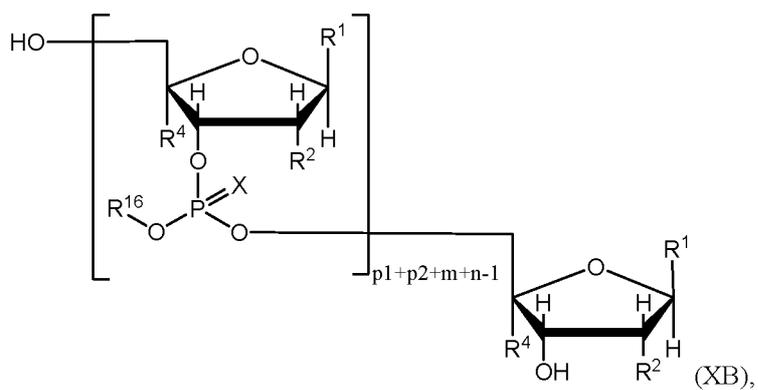
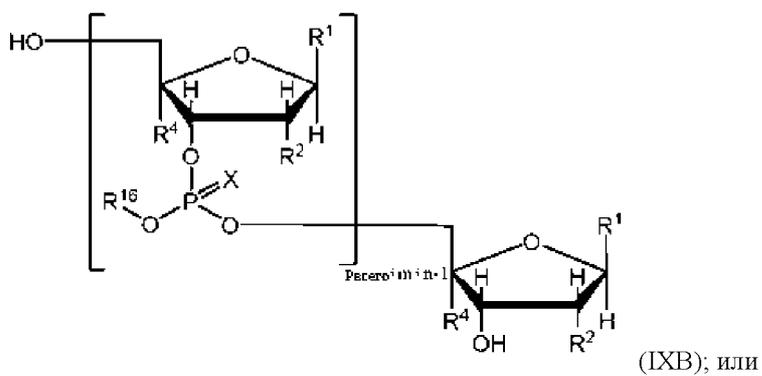
**[0178]** В определенных вариантах реализации способ, описанный в вариантах реализаций с шестидесятого по шестьдесят третий, дополнительно включает стадию:

h1) снятия защиты с олигонуклеотида (IX) или (X) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (IXA) или (XA):



или его соль.

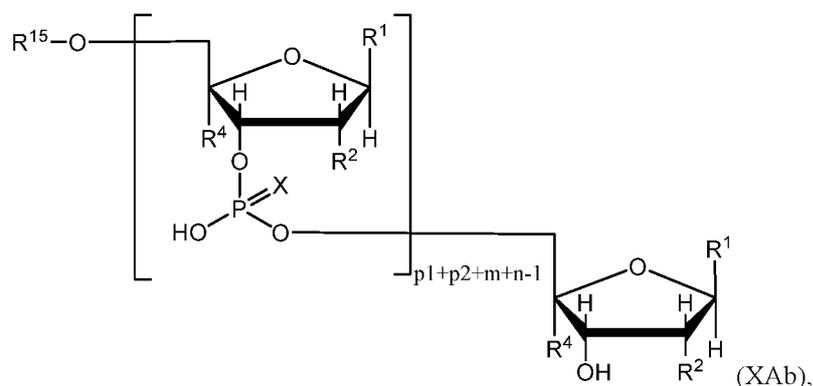
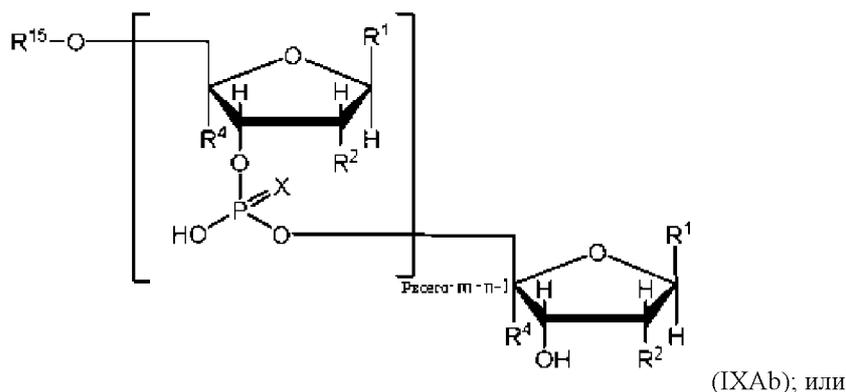
h2) снятия защиты с олигонуклеотида (IXA) или (XA) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (IXB) или (XB):



или его соль.

**[0179]** В определенных вариантах реализации для стадии h1), описанной выше, олигонуклеотид формулы (IXA) или (XA) получают путем взаимодействия олигонуклеотида формулы (IX) или (X) с  $\text{NH}_4\text{OH}$ . В определенных вариантах реализации обработка  $\text{NH}_4\text{OH}$  также удаляет другие защитные группы в олигонуклеотидах, такие как защитные группы в любых нуклеосообразованиях (*например*, защитная группа  $\text{NH}_2$  в нуклеосообразованиях). В определенных вариантах реализации обработка  $\text{NH}_4\text{OH}$  приводит к олигонуклеотидам формулы (IXA) или (XA) или их соли, где  $\text{R}^1$  в каждом случае независимо представляет собой нуклеосообразование, где  $\text{NH}_2$  нуклеосообразования, если присутствует, не защищена

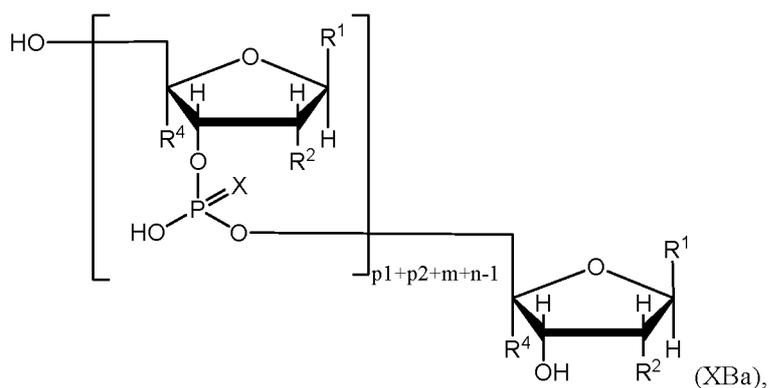
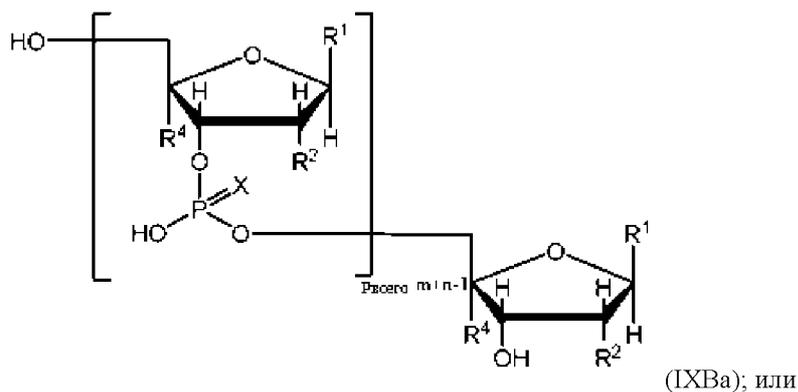
**[0180]** В шестьдесят четвертом варианте реализации способ, описанный в вариантах реализации с шестидесятого по шестьдесят третий, где, когда  $\text{R}^{16}$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ , снятие защиты с олигонуклеотида (IX) или (X) или его соли образует олигонуклеотид формулы (IXAb) или (XAb):



или его соль. В определенных вариантах реализации реакцию снятия защиты проводят путем взаимодействия олигонуклеотида (IX) или (X) или его соли с  $\text{NH}_4\text{OH}$  с образованием олигонуклеотида формулы (IXAb) или (XAb). В определенных вариантах реализации обработка  $\text{NH}_4\text{OH}$  также удаляет другие защитные группы в олигонуклеотидах, такие как защитные группы в любых нуклеосообразованиях (*например*,  $\text{NH}_2$ -защитная группа в нуклеосообразованиях). В определенных вариантах реализации обработка  $\text{NH}_4\text{OH}$  приводит к олигонуклеотидам формулы (IXAb) или (XAb) или их соли, где  $\text{R}^1$  в каждом случае независимо представляет собой нуклеосообразование, где  $\text{NH}_2$  нуклеосообразования, если присутствует, является незащищенной.

**[0181]** В определенных вариантах реализации в способе, описанном в шестьдесят четвертом варианте реализации, способ дополнительно включает стадию:

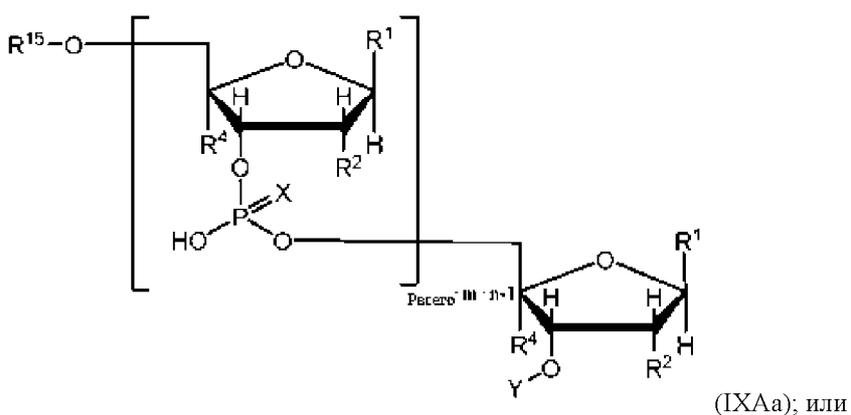
снятия защиты с олигонуклеотида (IXAb) или (XAb) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (IXBa) или (XBa):

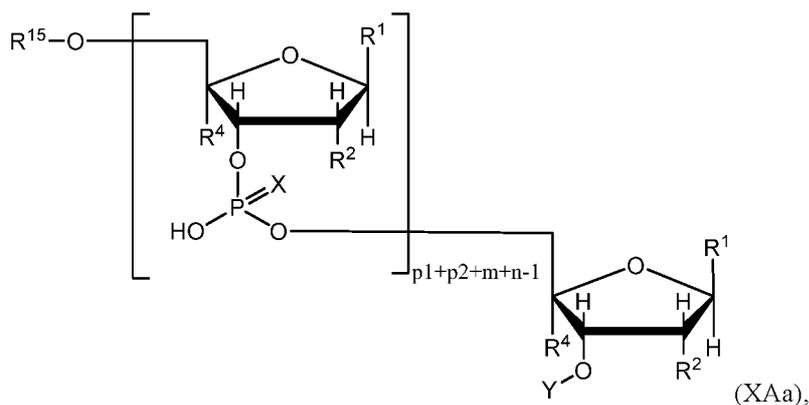


или его соль. В определенных вариантах реализации олигонуклеотид (IXA) или (XA) реагирует с лимонной кислотой с образованием олигонуклеотида формулы (IXBa) или (XBa).

**[0182]** В шестьдесят пятом варианте реализации в способе, описанном в вариантах реализаций с шестидесятого по шестьдесят третий, где  $R^{16}$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ , способ дополнительно включает стадию:

h1) снятие защиты с олигонуклеотида (IX) или (X) с образованием олигонуклеотида формулы (IXAa) или (XAa):

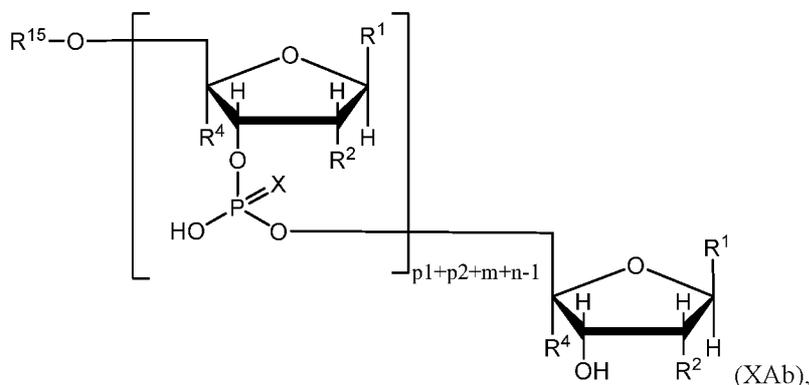
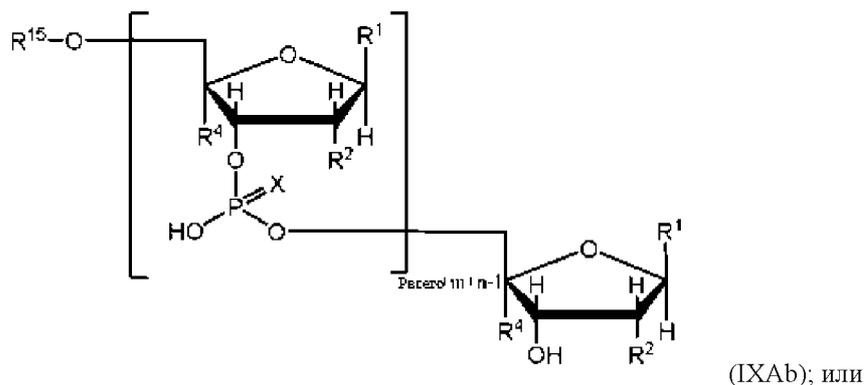




или его соль.

**[0183]** В определенных вариантах реализации в способе шестьдесят пятого варианта реализации реакцию снятия защиты проводят путем взаимодействия олигонуклеотида (IX) или (X) или его соли с основанием. В определенных вариантах реализации основание выбрано из 1,8-диазобисцикло[5.4.0]ундец-7-ена, алкиламина (например, трет-бутиламина, втор-бутиламина, диизопропилэтиламина, триметиламина) и других подходящих органических оснований.

**[0184]** Шестьдесят шестой вариант реализации раскрывает способ, описанный в шестьдесят пятом варианте реализации, где способ дополнительно включает стадию снятия защиты с олигонуклеотида (IXAa) или (XAa) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (IXAb) или (XAb):



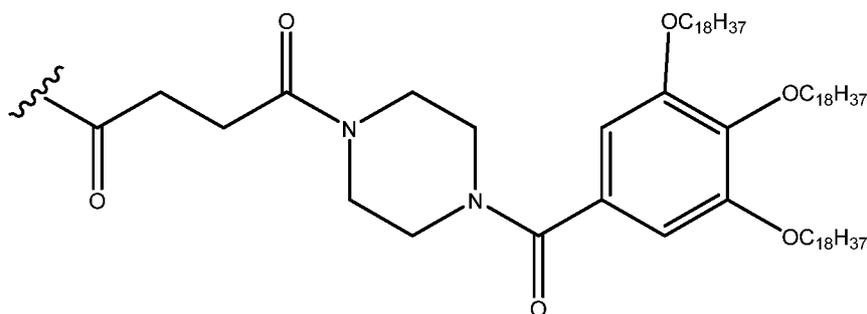
или его соли.

**[0185]** В определенных вариантах реализации в способе, описанном в шестьдесят шестом варианте реализации, снятие защиты с олигонуклеотида (IXAa) или (XAa) или его соли осуществляется путем взаимодействия олигонуклеотида (IXAa) или (XAa) или его соли с  $\text{NH}_4\text{OH}$ . В определенных вариантах

реализации обработка  $\text{NH}_4\text{OH}$  также удаляет другую защитную группу в олигонуклеотидах, такую как защитные группы в любых нуклеосообразованиях (*например*,  $\text{NH}_2$  защитная группа в нуклеосообразованиях). В определенных вариантах реализации обработка  $\text{NH}_4\text{OH}$  приводит к олигонуклеотидам формулы (IXAb) или (XAb) или их соли, где  $\text{R}^1$  в каждом случае независимо представляет собой нуклеосообразование, где  $\text{NH}_2$  нуклеосообразования, если присутствует, не защищена.

**[0186]** В определенных вариантах реализации олигонуклеотид (IXAb) или (XAb) или его соль могут дополнительно реагировать с реагентом для снятия защиты (*например*, реагентом детритилирования) с образованием олигонуклеотида формулы (IXBa) или (XBa) или его соли.

**[0187]** В одном варианте реализации для способов, описанных в шестом аспекте или любых вариантах реализации, описанных в нем (*например*, варианты реализации с пятидесяти седьмого по шестьдесят шестой), Y представляет собой:



**[0188]** В определенных вариантах реализации олигонуклеотид формулы (IXA) или (XA), полученный на стадии h1), или олигонуклеотид формулы (IXAb) или (XAb) очищают глубинной фильтрацией. В одном варианте реакцию смесь стадии h1) разбавляют раствором сульфата аммония перед тем, как подвергнуть ее глубинной фильтрации. Разбавление сульфатом аммония может предотвратить прилипание олигонуклеотида к фильтру.

**[0189]** В определенных вариантах реализации концентрация раствора сульфата аммония составляет от 100 мМ до 5М, от 500 мМ до 2М, от 500 до 1500 мМ или от 1000 до 1200 мМ.

**[0190]** Для глубинной фильтрации можно использовать любые подходящие глубинные фильтры. Используемый в данном документе термин «глубинный фильтр» относится к фильтрам, в которых используется пористая фильтрующая среда для удержания частиц через среду, а не только на ее поверхности. Эти фильтры обычно используются, когда текущая среда содержит большое количество частиц, потому что, по сравнению с другими типами фильтров, они могут удерживать большую массу частиц, прежде чем засорятся. Неожиданно было обнаружено, что глубинная фильтрация может эффективно удалять побочный продукт LHPG-OH (*например*, Y-OH) из реакционной смеси перед ее очисткой НИС.

**[0191]** В определенных вариантах реализации глубинные фильтры содержат вспомогательное фильтрующее средство, такое как диатомовая земля, целлюлоза, полиакриловое волокно и диоксид кремния, а также активированный уголь.

**[0192]** В определенных вариантах реализации олигонуклеотид формулы (IXA), (IXAb), (XA) или (XAb), полученный на стадии h1), очищают глубинной фильтрацией с последующей хроматографией гидрофобного взаимодействия (НИС).

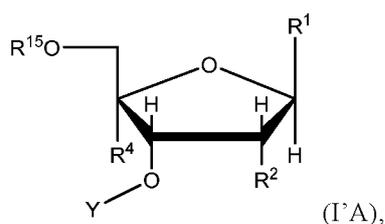
**[0193]** В определенном варианте реализации для стадии h2), описанной выше, олигонуклеотид формулы (IXA), (IXAa), (IXAb), (XA), (XAa) или (XAb) реагирует с реагентом детритилирования, описанным в данном документе, с образованием олигонуклеотида формулы (IXB), (IXBa), (XB) или (XBa). В одном варианте реализации реагент детритилирования представляет собой органическую кислоту. В одном варианте

реализации органическая кислота представляет собой уксусную кислоту или лимонную кислоту. В конкретном варианте реализации реагент детритилирования представляет собой лимонную кислоту. В одном варианте реализации  $R^{15}$  в формуле (IXA), (IXAa), (IXAb), (XA), (XAa) или (XAb) представляет собой 4,4'-диметокситритильную группу. В определенных вариантах реализации реакцию детритилирования на стадии h2) проводят в водном растворе.

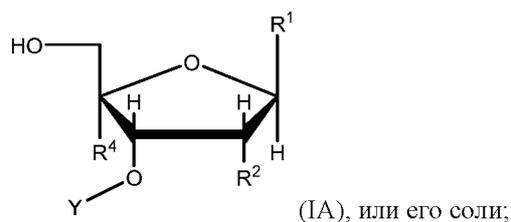
**[0194]** В определенном варианте реализации олигонуклеотид формулы (IXB), (IXBa), (XB) или (XBa), полученный на стадии h2), очищают с помощью анионообменной хроматографии.

**[0195]** Шестидесят седьмой вариант реализации раскрывает способ, описанный в вариантах реализации с пятьдесят седьмого по шестьдесят шестой, в котором фрагмент (I) получают посредством:

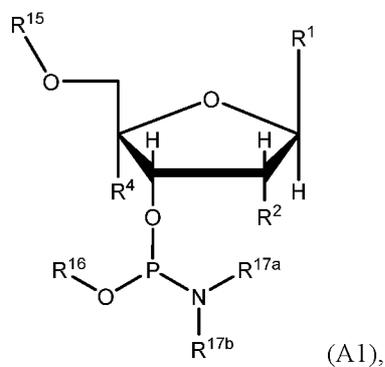
1) снятия защиты с соединения формулы (I'A):



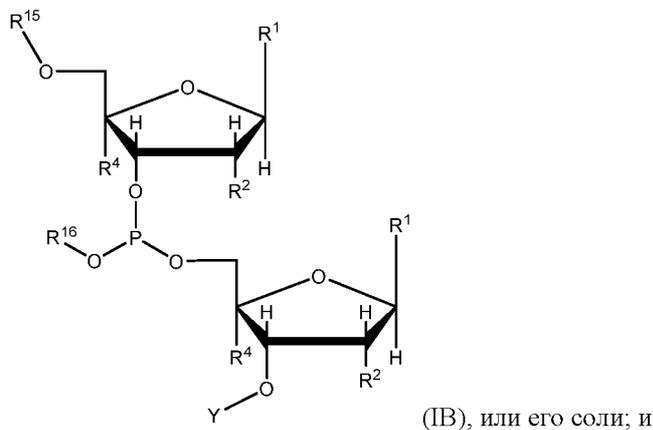
или его соли с образованием соединения формулы (IA):



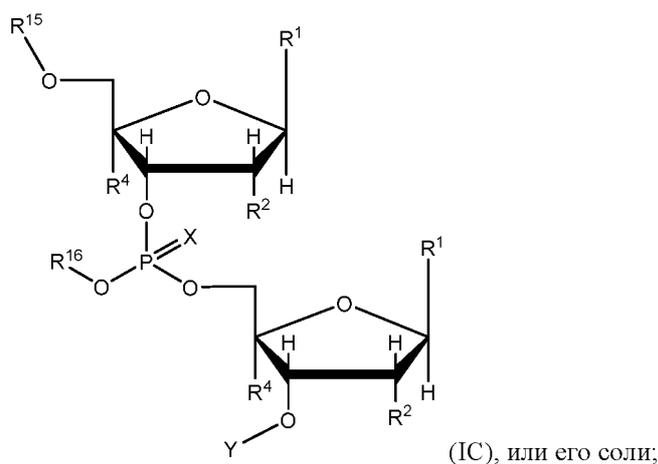
2) взаимодействия соединения формулы (IA) или его соли с соединением формулы (A1):



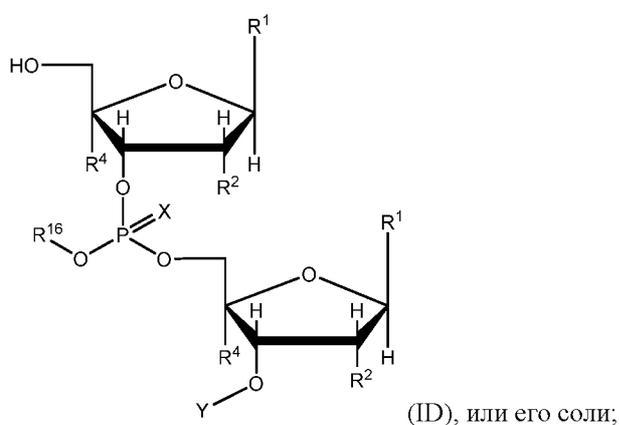
или его солью с образованием соединения формулы (IB):



3) сульфуризации или окисления соединения формулы (IB) или его соли с помощью агента сульфуризации или окисления с образованием соединения формулы (IC):



4) снятия защиты с соединения формулы (IC) или его соли с образованием соединения формулы (ID):

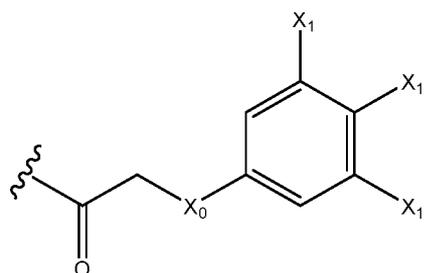


5) начиная с соединения формулы (ID), повторяя стадии 2), 3) и 4) n-2 раз, чтобы получить фрагмент формулы (I) или его соль.

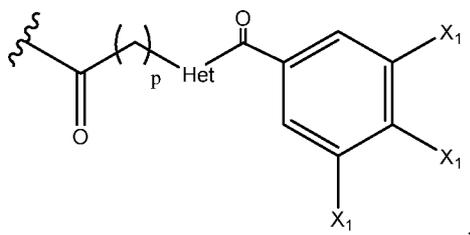
**[0196]** Шестьдесят восьмой вариант реализации раскрывает способ, описанный в шестидесяти семи вариантах реализации, в котором хроматография (*например*, колоночная хроматография) не используется для очистки продукта реакции любой из стадий 1), 2), 3), 4) и 5).

**[0197]** Шестьдесят девятый вариант реализации раскрывает способ, описанный в шестидесяти семи или шестьдесят восьмом варианте реализации, в котором продукт реакции любой из стадий 1), 2), 3), 4) и 5) очищают экстракцией и/или селективным осаждением, как описано в данном документе (*например*, как описано в двадцать первом, тридцать пятом, сорок втором, сорок шестом или сорок седьмом вариантах реализации).

**[0198]** Семидесятый вариант реализации раскрывает способ, описанный в вариантах реализации с пятьдесят седьмого по шестьдесят девятый, где Y представлен следующей формулой:

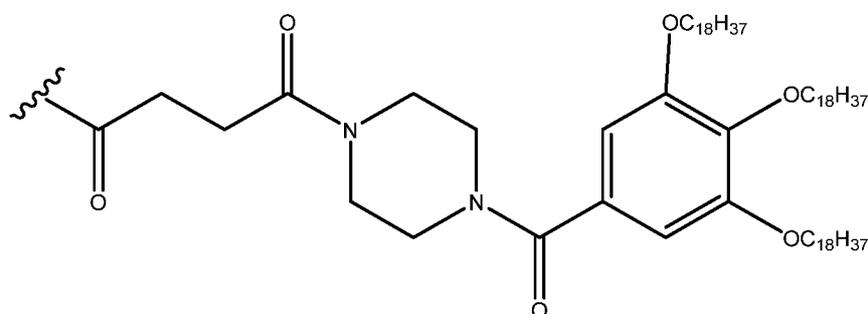


где  $X_0$  представляет собой  $C_{1-10}$ алкил, где одна или более групп  $CH_2$  независимо замещены  $C(O)$ ,  $C(O)NH_2$ , циклоалкильной или гетероциклической группой; и  $X_1$  представляет собой  $C_{1-25}$ алкил или  $C_{1-25}$ алкокси. В конкретном варианте реализации  $Y$  представлен следующей формулой:



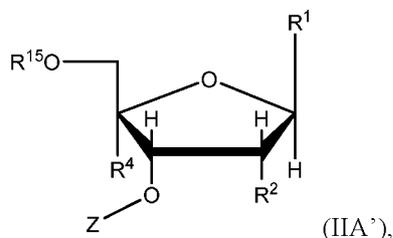
где  $p$  равно целому числу от 1 до 10; Het представляет собой насыщенный гетероцикл; а остальные переменные такие, как описано выше. В более конкретном варианте реализации Het представляет собой пиперазин.

**[0199]** Семьдесят первый вариант реализации раскрывает способ, описанный в пятьдесят седьмом-шестидесяти девятом вариантах реализации, где  $Y$  представляет собой:

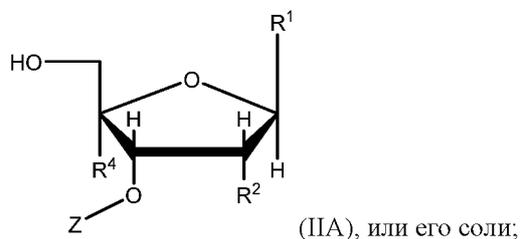


**[0200]** Семьдесят второй вариант реализации раскрывает способ, описанный в пятьдесят седьмом- семьдесят первом вариантах реализации, где фрагмент формулы (II) получают посредством:

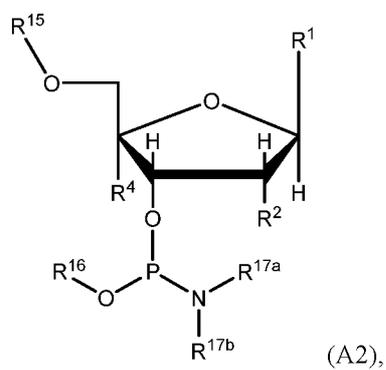
1') снятия защиты с соединения формулы (IIA')



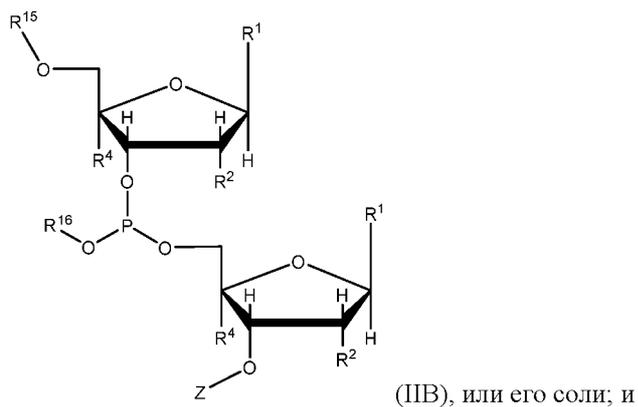
или его соли с образованием соединения формулы (IIA):



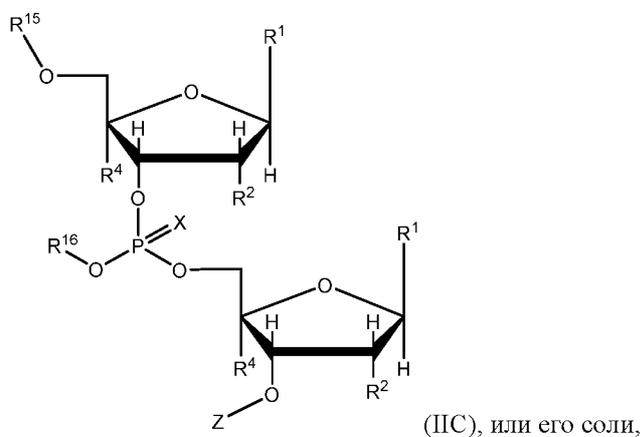
2') взаимодействия соединения формулы (IIA) или его соли с соединением формулы (A2):



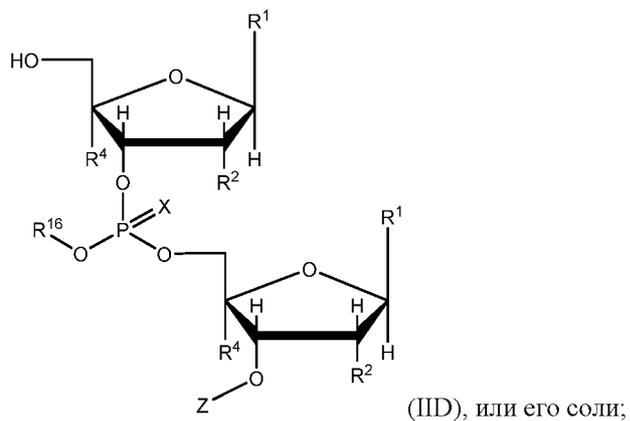
или его солью с образованием соединения формулы (IIВ):



3') сульфуризации или окисления с образованием соединения формулы (IIС), или его соли с помощью агента сульфуризации или окисления с образованием соединения формулы (IIС):

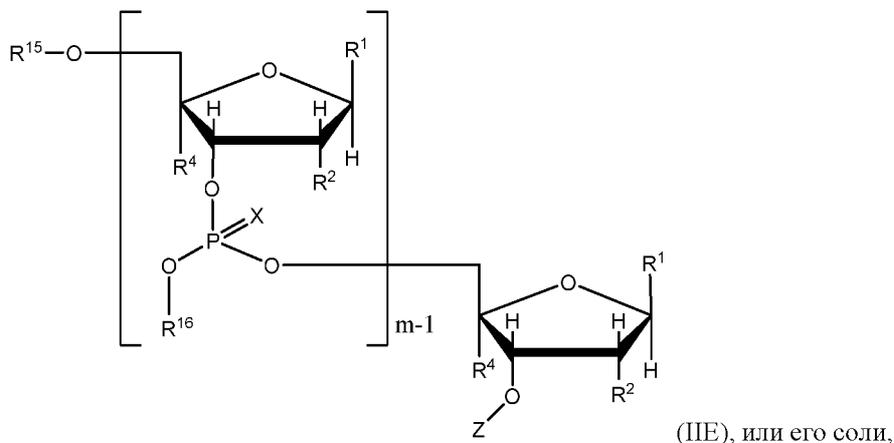


4') снятия защиты с соединения формулы (IIС) или его соли с образованием соединения формулы (IID):

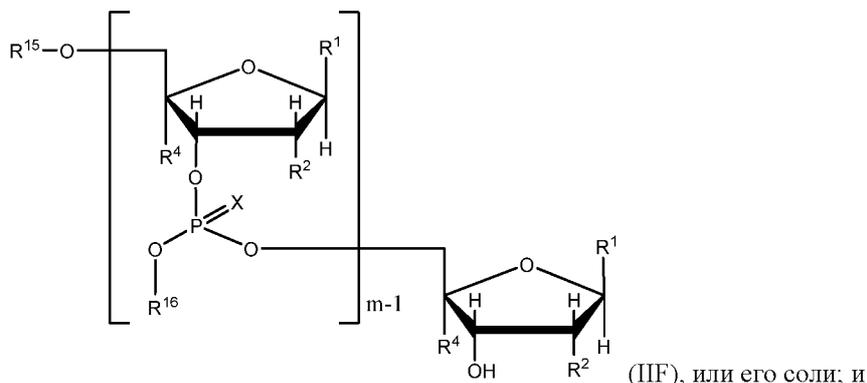


5') когда  $m$  равно 3, начиная с соединения формулы (IID) или его соли, повторяя стадию 2') и стадию 3') с образованием соединения формулы (IIE) или его соли, или

когда  $m$  больше 3, начиная с соединения формулы (IID) или его соли, повторяя стадии 2'), 3') и 4') в течение  $m-3$  раз, затем следует стадия 2') и стадия 3') с образованием соединения формулы (IIE):



6') снятия защиты с соединения формулы (IIE) или его соли с образованием соединения формулы (IIF):



7') взаимодействия соединения формулы (IIF) или его соли с фосфордиамидитом  $(R^{16}O)P(NR^{17a}R^{17b})_2$  с получением фрагмента формулы (II) или его соли, где  $Z$  представляет собой защитную группу гидроксила.

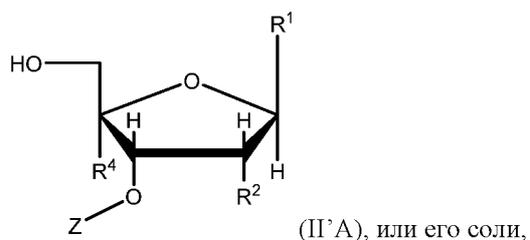
**[0201]** Семьдесят третий вариант реализации раскрывает способ, описанный в семьдесят втором варианте реализации, где фрагмент формулы (II) не очищается хроматографией перед взаимодействием с фрагментом формулы (I).

**[0202]** Семьдесят четвертый вариант реализации раскрывает способ, описанный в семьдесят втором или семьдесят третьем варианте реализации, где продукт реакции любой из стадий 1'), 2'), 3'), 4'), 5'), 6') и 7') очищают экстракцией и/или селективным осаждением (*например*, как описано в двадцать первом, тридцать пятом, сорок втором, сорок шестом или сорок седьмом варианте реализации).

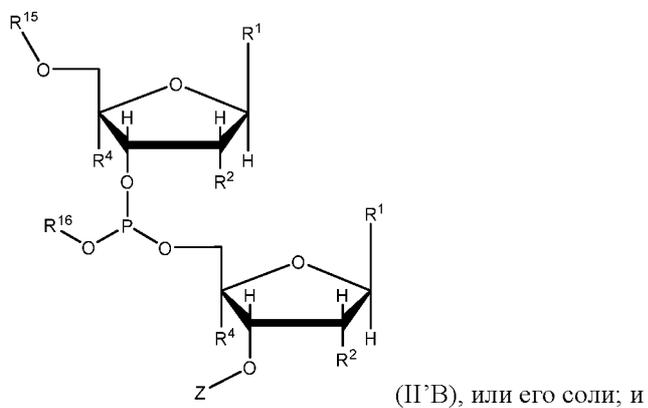
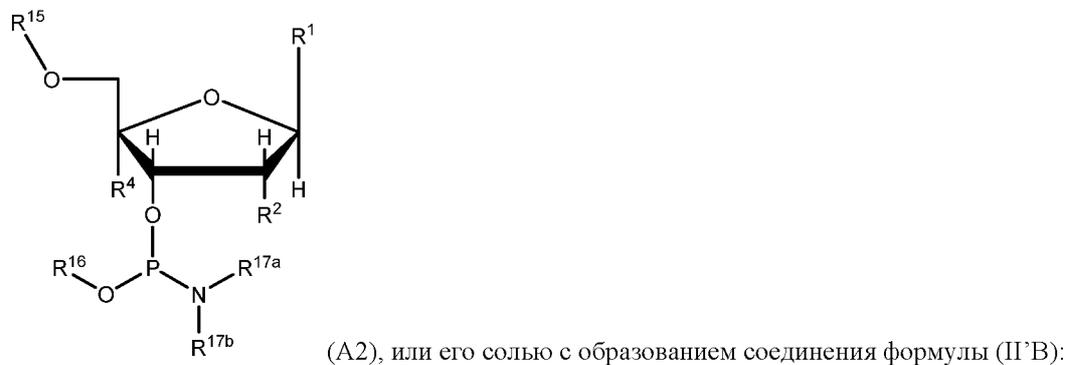
**[0203]** Семьдесят пятый вариант реализации раскрывает способ, описанный в вариантах реализации с пятьдесят девятого по семьдесят четвертый, где фрагмент формулы (II') получают посредством:

1' ') снятия защиты с соединения формулы (II'A'):

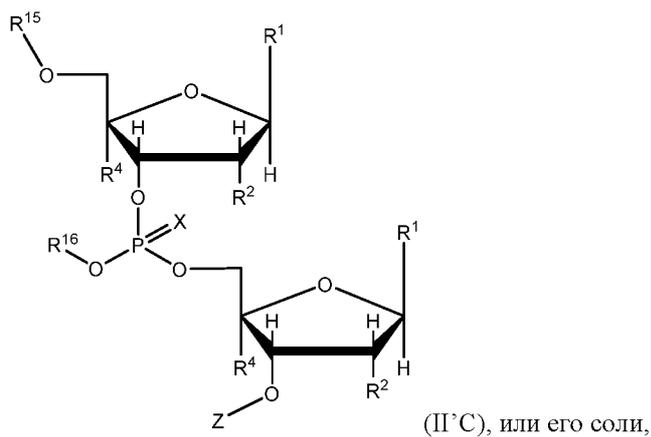




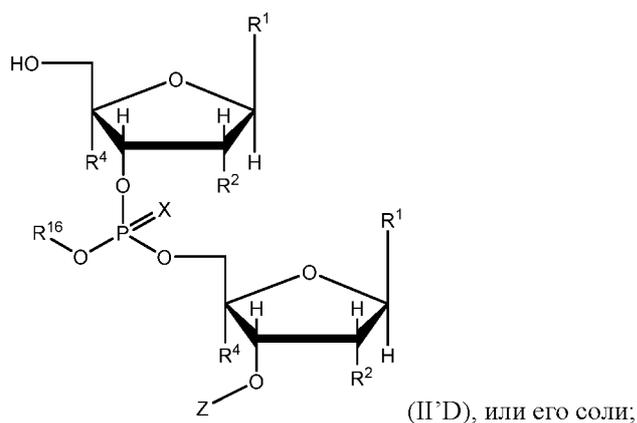
2<sup>''</sup>) взаимодействия соединения формулы (II'A) или его соли с соединением формулы (A2):



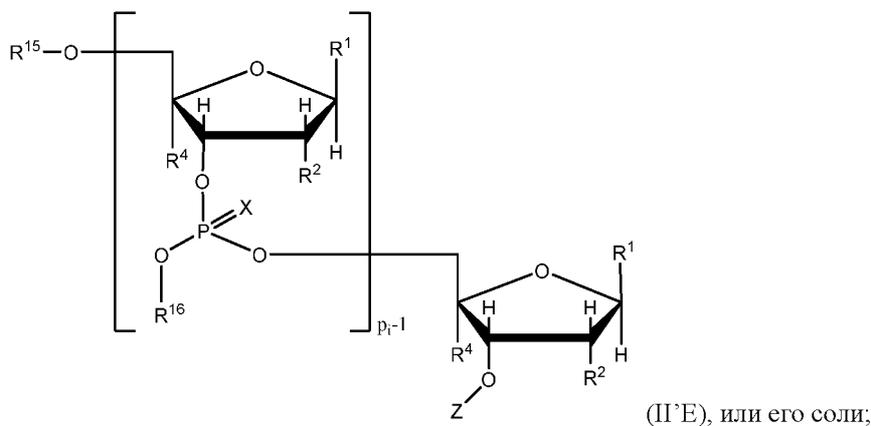
3<sup>''</sup>) сульфуризации или окисления соединения формулы (II'V) или его соли с помощью агента сульфуризации или окисления с образованием соединения формулы (II'C):



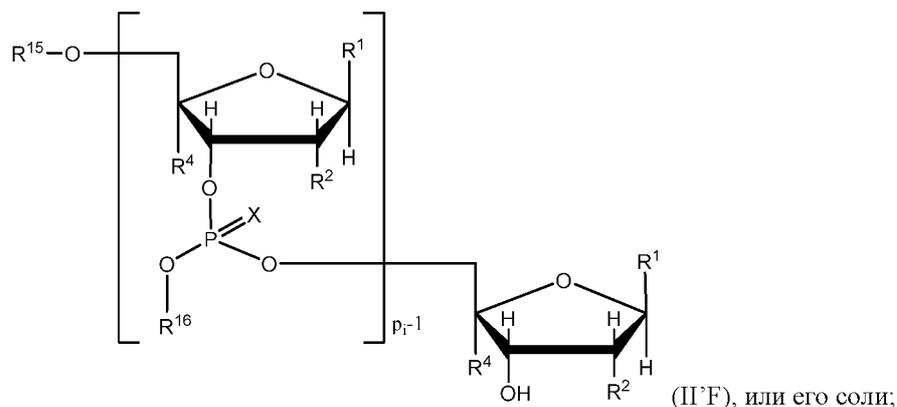
4<sup>''</sup>) снятия защиты с соединения формулы (II'C) или его соли с образованием соединения формулы (II'D):



5'') начиная с соединения формулы (II'D) или его соли, повторяя стадии 1'), 2') и 3') для  $p_i-2$  раз, с последующими стадией 1') и стадией 2') до соединения формулы (II'E):



6'') снятия защиты с соединения формулы (II'E) или его соли с образованием соединения формулы (II'F):



7'') взаимодействия соединения формулы (II'F) или его соли с фосфордиамидитом  $(R^{16}O)P(NR^{17a}R^{17b})_2$  с получением фрагмента формулы (II') или его соли, где Z представляет собой защитную группу гидроксила.

**[0204]** Семьдесят шестой вариант реализации раскрывает способ, описанный в семьдесят пятом варианте реализации, где фрагмент формулы (II') не очищается хроматографией (колоночной хроматографией) перед взаимодействием с олигонуклеотидом формулы (V).

**[0205]** Семьдесят седьмой вариант реализации раскрывает способ, описанный в семьдесят пятом или семьдесят шестом варианте реализации, где продукт реакции любой из стадий 1''), 2''), 3''), 4''), 5''), 6'') и 7'') очищают экстракцией и/или селективным осаждением, как описано в данном документе (*например*, как

описано в двадцать первом, тридцать пятом, сорок втором, сорок шестом или сорок седьмом варианте реализации).

[0206] Семьдесят восьмой вариант реализации раскрывает способ любого из вариантов реализации с пятьдесят седьмого по семьдесят седьмой, где  $n$  равно 3, 4, 5 или 6.

[0207] Семьдесят девятый вариант реализации раскрывает способ любого из вариантов реализации с пятьдесят седьмого по семьдесят восьмой, где  $m$  равно 3, 4, 5 или 6.

[0208] Восьмидесятый вариант реализации раскрывает способ любого из вариантов реализации с пятьдесят девятого по семьдесят девятый, где  $p_i$  для каждого случая независимо равно 3, 4, 5 или 6.

[0209] Восемьдесят первый вариант реализации раскрывает способ любого из вариантов реализации от шестидесятого до семьдесят девятого, где каждый из  $p_1$  и  $p_2$  независимо равны 3, 4, 5 или 6.

[0210] Восемьдесят второй вариант реализации раскрывает способ любого из вариантов реализации от шестидесятого до восемьдесят первого, где  $r$  равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

[0211] В некоторых вариантах реализации реакции снятия защиты на стадиях с), f), 1), 4), 1'), 4'), 1'') или 4'') реакции детритилирования проводят, как описано в первом аспекте или любых вариантах реализации, описанных в нем (*например*, варианты реализации со второго по двенадцатый).

[0212] В некоторых вариантах реализации реакции сочетания на стадиях a), d), 2), 2') и 2'') могут быть выполнены путем добавления активатора к органическому раствору, содержащему 3'-ОН-защищенный нуклеотидный фрагмент и 5'-ОН защищенный фосфамидитный или фосфонатный фрагмент.

[0213] В некоторых вариантах реализации реакции сульфуризации на стадиях b), e), 3), 3') и 3'') могут быть проведены с использованием сульфуризирующих агентов (*например*, 3-амино-1,2,4-дитиазол-5-тиона (XH или ADTT), 3-(N,N-диметиламинометилиден)амино-3Н-1,2,4-дитиазол (DDTT), фенилацетилдисульфид (PADS), 3Н-1,2-бензодитиол-3-он 1,1-диоксид (реагент Бокажа) или фенил-3Н-1,2,4-дитиазол-3-он (POS). В конкретном варианте реализации сульфуризирующим агентом является DDTT. В определенных вариантах реализации основание представляет собой пиридин или имидазол.

[0214] В определенных вариантах реализации реакции окисления на стадиях b), e), 3), 3') и 3'') можно проводить с использованием стандартных окислителей, известных в литературе. Примеры окислителей включают, но не ограничиваются ими, трет-бутилгидропероксид (t-BuOOH), (1S)-(+)-(10-камфорсульфонил) оксазирин (CSO),  $I_2$  и раствор окислителя йод-пиридин в воде. В конкретном варианте реализации окислитель представляет собой трет-BuOOH.

[0215] В некоторых вариантах реализации реакция снятия защиты на стадии 6') или 6'') является такой, как описано во втором аспекте или любых вариантах реализации, описанных в нем (*например*, с двадцать третьего по тридцать первый вариантах реализации).

[0216] В некоторых вариантах реализации реакция фосфитилирования на стадии 7') или 7'') является такой, как описано в третьем аспекте или любых вариантах реализации, описанных в нем (*например*, с тридцать пятого по тридцать восьмой вариантах реализации).

#### **ii) 5'-3' элонгация:**

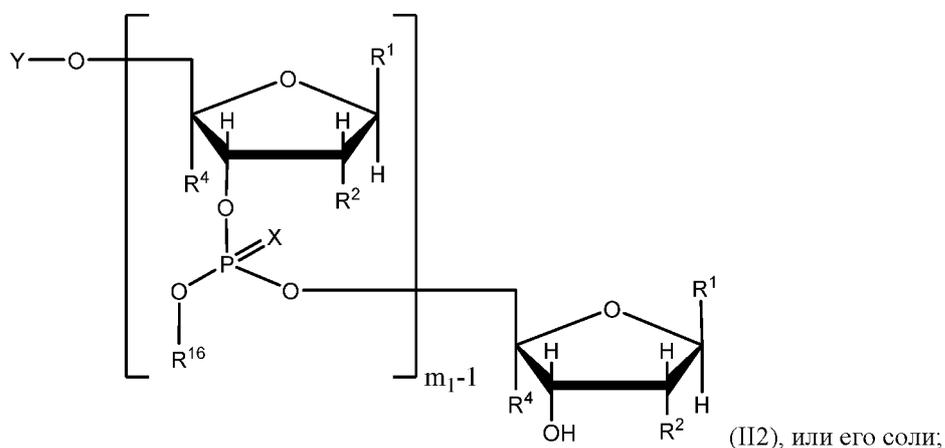
[0217] В седьмом аспекте данное раскрытие описывает жидкофазный конвергентный синтез целевых олигонуклеотидов, где целевой олигонуклеотид собирается в направлении от 5'-конца к 3'-концу (5'-3' направление). Было продемонстрировано, что конвергентный жидкофазный способ данного раскрытия в направлении 5'-3' успешно применяется для синтеза целевых олигонуклеотидов. Кроме того, защищенный

целевой олигонуклеотид высокой чистоты может быть получен способами данного раскрытия без хроматографической очистки.

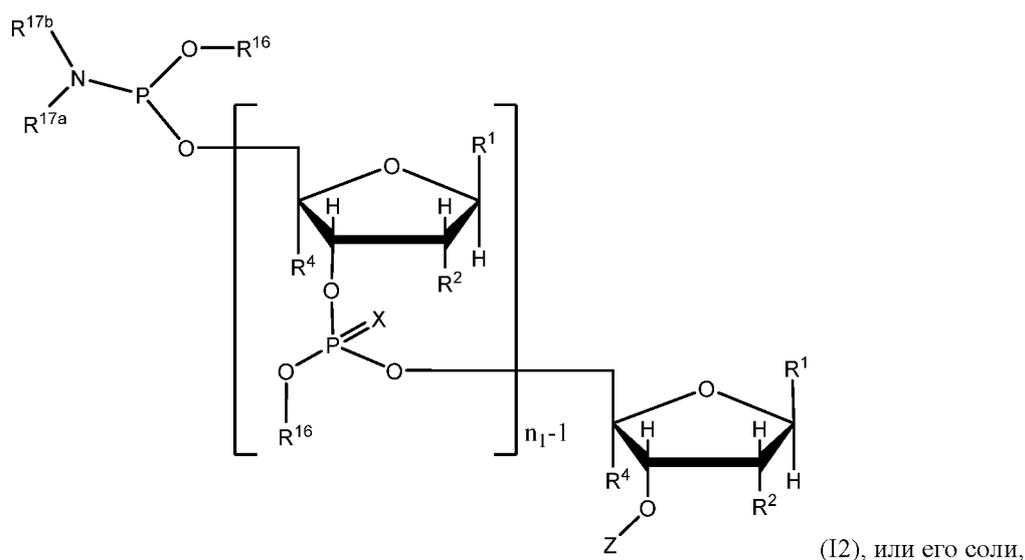
**[0218]** В определенных вариантах реализации описанный в данном документе конвергентный жидкофазный способ включает поэтапное добавление олигонуклеотидных фрагментов в жидкой (растворной) фазе для синтеза целевого олигонуклеотида. Например, 5-мерный фрагмент, имеющий 5'-гидрофобную гидроксильную защитную группу (5'-LHPG) (5'-концевой фрагмент), сначала соединяется с 5-мерным фрагментом с образованием 10-мерного фрагмента, содержащего 5'-LHPG группу, которая затем подвергается дальнейшему взаимодействию с другим 5-мерным фрагментом с образованием 15-мерного олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации 5'-концевой фрагмент, содержащий  $n$  нуклеотидов (например, 5-мерный фрагмент), синтезируется путем связывания одного нуклеотида, имеющего 5'-LHPG-группу, с фрагментом, содержащим  $n-1$  нуклеотидов (например, 4-мерным фрагментом).

**[0219]** Восемьдесят третий вариант осуществления раскрывает конвергентный жидкофазный способ для получения целевого олигонуклеотида, включающий стадии:

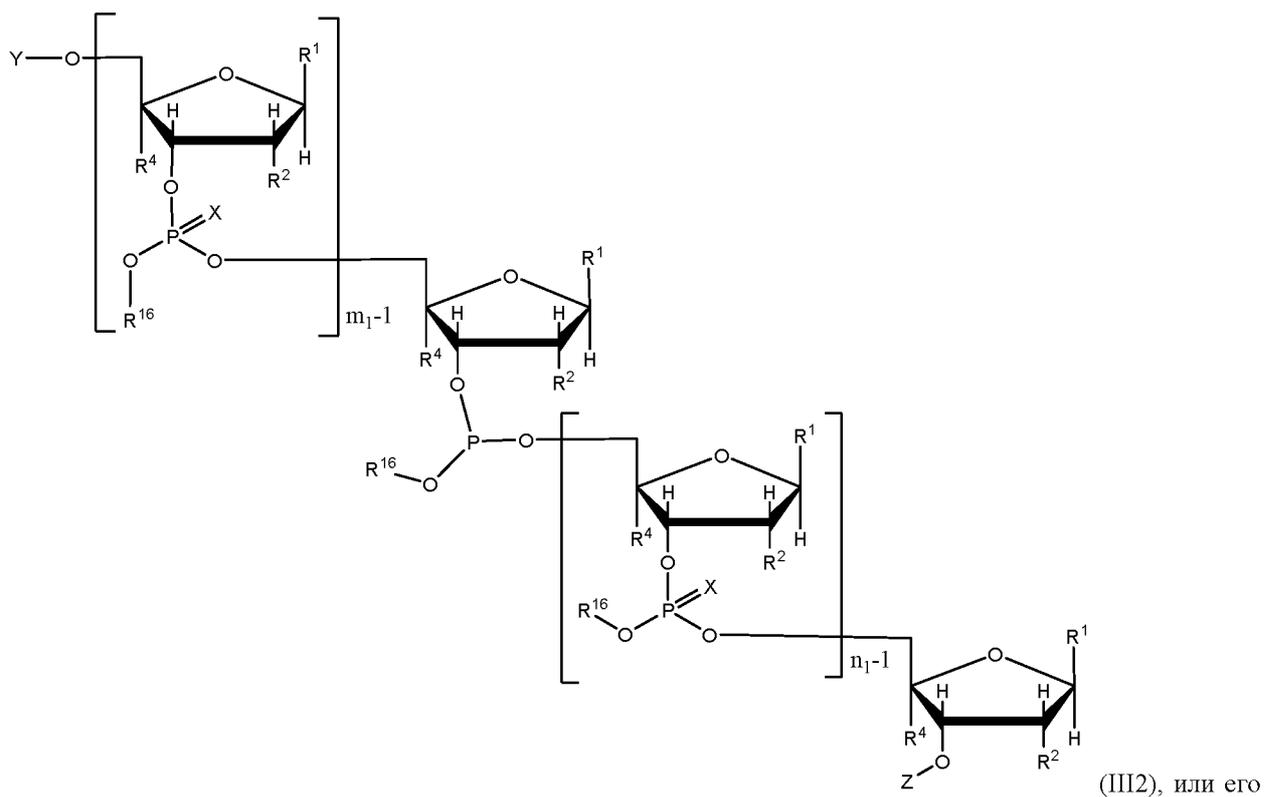
а) связывание олигонуклеотидного фрагмента формулы (II2):



с олигонуклеотидным фрагментом формулы (I2):

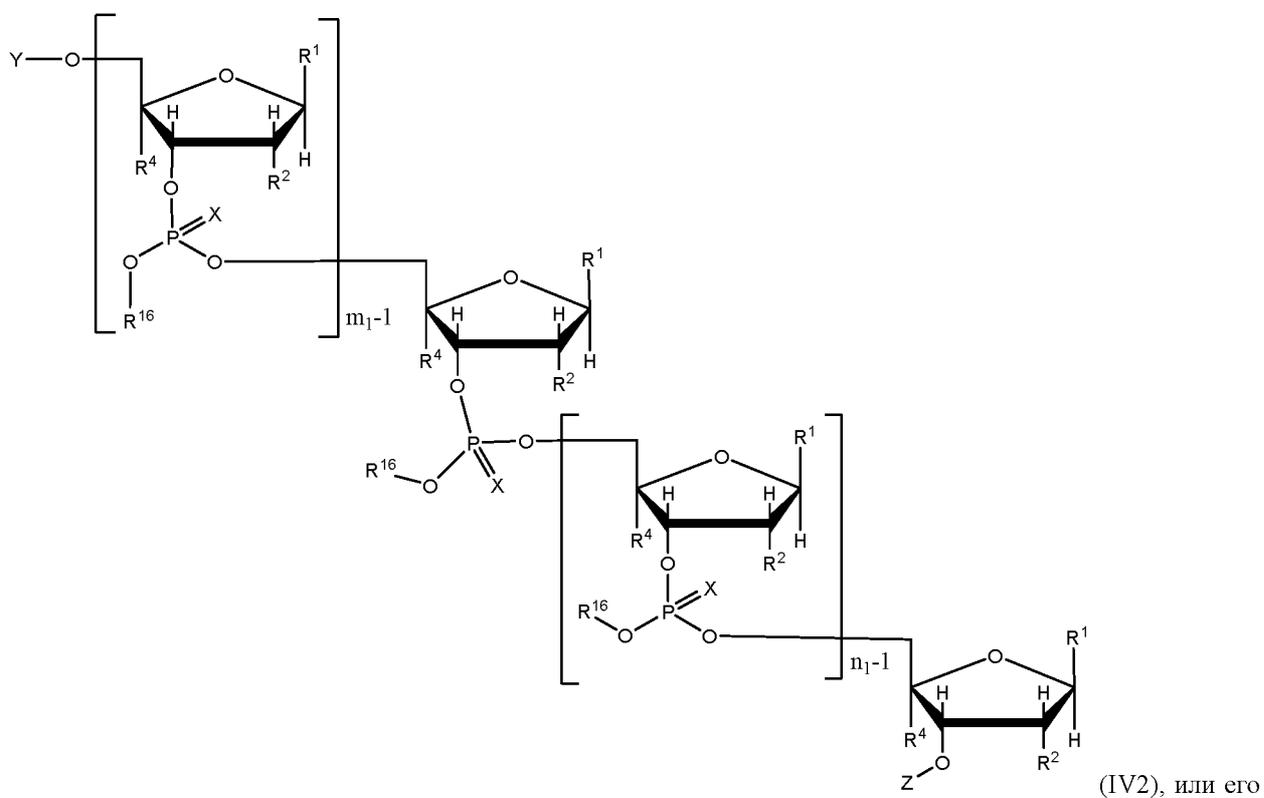


в растворе с образованием олигонуклеотида формулы (III2):



соли; и

b) сульфуризация или окисление олигонуклеотида формулы (III2) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (IV2):



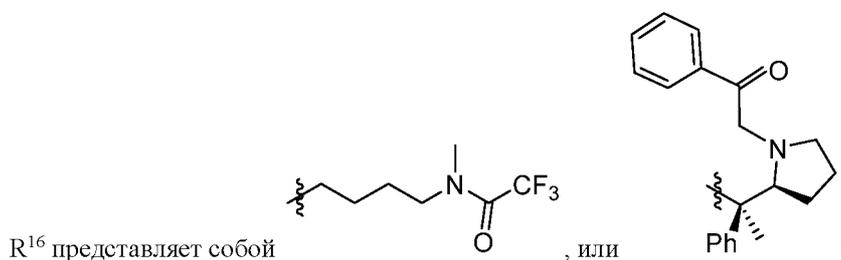
соли, где:

$R^1$  в каждом случае независимо представляет собой нуклеобазу, где  $NH_2$  нуклеобазы, если присутствует, защищено аминозащитной группой;

$R^2$ , в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и  $C_{1-6}$ алкокси, необязательно замещенного  $C_{1-6}$ алкокси;

$R^4$  в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой  $R^2$ ;

$R^{16}$  в каждом случае независимо представляет собой  $C_{1-6}$ алкильную группу,  $C_{2-6}$ алкенильную группу, фенильную или бензильную группу, каждая из которых необязательно замещена  $-CN$ ,  $-NO_2$  или галогеном; или



$R^{17a}$  и  $R^{17b}$  независимо представляют собой  $C_{1-6}$ алкил;

$n_1$  равно целому числу от 2 до 20;

$m_1$  равно целому числу от 2 до 200;

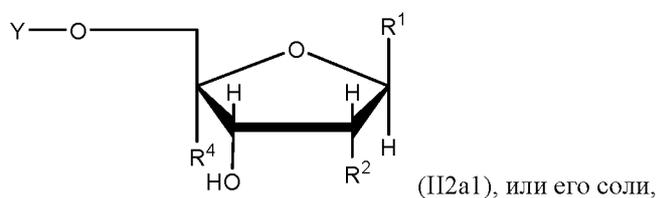
X в каждом случае независимо представляет собой O или S;

Y представляет собой гидрофобную защитную группу гидроксила, содержащую алкильную цепь;

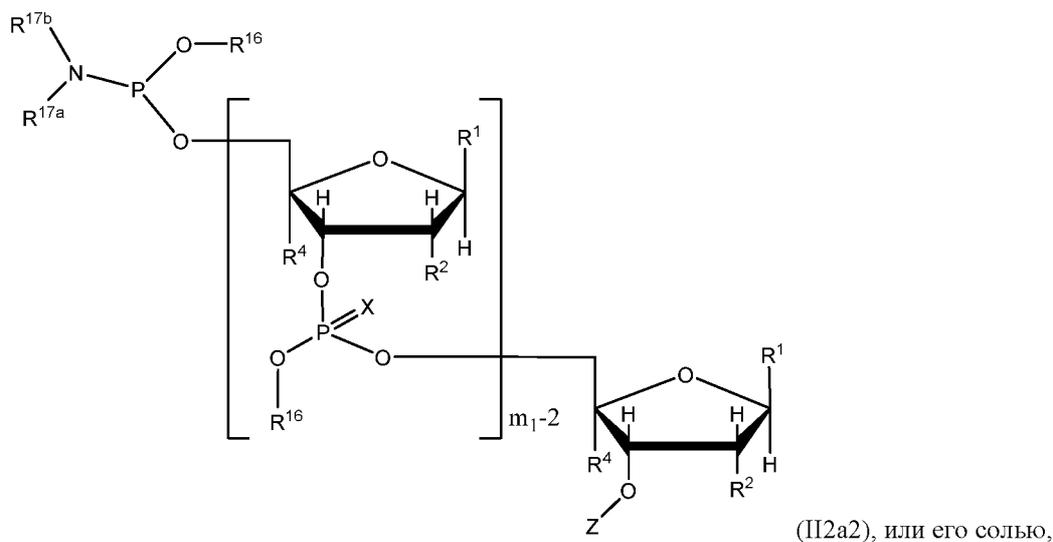
Z представляет собой силильную защитную группу гидроксила.

**[0220]** Восемьдесят четвертый вариант реализации раскрывает способ, описанный в восемьдесят третьем варианте реализации, где фрагмент (II2) получают путем:

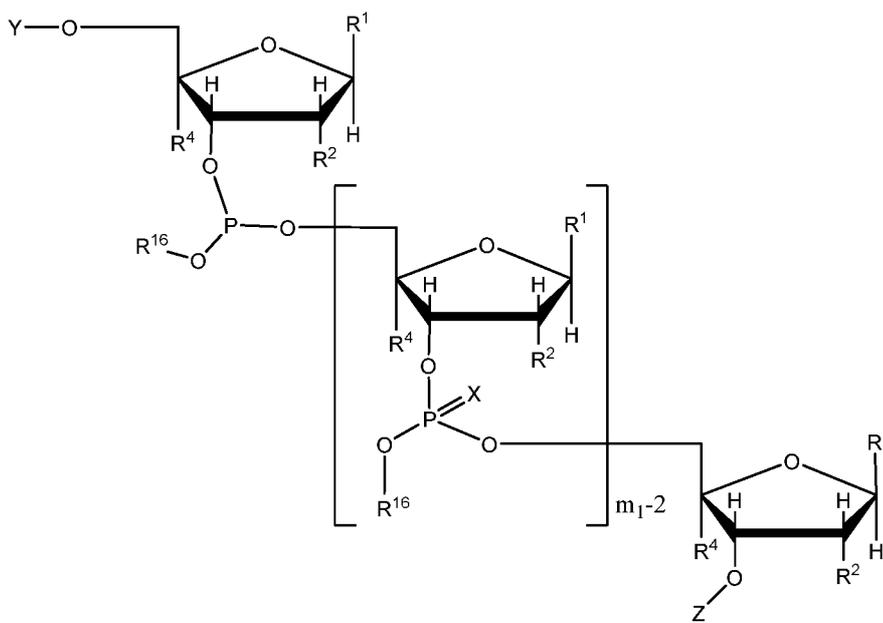
ia) сочетания нуклеотида формулы (II2a1):



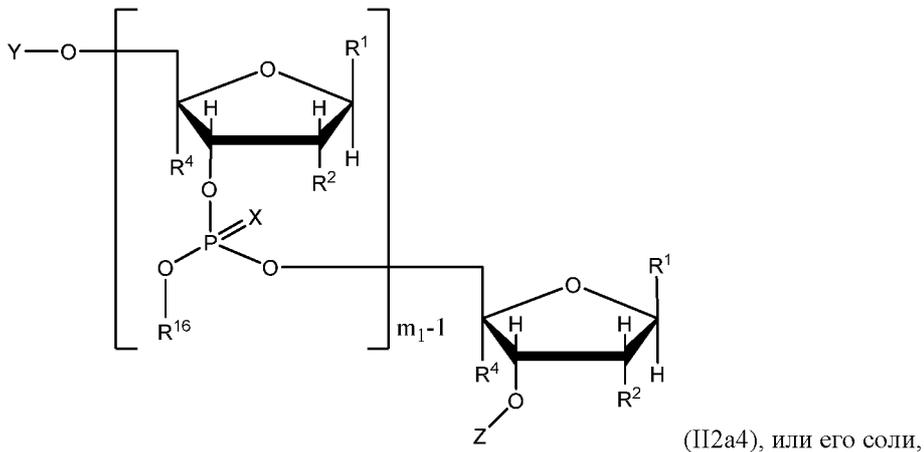
с олигонуклеотидным фрагментом формулы (II2a2):



в растворе с образованием олигонуклеотида формулы (II2a3):

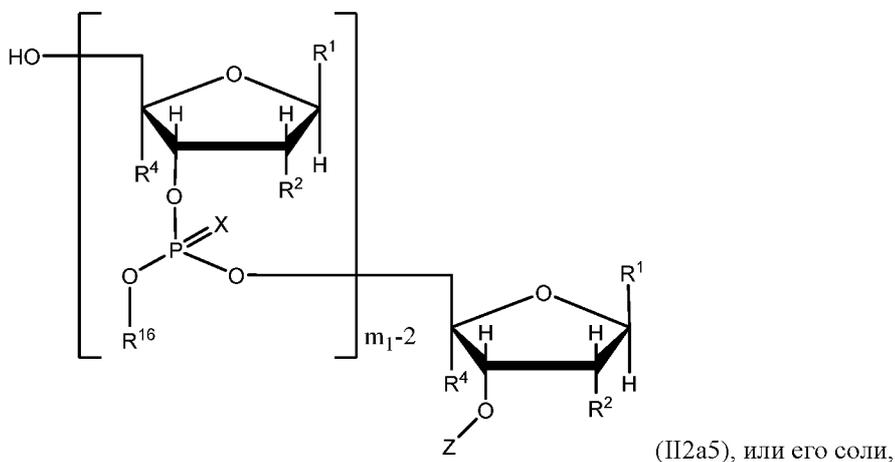


ii) а) сульфурзации или окисления олигонуклеотида формулы (II2a3) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (II2a4):



ii) б) снятия защиты с олигонуклеотида формулы (II2a4) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (II2) или его соли.

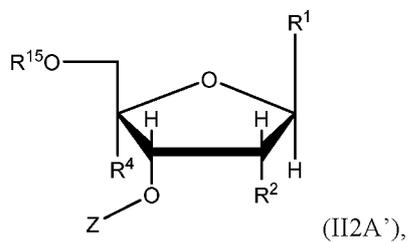
**[0221]** Восемьдесят пятый вариант реализации раскрывает способ, описанный в восемьдесят четвертом варианте реализации, где фрагмент (II2a2) получают в результате реакции олигонуклеотида формулы (II2a5):



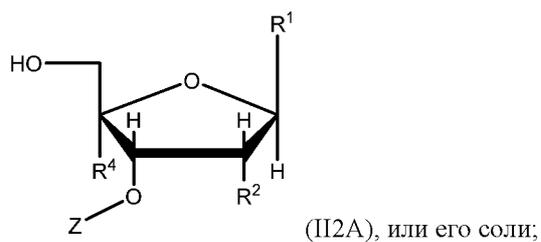
с фосфордиамидитом  $(R^{16}O)P(NR^{17a}R^{17b})_2$  с образованием фрагмента формулы (II2a2).

[0222] Восемьдесят шестой вариант реализации раскрывает способ, описанный в восемьдесят пятом варианте реализации, где олигонуклеотид формулы (II2a3) получают посредством:

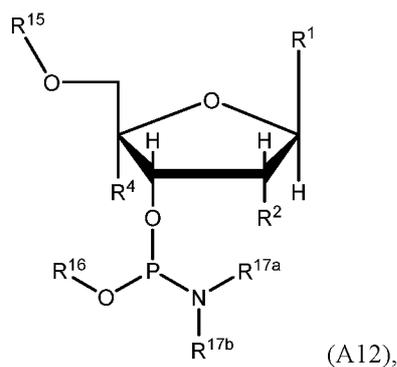
iA) снятия защиты с соединения формулы (II2A<sup>3</sup>):



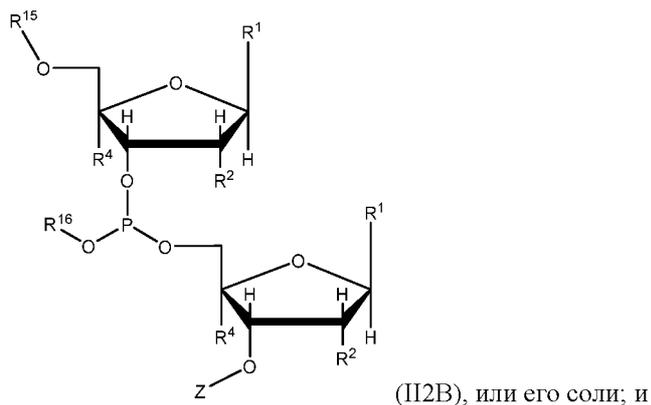
или его соли с образованием соединения формулы (II2A):



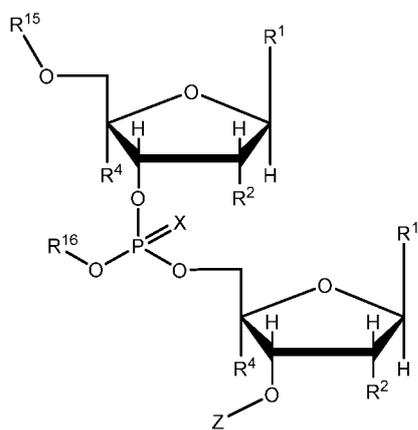
iiA) взаимодействия соединения формулы (II2A) или его соли с соединением формулы (A12):



или его соли с образованием соединения формулы (II2B):

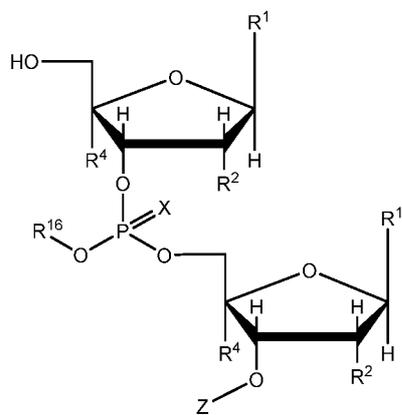


iiiA) сульфуризации или окисления соединения формулы (II2B) или его соли с помощью агента сульфуризации или окисления с образованием соединения формулы (II2C):



(II2C), или его соли,

ivA) снятия защиты с соединения формулы (II2C) или его соли с образованием соединения формулы (IID):

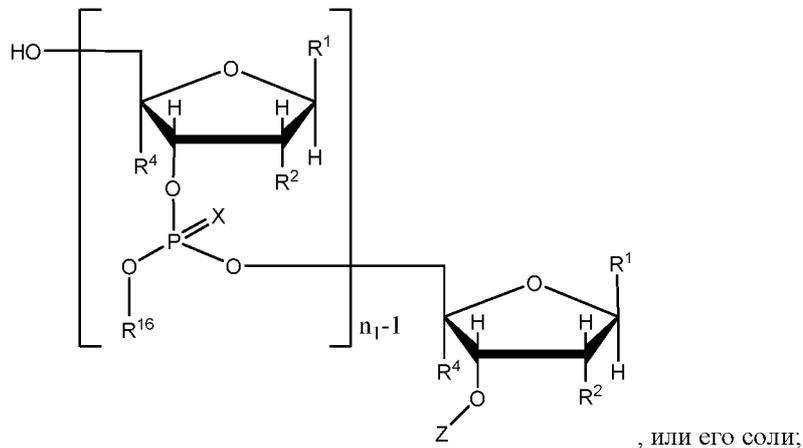


(II2D), или его соли;

vA) когда  $m_1$  больше 3, начиная с соединения формулы (IID), повторяя стадии ii), iii) и iv)  $m_1-3$  раза с образованием соединения формулы (II2a3) или его соли.

**[0223]** В определенных вариантах реализации способа, раскрытых в любом из вариантов реализации с восьмидесятым четвертым по восьмидесятым шестой,  $m_1$  равно целому числу от 3 до 20. В конкретном варианте реализации  $m_1$  равно от 3 до 6. В другом конкретном варианте реализации  $m_1$  равно 4. В еще одном конкретном варианте реализации  $m_1$  равно 5.

**[0224]** Восьмидесятым седьмым вариантом реализации раскрывает способ, описанный в седьмом аспекте или любом из вариантов реализации с восьмидесятым третьим по восьмидесятым шестой, где фрагмент (I2) получают в результате реакции олигонуклеотида формулы (I2a1):

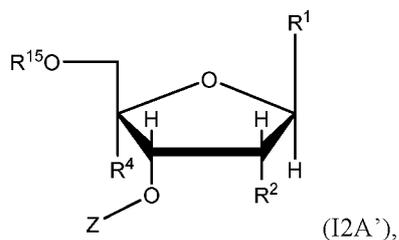


, или его соли;

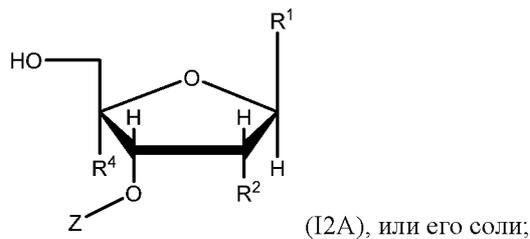
с фосфордиамидитом  $(R^{16}O)P(NR^{17a}R^{17b})_2$  с образованием фрагмента формулы (I2).

[0225] Восемьдесят восьмой вариант реализации раскрывает способ, описанный в восемьдесят седьмом варианте реализации, где олигонуклеотид формулы (I2a1) получают посредством:

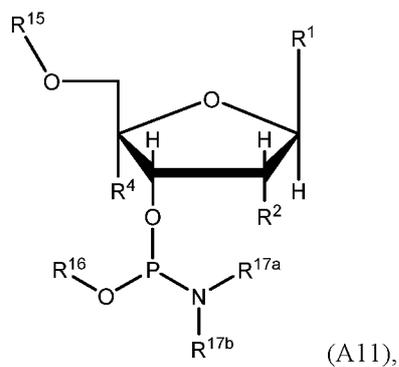
i') снятия защиты с соединения формулы (I2A')



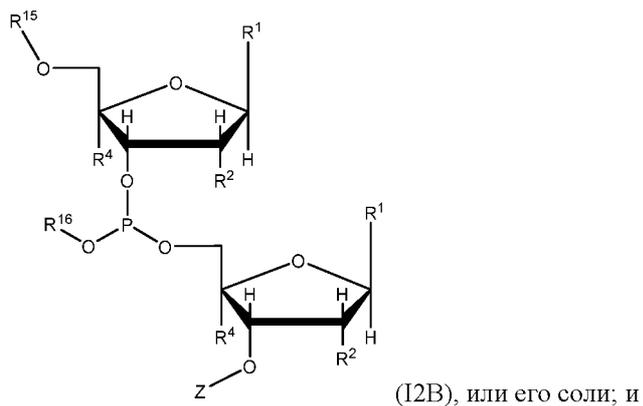
или его соли с образованием соединения формулы (I2A):



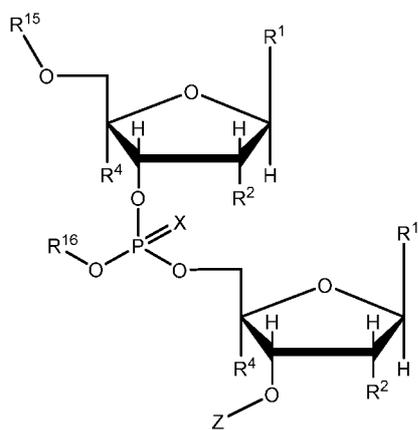
ii') взаимодействия соединения формулы (I2A) или его соли с соединением формулы (A11):



или его соли с образованием соединения формулы (I2B):

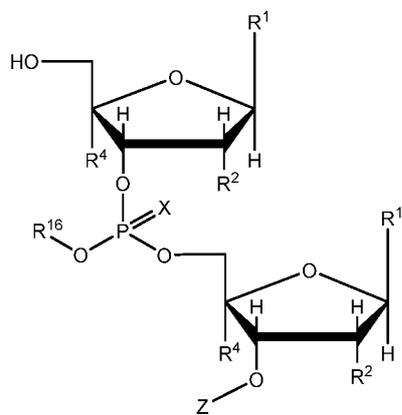


iii') сульфуризации или окисления соединения формулы (I2B) или его соли с помощью агента сульфуризации или окисления с образованием соединения формулы (I2C):



(I2C), или его соли,

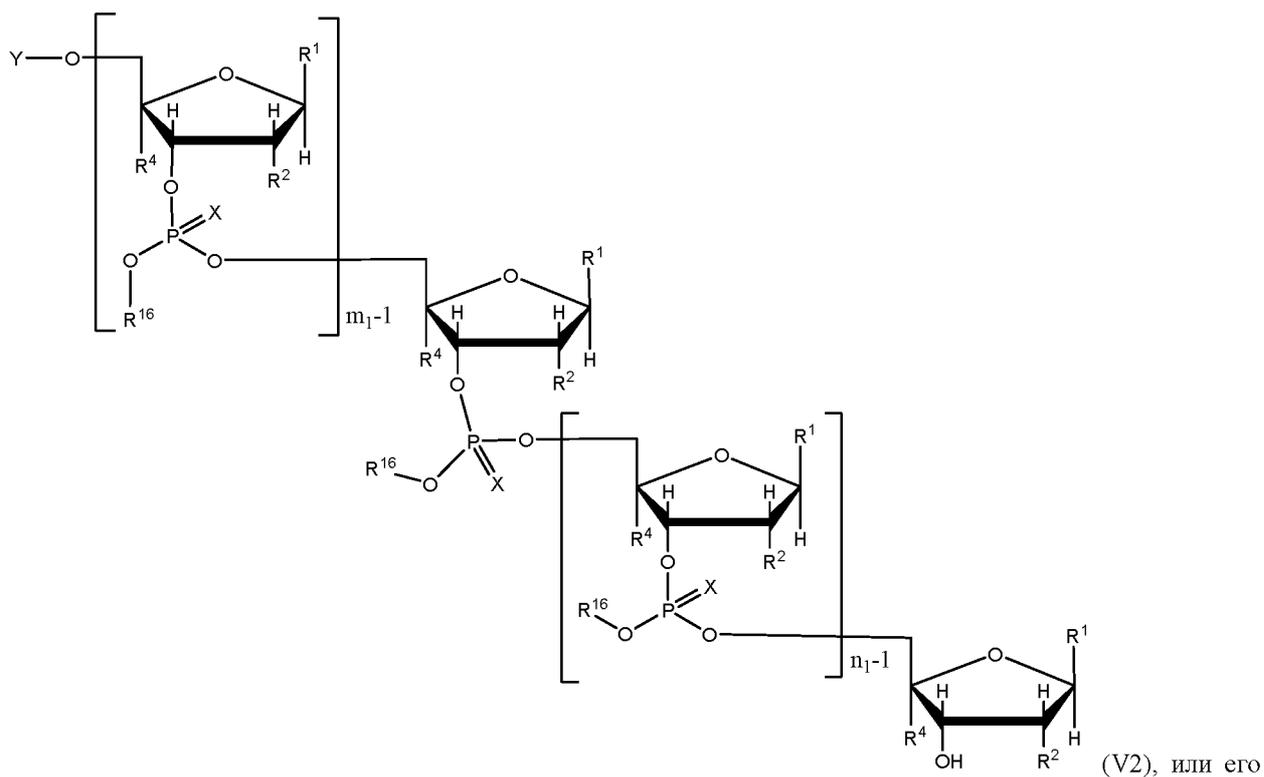
iv') снятия защиты с соединения формулы (I2C) или его соли с образованием соединения формулы (I2D):



(I2D), или его соли;

v') когда  $n_1$  больше 2, начиная с соединения формулы (I2D), повторяя стадии ii'), iii') и iv')  $n_1-2$  раз с образованием соединения формулы (I2a1) или его соли.

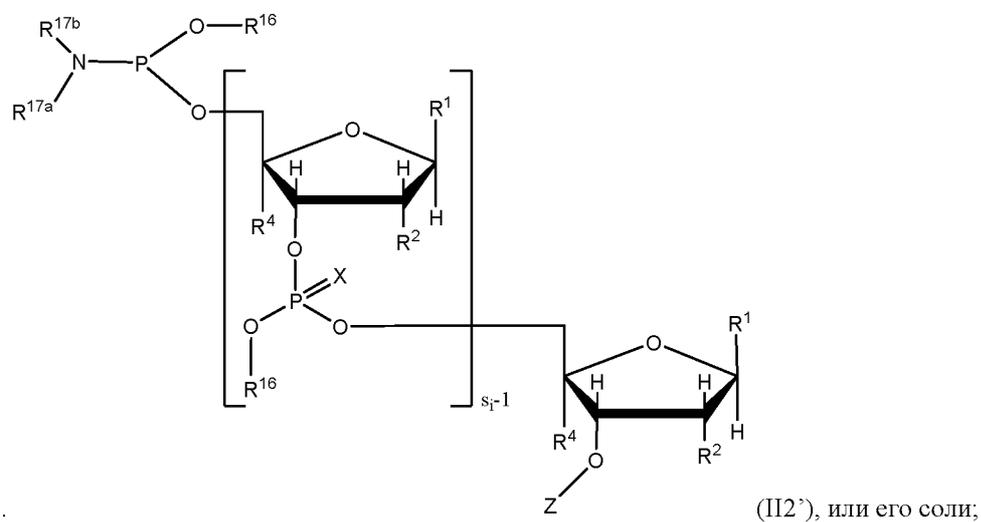
**[0226]** Восемьдесят девятый вариант реализации раскрывает способ, описанный в вариантах реализации с восемьдесят третьего по восемьдесят восьмой, дополнительно включающий, дополнительно содержащий стадию с) снятия защиты с олигонуклеотида формулы (IV2) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (V2):



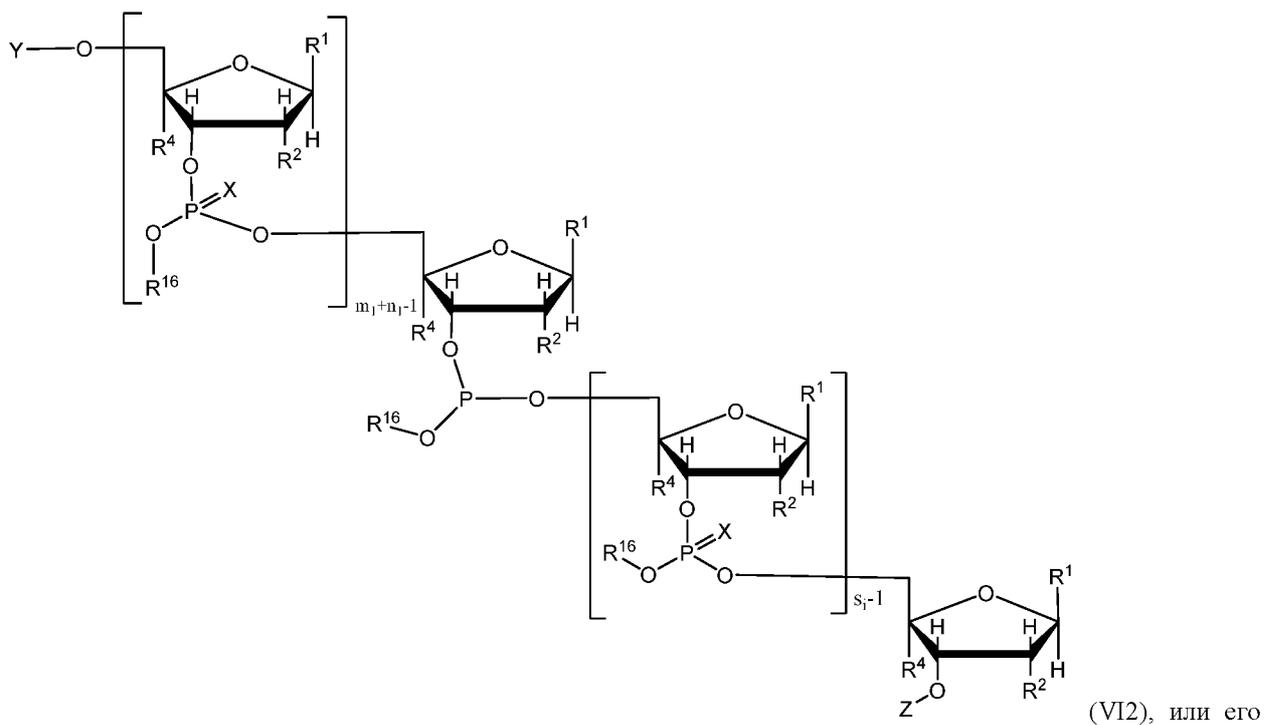
соли;

**[0227]** Девяностый вариант реализации раскрывает способ, описанный в восемьдесят девятом варианте реализации, дополнительно включающий:

d) сочетание олигонуклеотида формулы (V2) или его соли с олигонуклеотидным фрагментом формулы (II2<sup>'</sup>):

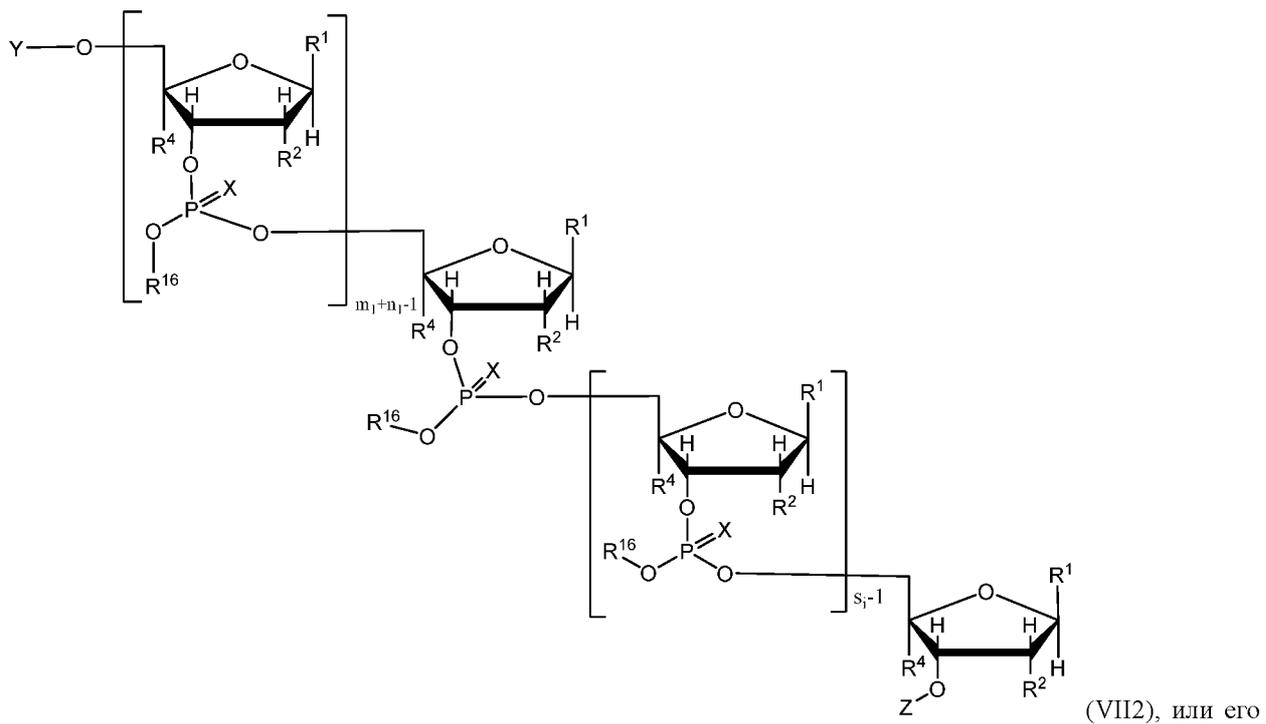


с образованием олигонуклеотида формулы (VI2):



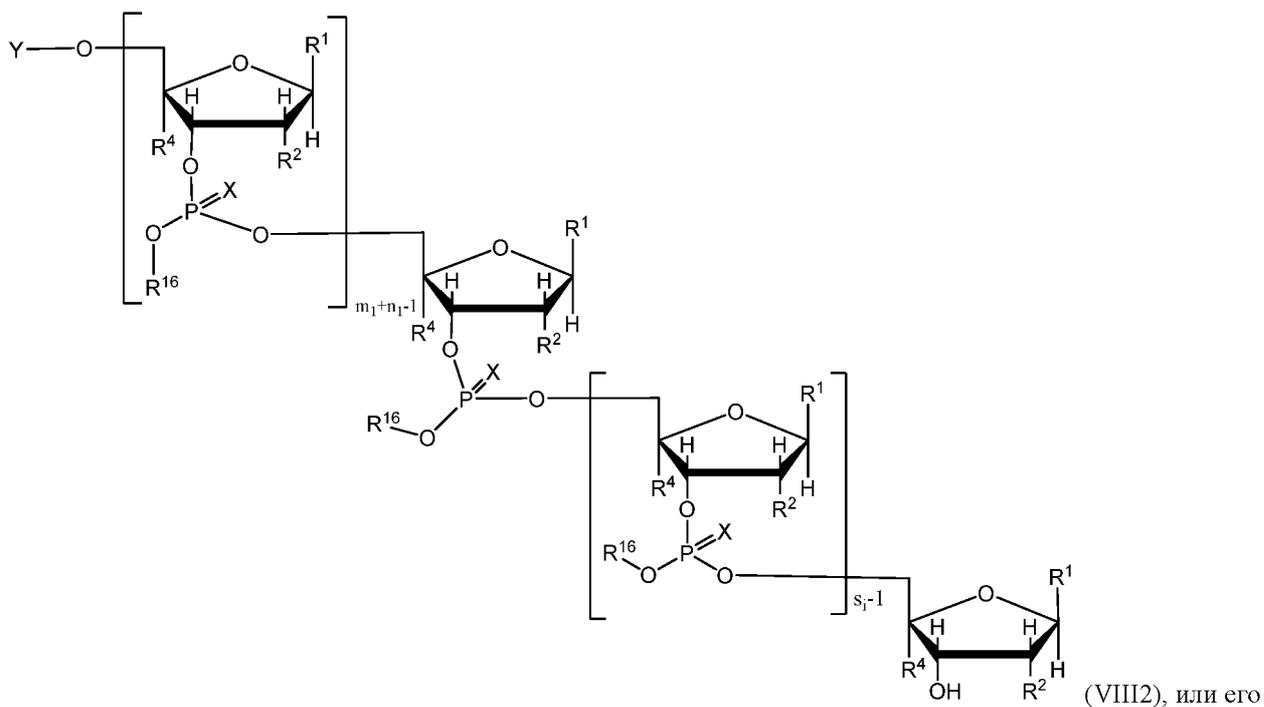
соли,

е) сульфуризацию или окисление олигонуклеотида формулы (VI2) с образованием олигонуклеотида формулы (VII2):



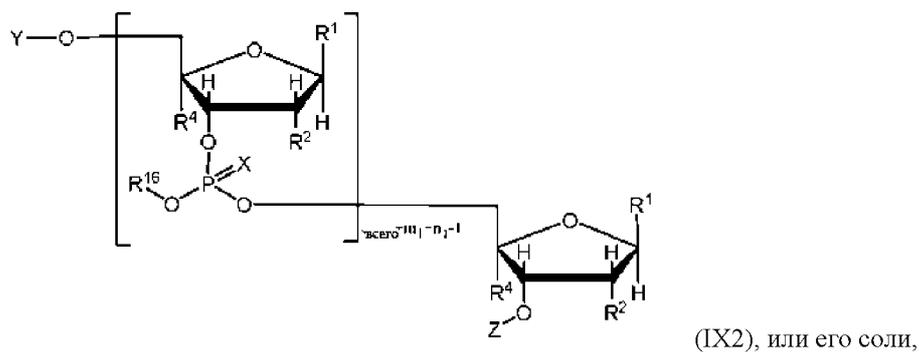
соли,

ф) снятие защиты с олигонуклеотида формулы (VII2) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (VIII2):



соли;

g) повторение стадий d), e) и f) в течение  $r_1-1$  раз с последующим повторением стадий d) и e) с образованием олигонуклеотида формулы (IX2):



где:

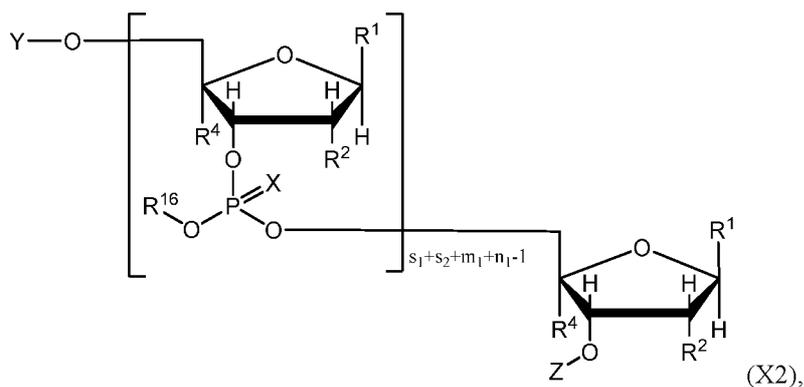
$r_1$  равно целому числу от 1 до 50;

$s_i$  для каждого случая независимо равно целому числу от 2 до 20,

$i$  равно целому числу от 1 до  $r_1$ ; и

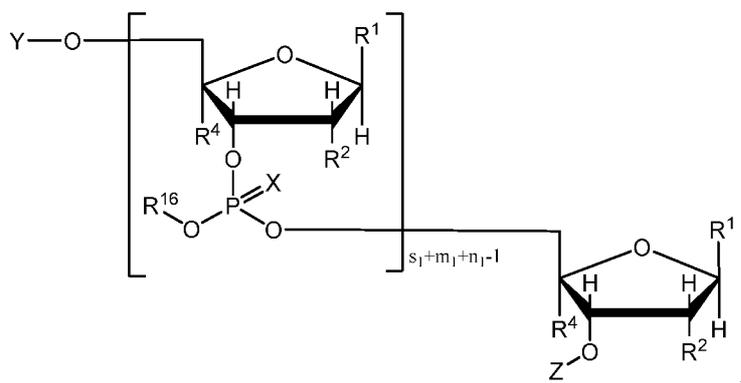
$$S_{\text{всего}} = \sum_{i=1}^{r_1} s_i$$

**[0228]** Девяносто первый вариант реализации раскрывает способ, описанный в девяностом варианте реализации, где  $r_1$  равно 2 и олигонуклеотид формулы (IX2) представлен формулой (X2):



или его солью, где  $s_1$  и  $s_2$ , каждое независимо, равно целому числу от 2 до 20,

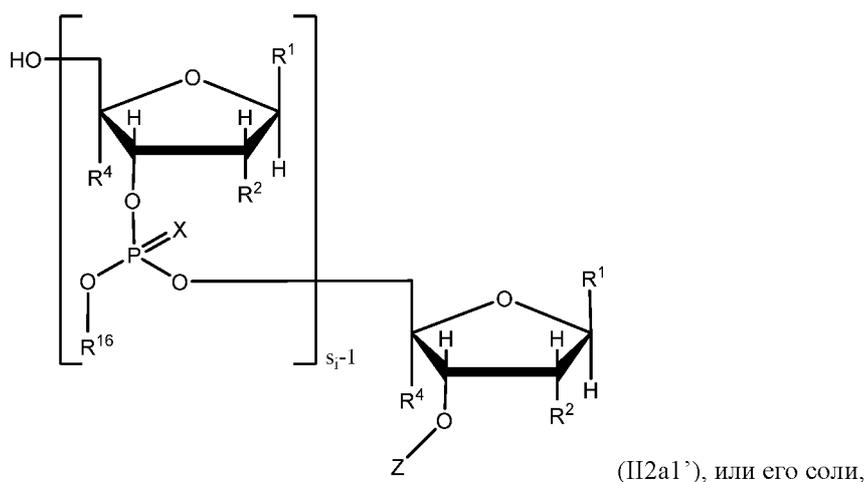
**[0229]** Девяносто второй вариант реализации раскрывает способ, описанный в девяностом варианте реализации, где  $n_1$  равно 1, а олигонуклеотид формулы (IX2) представлен формулой (X2'):



или его соль, где  $s_1$  равно целому числу от 2 до 20.

**[0230]** В определенных вариантах реализации для способа девяносто первого или девяносто второго варианта реализации  $s_1$ ,  $s_2$ ,  $m_1$  и  $n_1$ , каждое независимо, равно целым числам от 3 до 10, от 3 до 6 или от 4 до 6. В определенных вариантах реализации  $s_1$ ,  $s_2$ ,  $m_1$  и  $n_1$  независимо равны 4 или 5.

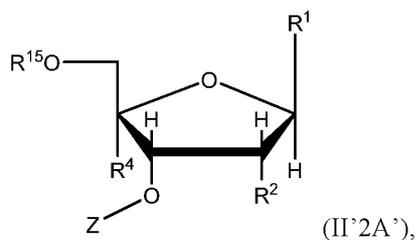
**[0231]** Девяносто третий вариант реализации раскрывает способ, описанный в девяностом, девяносто первом или девяносто втором варианте реализации, где олигонуклеотидный фрагмент формулы (II2') получают путем реакции олигонуклеотида формулы (II2a1'):



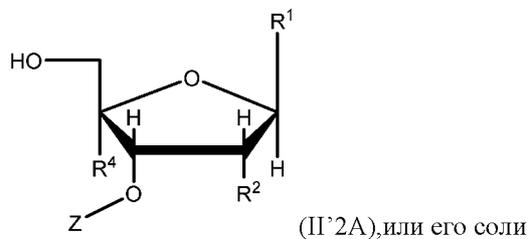
с фосфордиамидитом  $(R^{16}O)P(NR^{17a}R^{17b})_2$  с образованием фрагмента формулы (II2') или его соли.

**[0232]** Девяносто четвертый вариант реализации раскрывает способ, описанный в девяносто третьем варианте реализации, где олигонуклеотид формулы (II2a1') получают посредством:

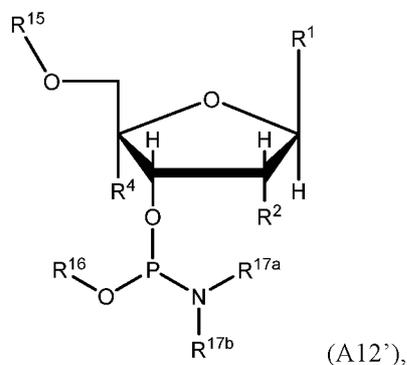
i<sup>ii</sup>) снятия защиты с соединения формулы (II'2A')



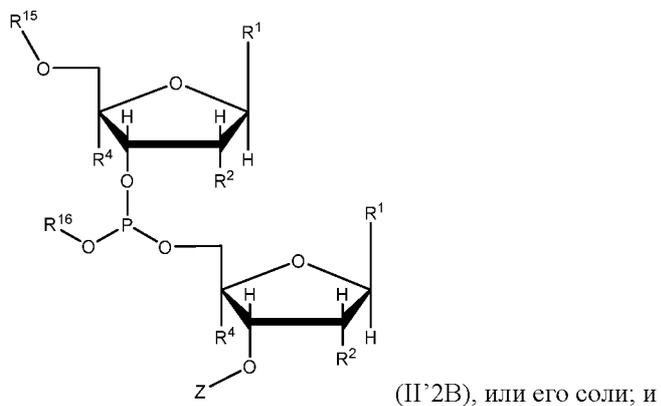
или его соли с образованием соединения формулы (II'2A):



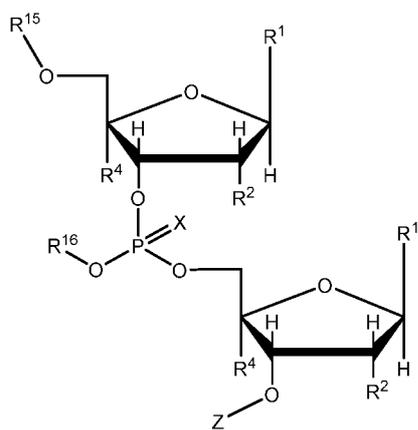
ii<sup>ii</sup>) взаимодействия соединения формулы (II'2A) или его соли с соединением формулы (A12')



или его солью с образованием соединения формулы (II'2B):

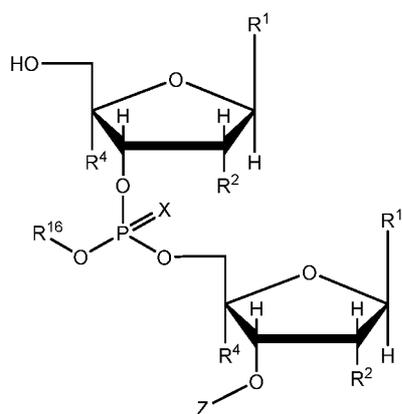


iii<sup>ii</sup>) сульфуризации или окисления соединения формулы (II'2B) или его соли с помощью агента сульфуризации или окисления с образованием соединения формулы (II'2C):



(II'2C), или его соли,

iv'') снятия защиты с соединения формулы (II'2C) или его соли с образованием соединения формулы (II'2D):



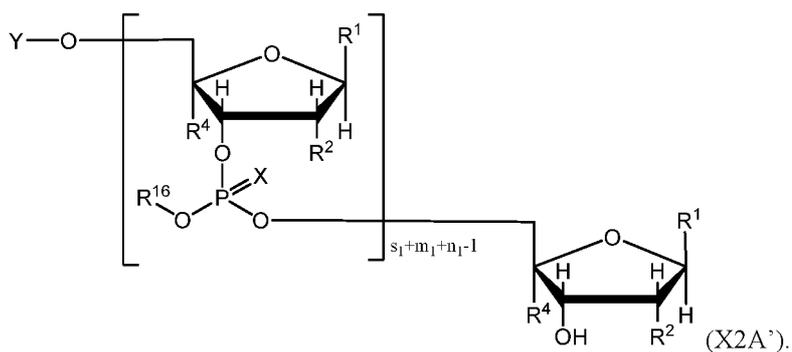
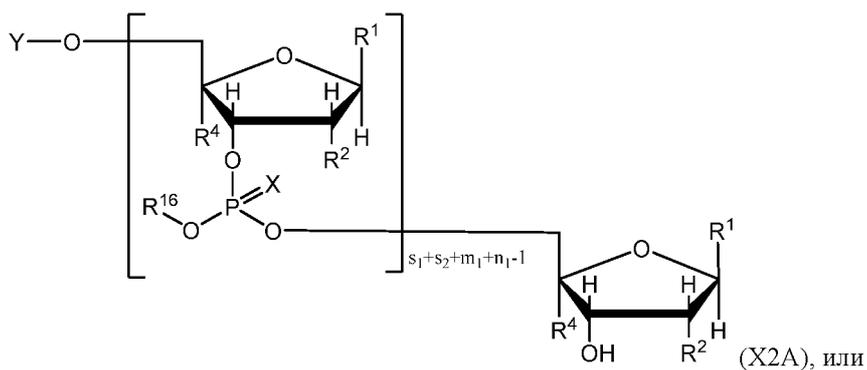
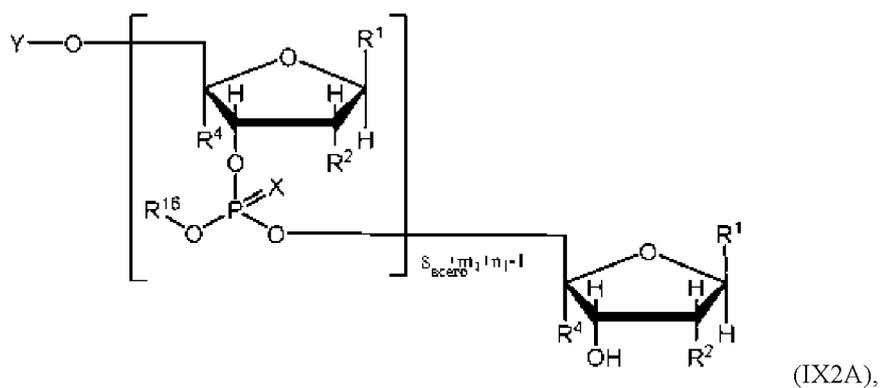
(II'2D), или его соли;

v''), когда  $s_i$  больше 2, начиная с соединения (II'2D), повторяя стадии ii''), iii'') и iv'') для  $s_i-2$  раз до соединения формулы (II2a1') или его соли.

**[0233]** Девяносто пятый вариант реализации раскрывает способ, описанный в вариантах реализации с восемьдесят третьего по девяносто четвертый, в котором хроматография не используется для очистки продукта реакции любой из стадий a), b), c), d), e), f) и g).

**[0234]** Девяносто шестой вариант реализации раскрывает способ, описанный в вариантах реализации с восемьдесят третьего по девяносто четвертый, где продукт реакции любой из стадий a), b), c), d), e), f) и g) очищается экстракцией и/или селективным осаждением, как описано в данном документе (например, как описано в двадцать первом, тридцать пятом, сорок втором, сорок шестом и сорок седьмом вариантах реализации).

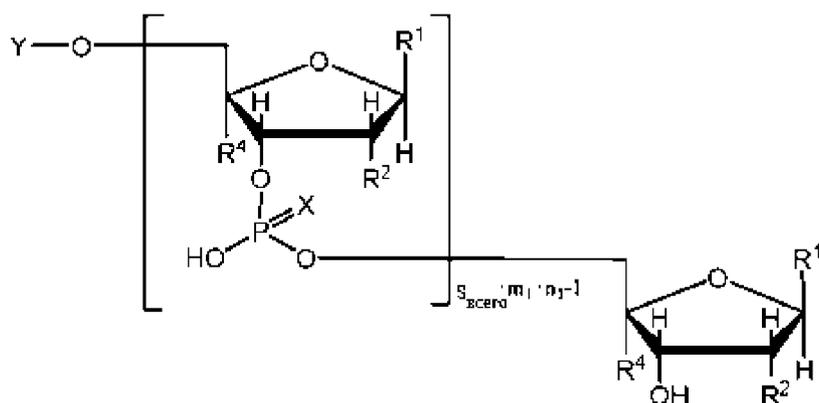
**[0235]** Девяносто седьмой вариант реализации раскрывает способ, как описано в вариантах реализации с девяностого по девяносто шестой, где способ дополнительно включает снятие защиты с олигонуклеотида формулы (IX2), (X2) или (X2') или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (IX2A), (X2A) или (X2A') или его соли.



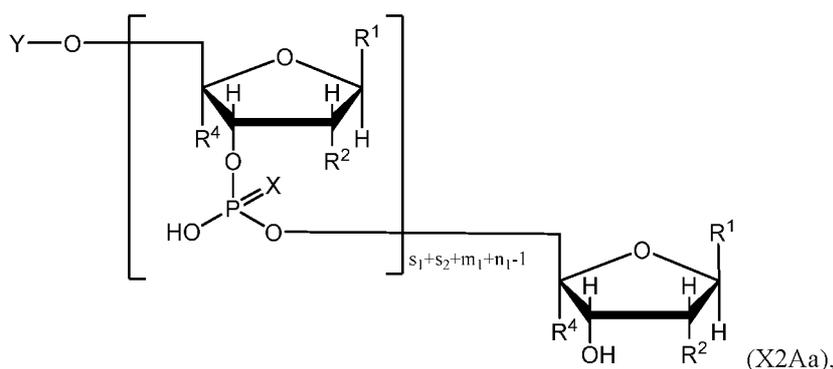
**[0236]** В определенных вариантах реализации  $Z$  представляет собой группу в формуле (IX2), (X2) или (X2'), выбранную из TBDPS, ToBDPS и TBDAS. В определенных вариантах реализации реакцию снятия защиты проводят, как описано во втором аспекте или в любых вариантах реализации, описанных в нем (*например*, в вариантах с двадцать шестого по тридцать второй).

**[0237]** Девяносто восьмой вариант реализации раскрывает способ, как описано в любом из вариантов реализации с восемьдесят третьего по девяносто седьмой, где, когда  $R^{16}$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ , процесс дополнительно включает стадию:

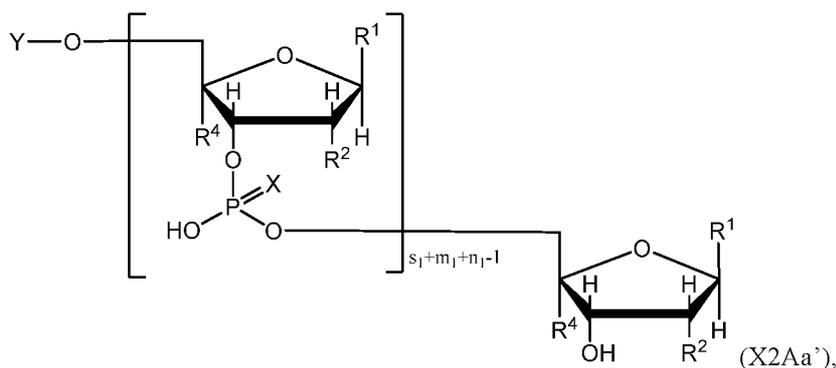
h1) снятие защиты с олигонуклеотида (IX2A), (X2A) или (X2A') или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (IX2Aa), (X2Aa) или (X2Aa')



(IX2Aa),



(X2Aa),

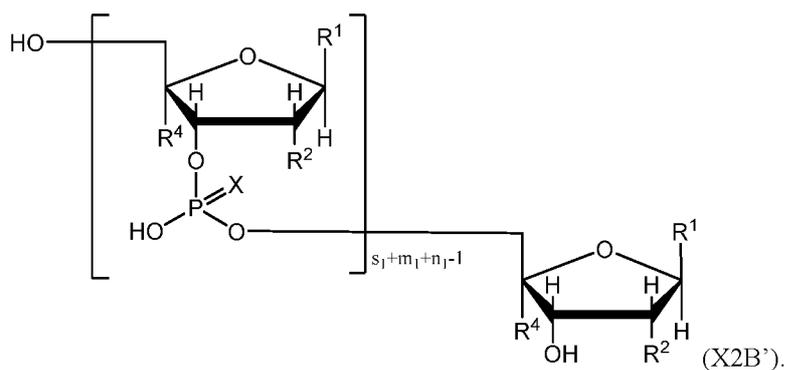
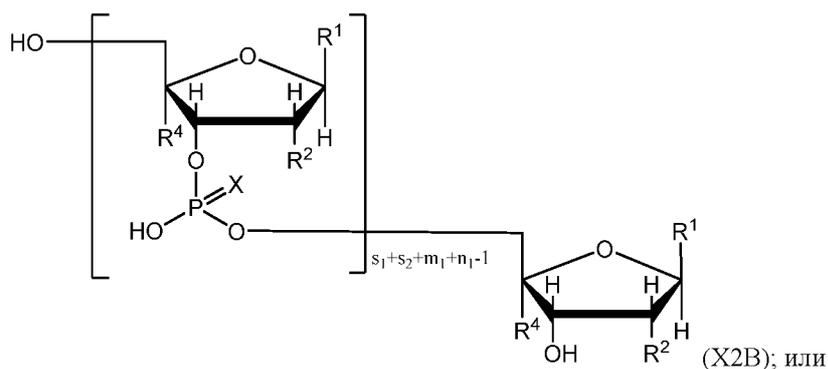
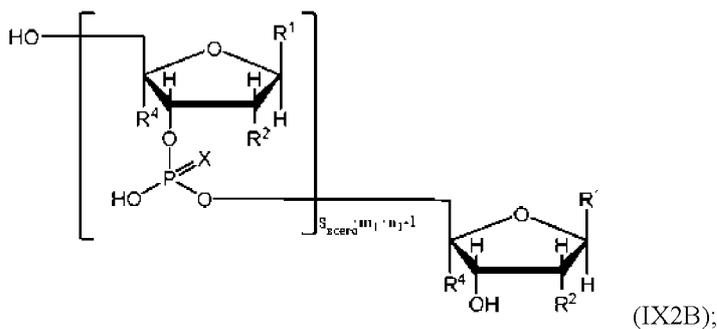


(X2Aa'),

или его соли.

**[0238]** Девяносто девятый вариант реализации раскрывает способ, описанный в девяносто восьмом варианте реализации, где реакцию снятия защиты проводят путем взаимодействия олигонуклеотида (IX2A), (X2A) или (X2A') или его соли с основанием. В некоторых вариантах реализации основание выбрано из 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ена, алкамина (например, трет-бутиламина, втор-бутиламина, диизопропилэтиламина и триэтиламина) и другого подходящего органического основания.

**[0239]** В 100<sup>м</sup> варианте реализации раскрыт способ, описанный в девяносто восьмом или девяносто девятом вариантах реализации, где способ дополнительно включает стадию снятия защиты с олигонуклеотида (IX2Aa), (X2Aa) или (X2Aa') или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (IX2B), (X2B) или (X2B'):



или его соли.

**[0240]** В 101<sup>-м</sup> варианте реализации раскрыт способ, описанный в 100<sup>-м</sup> варианте реализации, где снятие защиты проводят путем взаимодействия олигонуклеотида (IX2Aa) или (X2Aa) или его соли с NH<sub>4</sub>OH. В определенных вариантах реализации обработка NH<sub>4</sub>OH также удаляет другие защитные группы в олигонуклеотидах, такие как защитные группы в любых нуклеосообразованиях (*например*, защитная группа NH<sub>2</sub> в нуклеосообразованиях). В определенных вариантах реализации обработка NH<sub>4</sub>OH приводит к олигонуклеотидам формулы (IX2B), (X2B) или (X2B') или их соли, где R<sup>1</sup> в каждом случае независимо представляет собой нуклеосодержащее, где NH<sub>2</sub> нуклеосодержащее, если присутствует, не защищено.

**[0241]** 102<sup>-й</sup> вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из вариантов с восьмидесятым третьим по 101<sup>-й</sup>, где n<sub>1</sub> равно 3, 4, 5 или 6.

**[0242]** 103<sup>-й</sup> вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из вариантов реализации с девяностым до 101<sup>-го</sup>, где s<sub>i</sub> для каждого случая независимо равно 3, 4, 5 или 6.

**[0243]** 104<sup>-й</sup> вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из с девяносто первого по 101<sup>-й</sup> вариантов, где s<sub>1</sub> и s<sub>2</sub> ае, каждое независимо равно 3, 4, 5 или 6.

**[0244]** 105<sup>-й</sup> вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из с восьмидесятым третьим по 101<sup>-й</sup> вариантов, где r<sub>1</sub> равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

**[0245]** В 106<sup>-м</sup> варианте реализации раскрыт способ, описанный в любом из с первого по 105<sup>-й</sup> вариантов, где все группы P=X в соединении или олигонуклеотиде представляют собой P=S.

**[0246]** 107<sup>-й</sup> вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из с первого по 105<sup>-й</sup> вариантов, где все группы P=X в соединении или олигонуклеотиде представляют собой P=O.

**[0247]** В 108<sup>-м</sup> варианте реализации раскрыт способ, описанный в любом из с первого по 105<sup>-й</sup> вариантов, где более 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% групп P=X в соединении или олигонуклеотиде представляют собой P=S.

**[0248]** 109<sup>-й</sup> вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из с первого по 105<sup>-й</sup> вариантов, где 10-90%, 20-80%, 30-70% или 40-60% групп P=X в соединении или олигонуклеотиде представляют собой P=S.

**[0249]** В 110<sup>-м</sup> варианте реализации раскрывается способ, описанный в любом из с первого по 105<sup>-й</sup> вариантов, где 10-90%, 20-80%, 30-70% или 40-60% групп P=X в соединении или олигонуклеотиде представляют собой P=O.

**[0250]** В некоторых вариантах реализации реакции снятия защиты на стадиях iia), стадии c) и f) любого из вариантов реализации с восьмидесяти четвертого по девяностый и девяносто шестого варианта реализации могут быть выполнены, как описано в первом аспекте или любых вариантах реализации, описанных в нем. (например, варианты реализации с двадцать шестого по тридцать четвертый)

**[0251]** В некоторых вариантах реализации стадия снятия защиты iA), ivA), i'), iv'), i'') и iv'') седьмого аспекта может быть выполнена, как описано в первом аспекте или любых вариантах реализации, описанных в нем (например, второй - двенадцатый варианты).

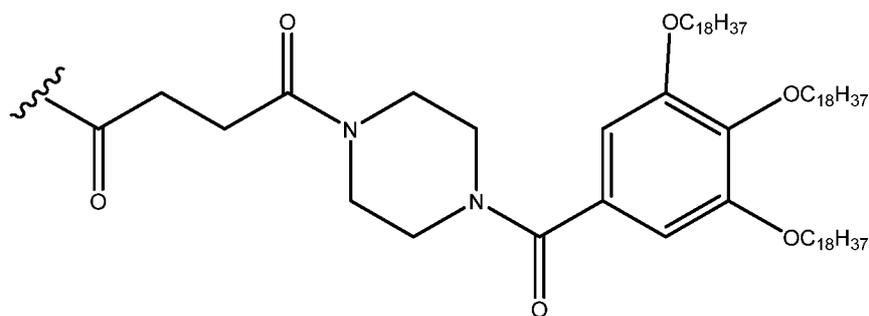
**[0252]** В некоторых вариантах реализации реакции сочетания на стадиях a), ia), ii), iiA), ii'), d) и ii'') могут быть проведены путем добавления активатора к органическому раствору, содержащему 3'-ОН-защищенный нуклеотидный фрагмент и 5'-ОН-защищенный фосфамидитный или фосфонатный фрагмент.

**[0253]** В некоторых вариантах реализации реакции сульфуризации на стадиях b), iii), iiiA), iii') e) и iii'') можно проводить с использованием сульфуризирующих агентов (например, 3-амино-1,2,4-дитиазол-5-тион (XH или ADTT), 3-(N,N-диметиламинометилден)амино)-3Н-1,2,4-дитиазол (DDTT), фенилацетилдисульфид (PADS), 3Н-1,2-бензодитиол-3-он 1,1-диоксид (реагент Beaucage) или фенил-3Н-1,2,4-дитиазол-3-он (POS). В конкретном варианте реализации сульфуризирующим агентом является DDTT. В определенных вариантах реализации основание представляет собой пиридин или имидазол.

**[0254]** В определенных вариантах реализации реакции окисления на стадиях b), iii), iiiA), iii') e) и iii'') могут быть проведены с использованием стандартных окислителей, известных в литературе. Примеры окислителей включают, но не ограничиваются ими, трет-бутилгидропероксид (t-BuOOH), (1S)-(+)-(10-камфорсульфонил) оксазирин (CSO), I<sub>2</sub> и раствор окислителя йод-пиридин в воде. В конкретном варианте реализации окислитель представляет собой трет-BuOOH.

**[0255]** В некоторых вариантах реализации реакция фосфитилирования восьмидесят пятого, восьмидесят седьмого и девяносто второго вариантов реализации может быть проведена, как описано в третьем аспекте или любых вариантах реализации, описанных в нем (например, с тридцать девятого по сорок второй варианты реализации)

**[0256]** В одном варианте Y представляет собой:



**[0257]** В определенных вариантах реализации олигонуклеотид формулы (IX2B), (X2B) или (X2B'), полученный в результате реакции снятия защиты, очищают глубинной фильтрацией. В одном варианте реализации реакционную смесь реакции снятия защиты разбавляют раствором сульфата аммония перед тем, как подвергнуть ее глубинной фильтрации. Разбавление сульфатом аммония может предотвратить прилипание олигонуклеотида к фильтру.

**[0258]** В определенных вариантах реализации концентрация раствора сульфата аммония составляет от 100 мМ до 5М, от 500 мМ до 2М, от 500 до 1500 мМ или от 1000 до 1200 мМ.

**[0259]** Для глубинной фильтрации можно использовать любые подходящие глубинные фильтры, *например*, подходящие глубинные фильтры, описанные в данном документе.

**[0260]** В определенных вариантах реализации олигонуклеотид формулы (IX2A), (IX2Aa), (IX2Aa'), (X2A), (X2A'), (X2Aa), (X2Aa'), (X2B) или (X2B') может быть очищен глубинной фильтрацией с последующей хроматографией на гидрофобных взаимодействиях (НС).

**[0261]** В определенных вариантах реализации любую из реакций, описанных в аспектах с первого по восьмой, или в любых вариантах реализации, описанных в них (*например*, с первого по 135<sup>-й</sup> варианты), можно проводить в подходящем растворителе или смеси подходящих растворителей. В некоторых вариантах реализации реакции можно проводить в подходящем органическом растворителе или в смеси подходящих органических растворителей. Примеры органических растворителей, которые можно использовать в данном раскрытии, включают, но не ограничиваются ими, дихлорметан (DCM), ацетонитрил (ACN), тетрагидрофуран (ТГФ), ацетон, 2-метилтетрагидрофуран, метилтрет-бутиловый эфир, этилацетат и т. д.

**[0262]** В определенных вариантах реализации любая из реакций, описанных в аспектах с первого по восьмой, или любых вариантах реализации, описанных в данном документе (*например*, варианты реализации с первого по 135<sup>-й</sup>), может быть проведена при подходящей температуре. В определенных вариантах реализации реакцию проводят при комнатной температуре. В определенных вариантах реализации реакцию проводят при температуре от 20 °С до 30 °С. В определенных вариантах реализации реакцию проводят при температуре от -10 °С до 10 °С, от -5 °С до 5 °С. В определенных вариантах реализации реакцию проводят при температуре 25 ± 2 °С. В определенных вариантах реализации реакцию проводят при температуре 0 ± 2 °С.

**[0263]** 111<sup>-й</sup> вариант реализации раскрывает способ любого из вариантов реализации, описанных в данном документе (*например*, с первого по 135<sup>-й</sup> варианты реализации), где нуклеосованье выбрано из группы, состоящей из цитозина, гуанина, аденина, тимина, урацила, гипоксантина, ксантина, 7-метилгуанин, 5,6-дигидроурацил, 5-метилцитозин и 5-гидроксиметилцитозин, где группа NH<sub>2</sub> нуклеосованья, если присутствует, защищена PhCO-, CH<sub>3</sub>CO-, *i*PrCO-, Me<sub>2</sub>N-CH=, или Me<sub>2</sub>N-CMe=.

**[0264]** 112<sup>-й</sup> вариант реализации раскрывает способ любого из описанных в данном документе вариантов реализации (*например*, с первого по 135<sup>-й</sup> варианты реализации), где R<sup>1</sup> выбран из группы, состоящей из цитозина, гуанина, аденина, тимина, урацила и 5-метилцитозина, где группа NH<sub>2</sub> нуклеосованья, если она присутствует, защищена PhCO-, CH<sub>3</sub>CO-, *i*PrCO-, Me<sub>2</sub>N-CH=, или Me<sub>2</sub>N-CMe=.

[0265] 113<sup>-й</sup> вариант реализации раскрывает способ любого из описанных в данном документе вариантов реализации (*например*, с первого по 135<sup>-й</sup> варианты реализации), где:

каждый R<sup>2</sup> независимо выбран из группы, состоящей из H, фтора и C<sub>1-4</sub>алкокси, необязательно замещенного C<sub>1-4</sub>алкокси;

каждый R<sup>4</sup> независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой R<sup>2</sup>, где кольцо представляет собой 5- или 6-членное кольцо, необязательно замещенное 1-3 C<sub>1-4</sub>алкильными группами;

R<sup>16</sup> представляет собой –CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN; и

R<sup>17a</sup> и R<sup>17b</sup> независимо представляют собой C<sub>1-4</sub>алкил;

[0266] В конкретном варианте реализации способ представляет собой способ, описанный в 113<sup>-м</sup> варианте реализации, где:

каждый R<sup>2</sup> независимо представляет собой H или –OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OMe;

каждый R<sup>4</sup> представляет собой H;

R<sup>16</sup> представляет собой –CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN; и

R<sup>17a</sup> и R<sup>17b</sup> оба представляют собой CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

[0267] В 114<sup>-м</sup> варианте реализации раскрыт способ, описанный в любом из с пятьдесят первого по 135<sup>-й</sup> вариантов, где целевой олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид, содержащий от 16 до 30 нуклеотидов.

[0268] В 115<sup>-м</sup> варианте раскрыт способ, описанный в 114<sup>-м</sup> варианте, где антисмысловый олигонуклеотид содержит только модифицированную РНК.

[0269] 116<sup>-й</sup> вариант реализации раскрывает способ, описанный в 114<sup>-м</sup> варианте реализации, где антисмысловый олигонуклеотид включает ДНК и модифицированную РНК.

[0270] 117<sup>-й</sup> вариант реализации раскрывает способ, описанный в одном 114<sup>-м</sup> варианте реализации, где антисмысловый олигонуклеотид представляет собой гЭпмер.

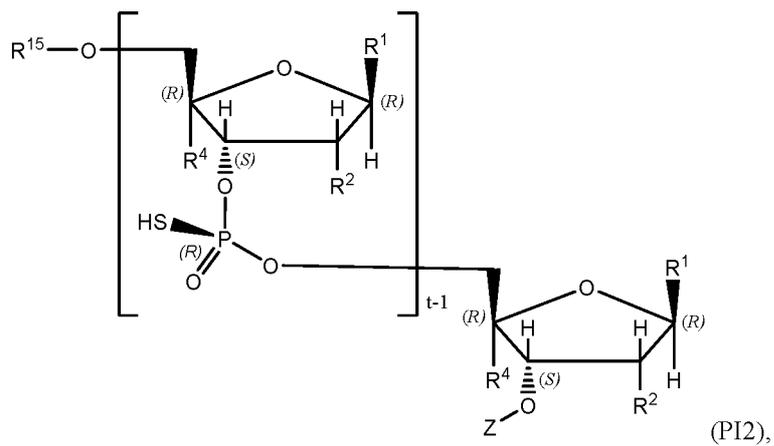
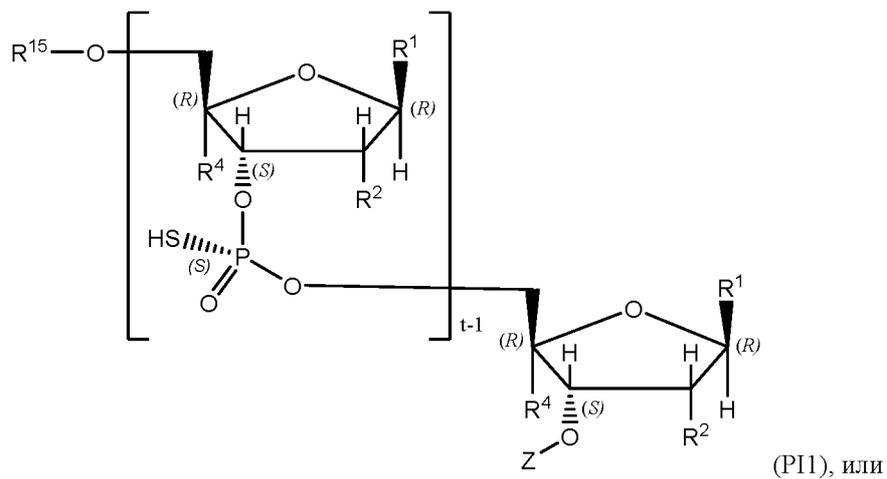
[0271] В 118<sup>-м</sup> варианте реализации раскрыт способ, описанный в одном сто четырнадцатом варианте реализации, где антисмысловый олигонуклеотид содержит только ДНК.

[0272] В определенных вариантах реализации описанный в данном документе целевой олигонуклеотид, содержащий 5'-DMT-группу (представленную R<sup>15</sup>), очищают хроматографией (*например*, хроматографией гидрофобного взаимодействия (HIC)) с последующей реакцией детритилирования для удаления 5'-DMT-группы.

### **III. Синтез олигонуклеотида с хиральной фосфоритоатной связью**

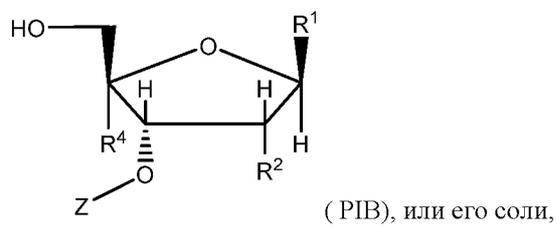
[0273] В восьмом аспекте данное раскрытие описывает жидкофазные способы синтеза стереоспецифических олигонуклеотидов с использованием реагента P(V)-PSI (KW Knouse, JN deGruyter, MA Schmidt, et al. *Science*, Vol. 361, Issue 6408, pp1234-1238 (2018)). Последовательно синтезированные олигонуклеотидные фрагменты могут быть объединены с использованием способов жидкофазного конвергентного синтеза, описанных в настоящем документе, для получения стереоселективных олигонуклеотидов-мишеней (*например*, антисмысловых олигонуклеотидов (ASO)).

[0274] 119<sup>-й</sup> вариант реализации раскрывает жидкофазный способ получения олигонуклеотида формулы (PI1) или (PI2),

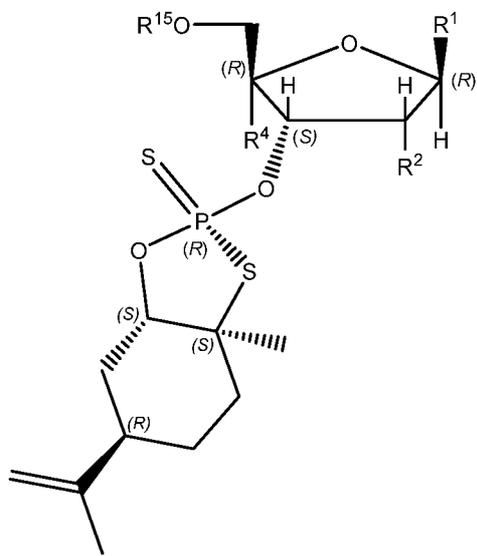


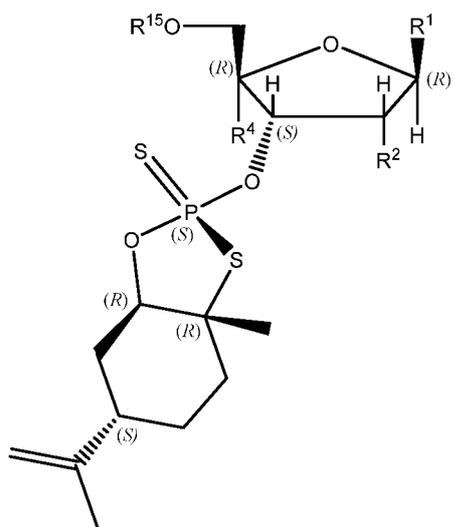
или его соли, включающий стадии:

1) связывание соединения формулы (PIB):



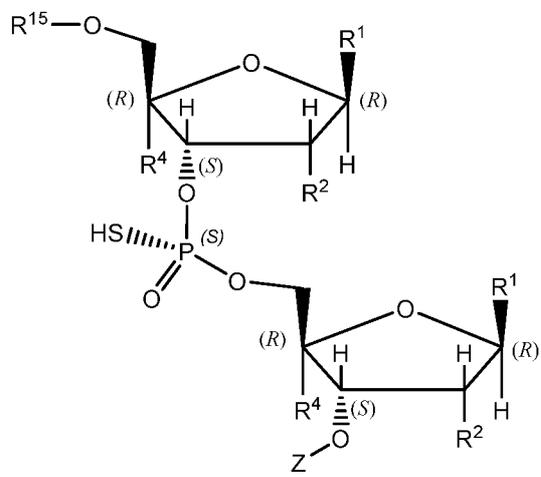
с соединением формулы (PI1A) или (PI2A):



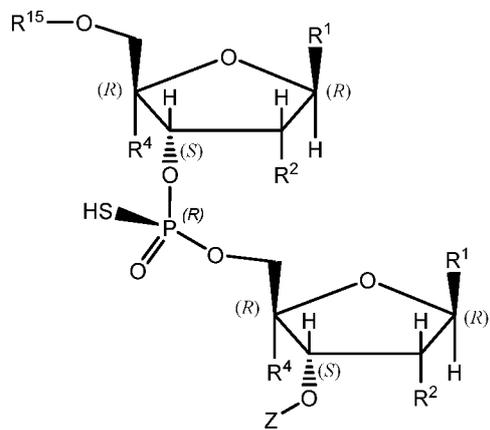


(PI2A), или его соль,

снятие защиты с соединения формулы (PI1C) или (PI2C):

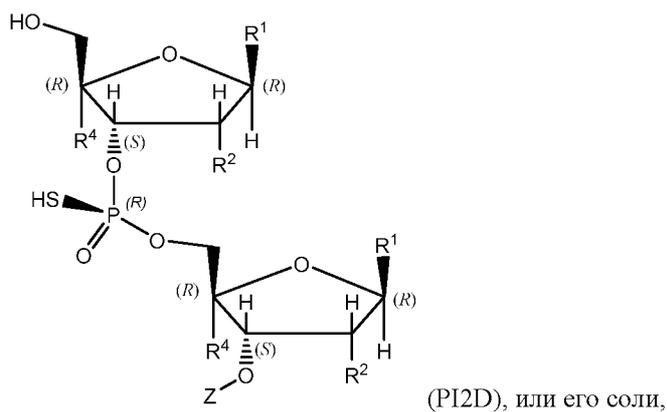
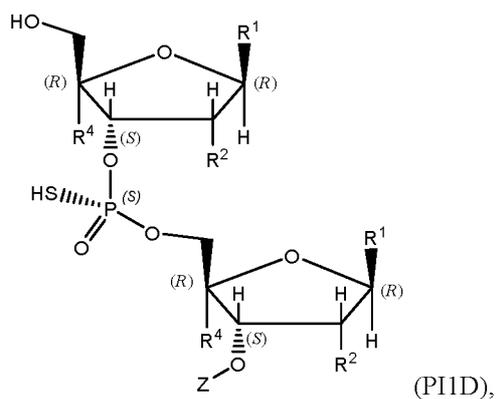


(PI1C),



(PI2C), или его соли;

2) снятие защиты с соединения формулы (PI1C) или (PI2C) или его соли с образованием соединения формулы (PI1D) или (PI2D):



3) начиная с соединения формулы (PI1D) или (PI2D) или его соли, повторяя стадии 1) и 2) в течение  $t-3$  раз, с последующей стадией 1) с получением формулы (PI') или его соли, где:

$R^1$  в каждом случае независимо представляет собой нуклеобазу, где  $NH_2$  нуклеобазы, если присутствует, защищено аминозащитной группой;

$R^2$ , в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и  $C_{1-6}$ алкокси, необязательно замещенного  $C_{1-6}$ алкокси;

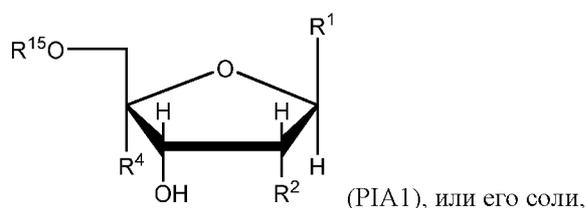
$R^4$  в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой  $R^2$ ;

$R^{15}$  представляет собой защитную группу гидроксила;

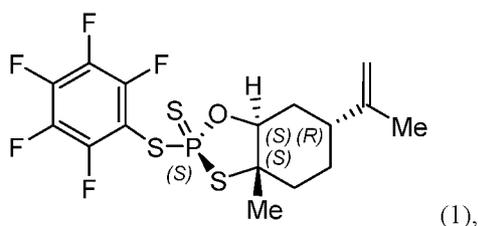
$t$  равно целому числу от 3 до 20; и

$Z$  представляет собой силильную защитную группу гидроксила.

**[0275]** В 120<sup>М</sup> варианте реализации для способа, описанного в 119<sup>М</sup> варианте реализации, соединение формулы (PIA) получают реакцией соединения формулы (PIA1):

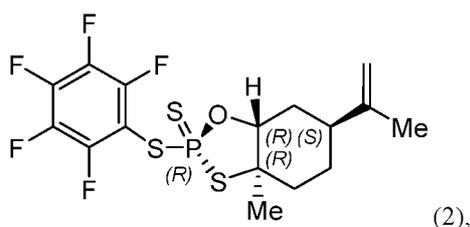


с соединением формулы (1):



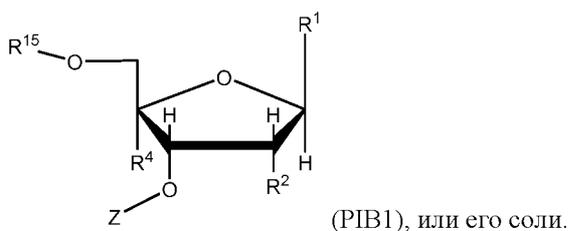
с образованием соединения формулы (PI1A) или его соли; и

соединение формулы (PI2A) получают путем взаимодействия соединения формулы (PIA1) или его соли с соединением формулы (2):



с образованием соединения формулы (PI2A) или его соли.

**[0276]** 121-й вариант реализации раскрывает способ, описанный в способе 119-го или 120-го вариантов реализации, где фрагмент формулы (PIB) получают путем снятия защиты с соединения формулы (PIB1).



**[0277]** 122-й вариант реализации раскрывает способ, описанный в способе 119-го, 120-го или 121-го вариантов реализации, в котором реакцию сочетания на стадии 1) проводят в присутствии основания. В определенных вариантах реализации основание выбрано из 8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ена (DBU), алкиламина (например, трет-бутиламин, втор-бутиламин, диизопропилэтиламин, триметиламин, триэтиламин, 2-метилпропан-2-амин и т.д.) и других подходящих органических оснований. В конкретном варианте реализации основание представляет собой DBU.

**[0278]** В некоторых вариантах реализации реакцию сочетания на стадии 1) проводят в безводном или практически безводном растворе в присутствии основания. В определенных вариантах реализации безводный или практически безводный раствор получают путем удаления воды с использованием азеотропной перегонки перед реакцией. В определенных вариантах реализации безводный или практически безводный раствор получают путем добавления осушающего агента.

**[0279]** 123-й вариант реализации раскрывает способ, описанный в способе 122-го варианта реализации, где реакцию сочетания проводят в присутствии основания и осушающего агента. Можно использовать любые подходящие осушители. В некоторых вариантах реализации осушающий агент выбран из хлорида кальция, хлорида калия, сульфата натрия, сульфата кальция, сульфата магния и молекулярных сит. В конкретном варианте реализации осушающий агент представляет собой молекулярные сита.

**[0280]** В определенных вариантах реализации основание представляет собой DBU, а осушающий агент представляет собой молекулярные сита. В конкретном варианте размер молекулярных сит составляет 3Å.

**[0281]** 124-ый вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из вариантов реализации со 119-го по 121-ый в котором реакцию снятия защиты проводят путем взаимодействия соединения с реагентом

детритилирования. В определенных вариантах реализации реагент детритилирования представляет собой органическую кислоту. В определенных вариантах реализации реагент детритилирования представляет собой  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CHCl}_2\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{ClCOOH}$ , лимонную кислоту, метансульфовую кислоту, бензолсульфовую кислоту,  $\text{CClF}_2\text{COOH}$ ,  $\text{CHF}_2\text{COOH}$ , или  $\text{PhSO}_2\text{H}$ . В конкретном варианте реализации реагент детритилирования представляет собой  $\text{CHCl}_2\text{COOH}$ . В другом предпочтительном варианте реализации реагент детритилирования представляет собой лимонную кислоту.

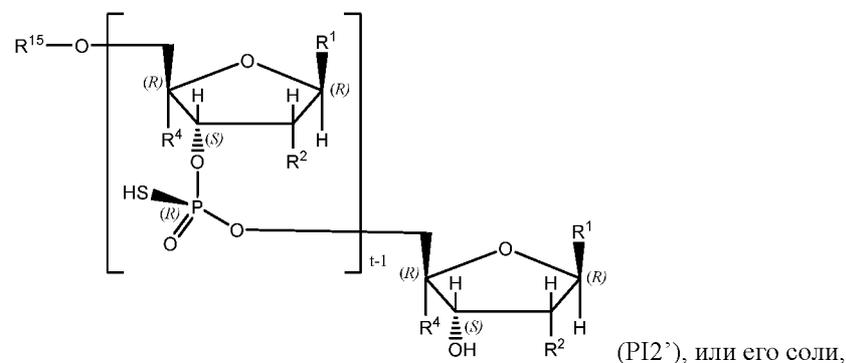
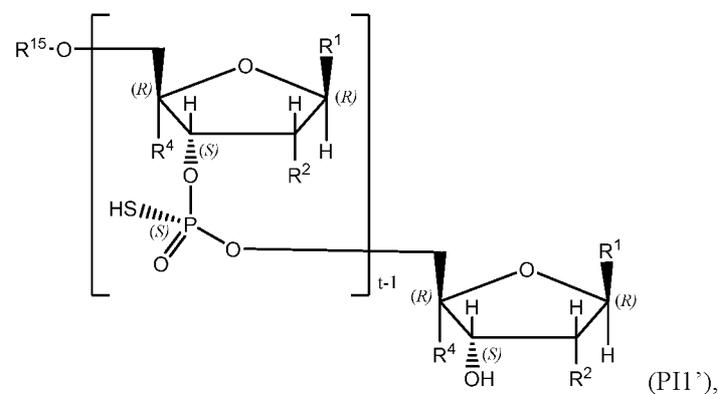
**[0282]** 125-й вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из вариантов со 119-го по 124-й вариант, где  $\text{R}^{15}$  представляет собой 4,4'-диметокситритильную группу.

**[0283]** 126-й вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из 120-го по 125-й вариантов реализации, где реакцию между соединением формулы (PIA1) и соединением формулы (1) или (2) проводят в безводном или практически безводном растворе. при наличии основания.

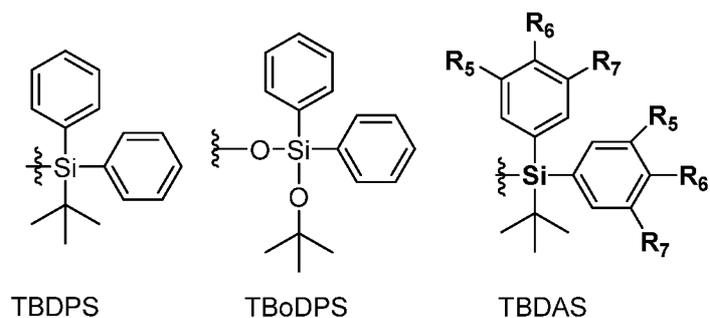
**[0284]** В определенных вариантах реализации безводный или практически безводный раствор получают путем удаления воды с использованием азеотропной перегонки перед реакцией. В определенных вариантах реализации безводный или практически безводный раствор получают путем добавления осушающего агента.

**[0285]** В некоторых вариантах реализации основание выбрано из 1,8-диазацикло [5.4.0] ундец-7-ена (DBU), алкиламина (например, трет-бутиламин, втор-бутиламин, диизопропилэтиламин, триметиламин, триэтиламин и т.д.) и других подходящих органических оснований. В конкретном варианте реализации основание представляет собой DBU.

**[0286]** В 127-м варианте реализации раскрыт способ, описанный в любом из вариантов со 119-го по 126-й, где способ дополнительно включает снятие защиты с олигонуклеотида формулы (PI1) или (PI2) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (PI1') или (PI2'):



**[0287]** В 128-м варианте реализации раскрыт способ, описанный в 127-м варианте реализации, где силильная защитная группа выбрана из TBDPS, TBoDPS и TBDAS.



где каждый из  $R_5$ ,  $R_6$  и  $R_7$  независимо представляет собой H,  $C_{1-30}$ алкил или  $C_{1-30}$ алкокси. В конкретном варианте реализации Z представляет собой TBDPS.

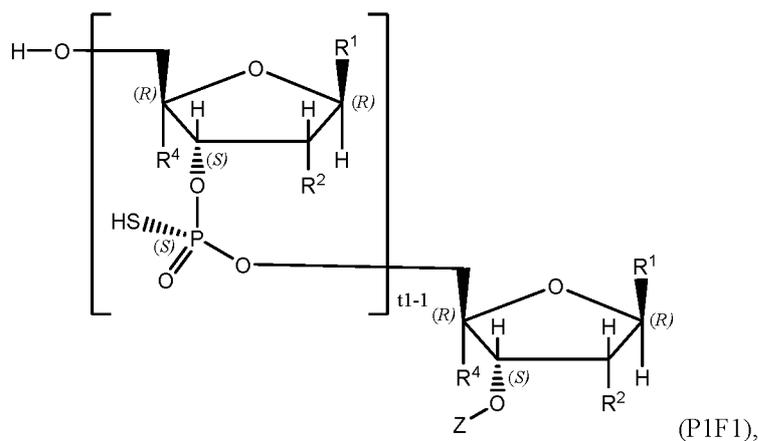
**[0288]** В 129<sup>m</sup> варианте реализации раскрыт способ, как описано в 128<sup>m</sup> варианте реализации, где реакция снятия защиты представляет собой реакцию, проводимую реакцией олигонуклеотида формулы (PI1) или (PI2) или его соли с десилилирующим реагентом (*например*, как описано во втором аспекте или любых вариантах реализации, описанных в нем). В определенных вариантах реализации реагент десилилирования представляет собой тетра-*n*-бутиламмония фторид (TEAF).

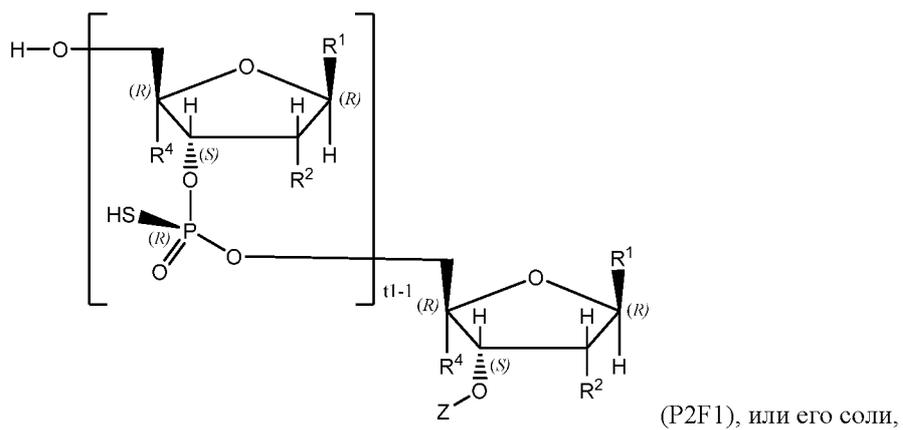
**[0289]** 130<sup>ii</sup> вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из вариантов со 119<sup>to</sup> по 129<sup>ii</sup>, где: каждый  $R^2$  независимо выбран из H, F или  $C_{1-4}$ алкокси, необязательно замещенного  $C_{1-4}$ алкокси; и  $R^4$  представляет собой H. В конкретном варианте реализации  $R^2$  представляет собой H. В другом конкретном варианте реализации  $R^2$  представляет собой  $-OCH_2CH_2OCH_3$ .

**[0290]** 131<sup>ii</sup> вариант реализации раскрывает способ, описанный в любом из 119<sup>to</sup> по 130<sup>ii</sup> вариантов, где соединение формулы (PI1A), (PI2A) (PIB), (PI1C), (PI2C), (PI1D), (PI2D), (PI1), (PI2), (PI1') и/или (PI2') очищают с помощью колоночной хроматографии.

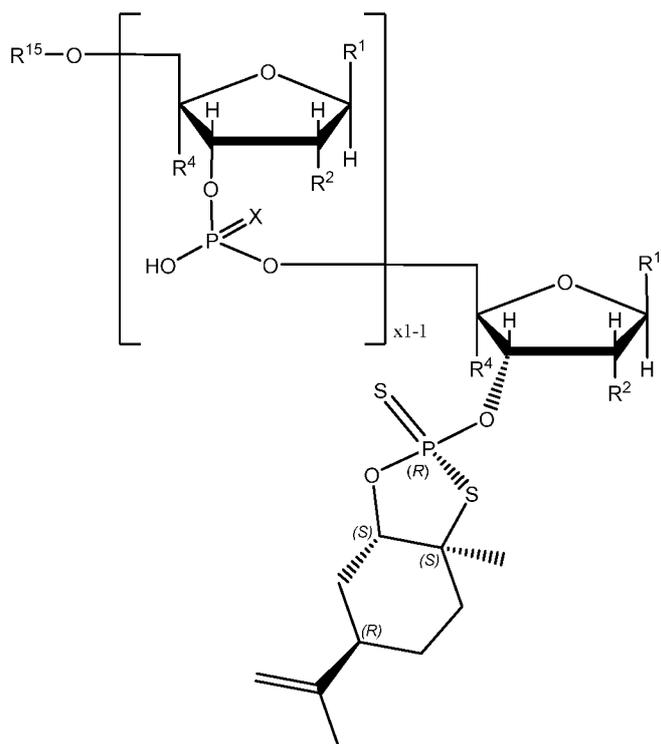
**[0291]** В данном раскрытии также предлагается конвергентный жидкофазный процесс получения олигонуклеотида, в котором по меньшей мере часть фосфотиолатных связей в олигонуклеотиде представляет собой диастереоспецифический фосфотиолат.

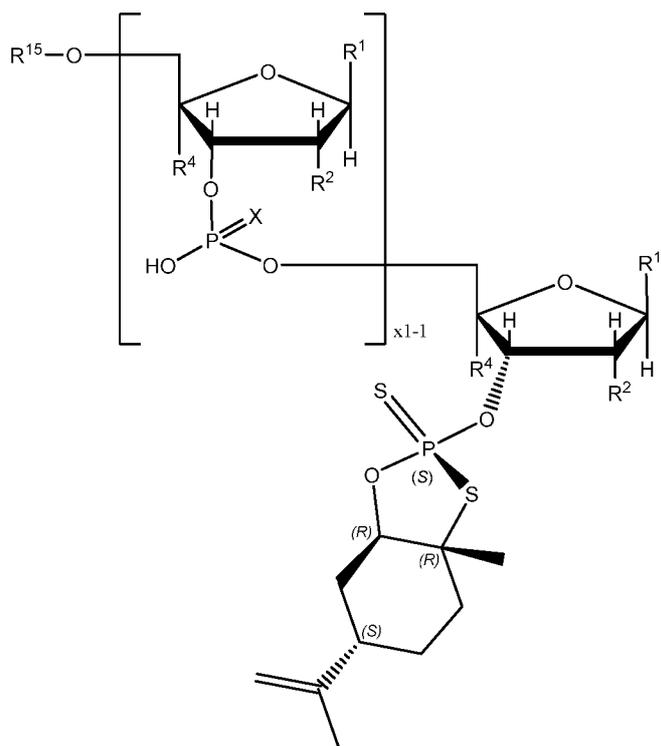
**[0292]** 132<sup>ii</sup> вариант реализации раскрывает конвергентный жидкофазный способ для получения олигонуклеотида, включающий стадии связывания олигонуклеотидного фрагмента формулы (PIF1) или (P2F2):





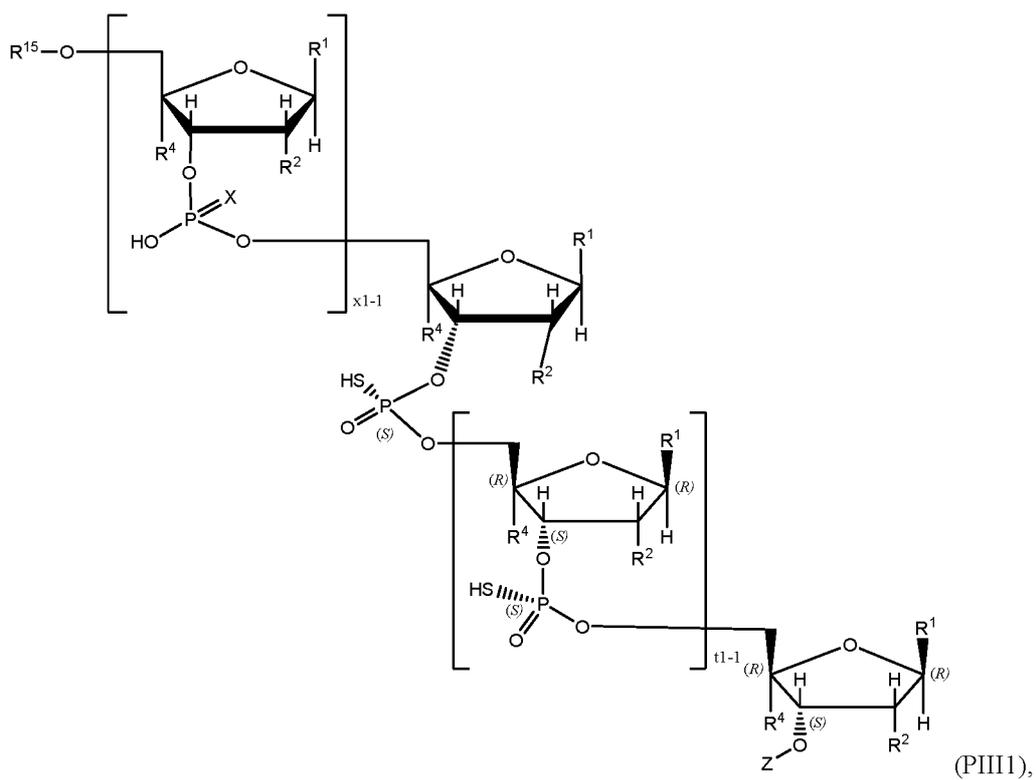
с олигонуклеотидом формулы (P1F2) или (P2F2):



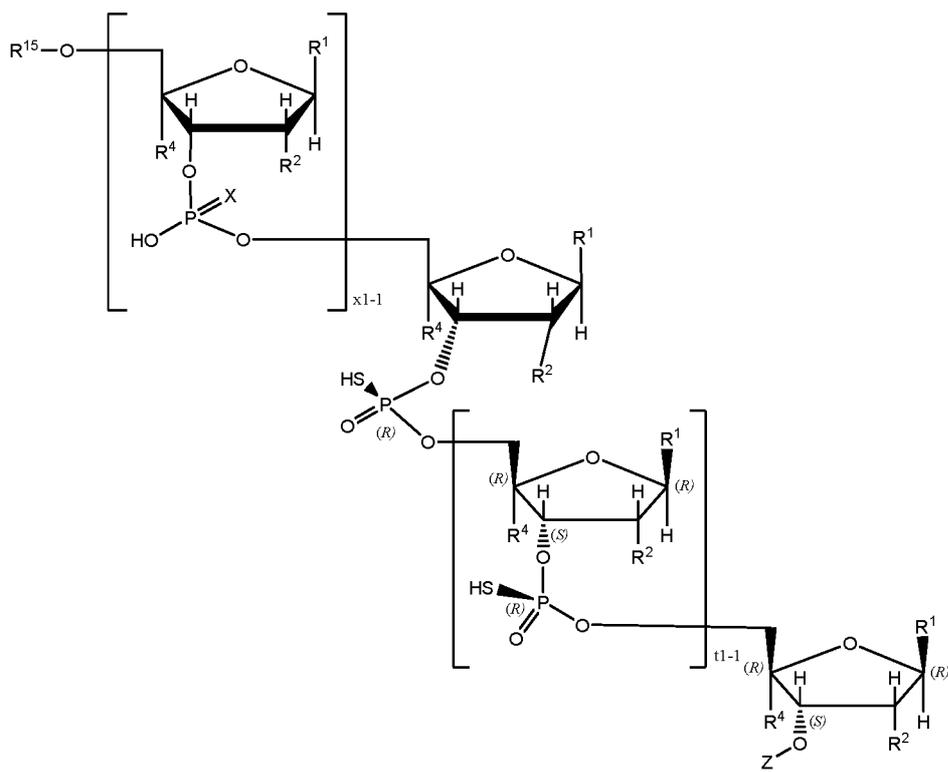


(P2F2),

или его соль с образованием соединения формулы (PIII) или (PIII2):



(PIII),



(P112), или его соли, где:

$R^1$  в каждом случае независимо представляет собой нуклеоснование, где  $NH_2$  нуклеоснования, если присутствует, защищено аминозащитной группой;

$R^2$ , в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и  $C_{1-6}$ алкокси, необязательно замещенного  $C_{1-6}$ алкокси;

$R^4$  в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой  $R^2$ ;

$R^{15}$  представляет собой защитную группу гидроксила;

X, в каждом случае независимо представляет собой O или S;

t1 равно целому числу от 3 до 20;

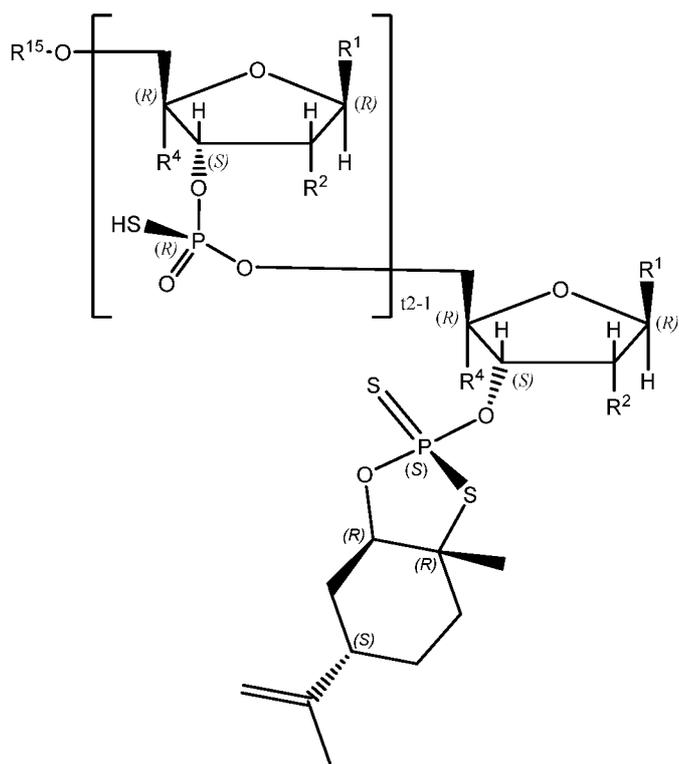
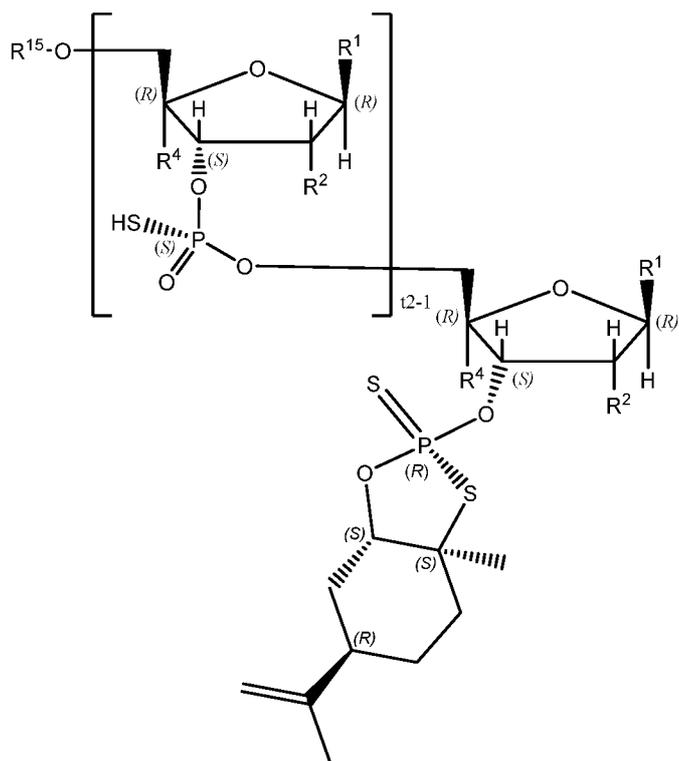
x1 равно целому числу от 3 до 20; и

Z представляет собой силильную защитную группу гидроксила.

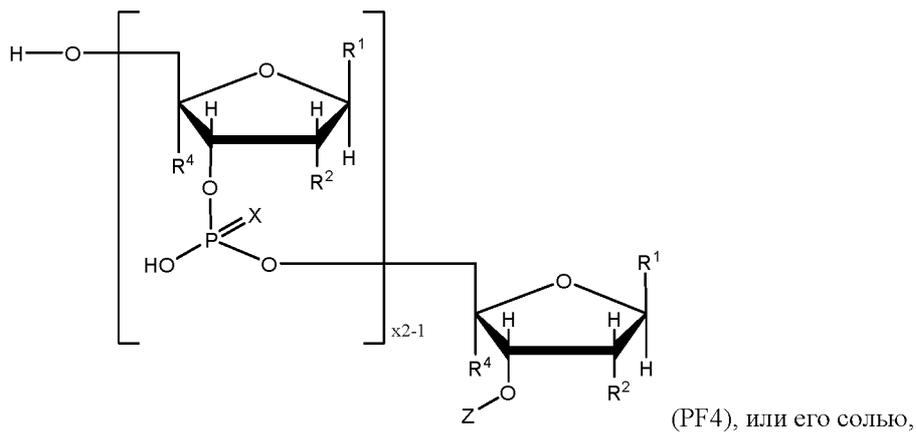
**[0293]** В частности, олигонуклеотид формулы (P111) или его соль образуется в результате реакции сочетания между олигонуклеотидным фрагментом формулы (P1F1) или его солью и олигонуклеотидом формулы (P1F2) или его солью. Точно так же олигонуклеотид формулы (P112) или его соль образуется в результате реакции сочетания между олигонуклеотидным фрагментом формулы (P2F1) или его солью и олигонуклеотидом формулы (P2F2) или его солью.

**[0294]** В определенных вариантах реализации олигонуклеотид формулы (P111) или (P112) или его соль очищают хроматографией.

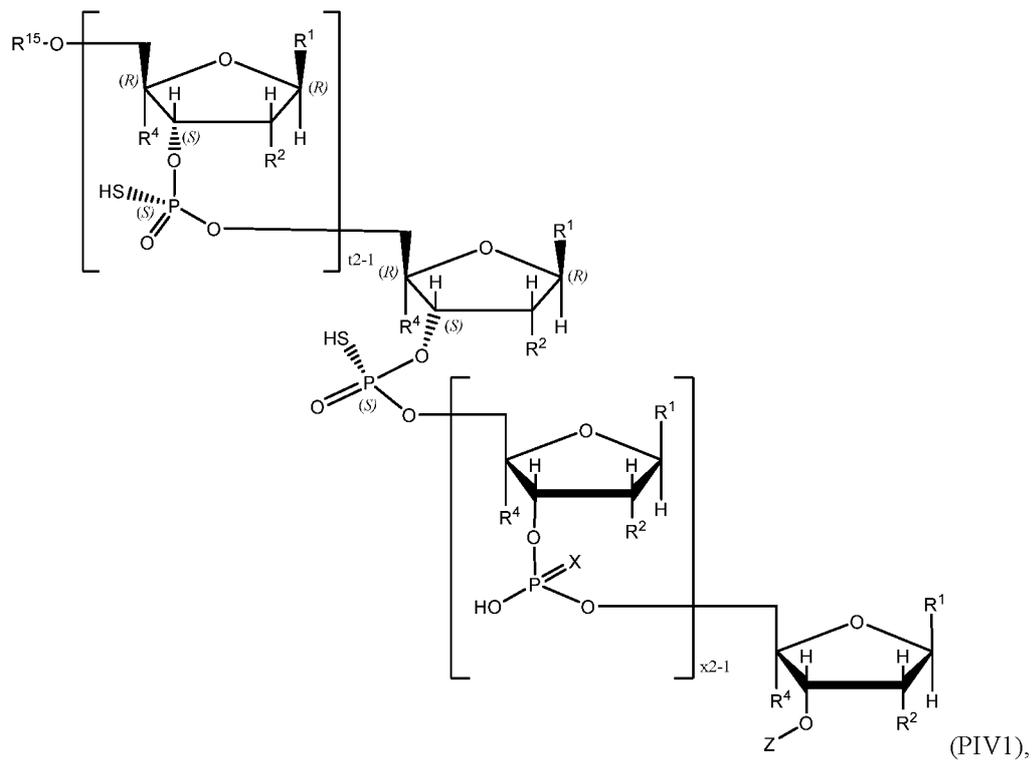
**[0295]** 133<sup>-й</sup> вариант реализации раскрывает конвергентный жидкофазный способ для получения олигонуклеотида, включающий стадии связывания олигонуклеотидного фрагмента формулы (P1F3) или (P2F3):

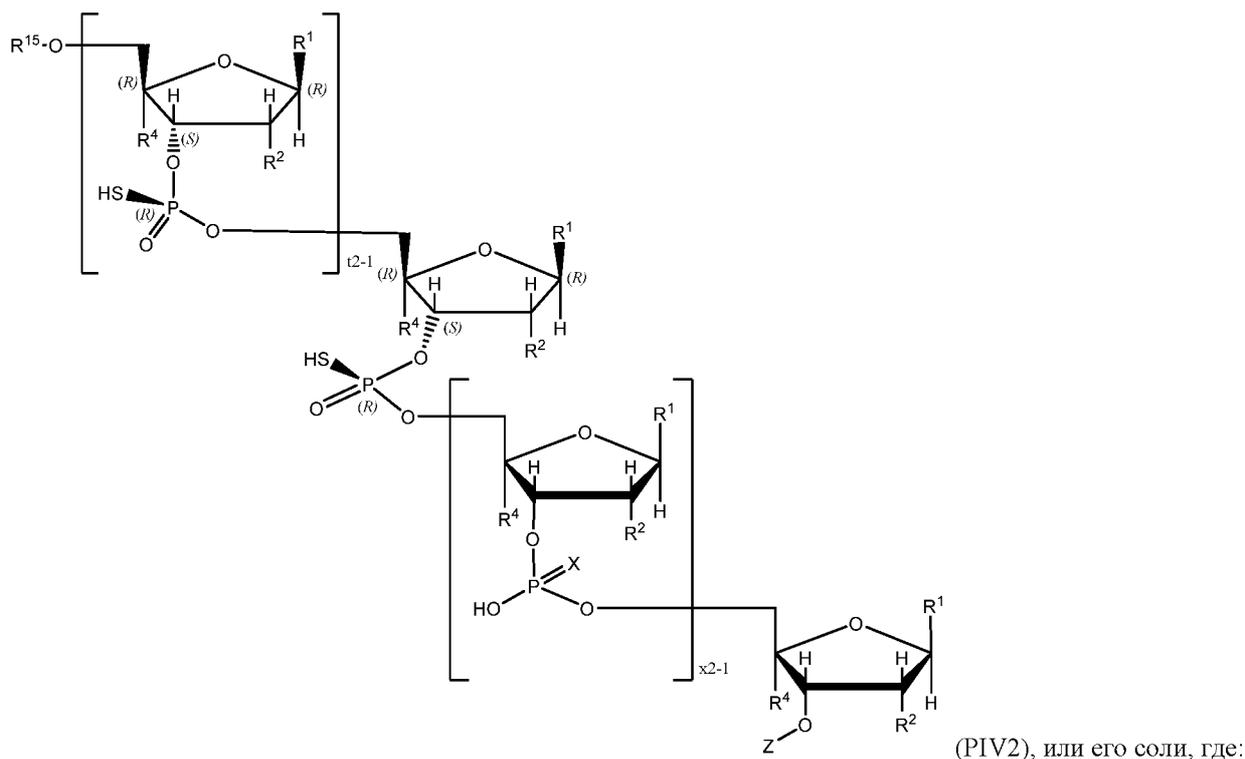


с олигонуклеотидным фрагментом формулы (PF4):



с образованием олигонуклеотида формулы (PIV1) или (PIV2):





R<sup>1</sup>, в каждом случае независимо представляет собой нуклеос основание, где NH<sub>2</sub> нуклеос основания, если присутствует, защищено аминозащитной группой;

R<sup>2</sup>, в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и C<sub>1-6</sub>алкокси, необязательно замещенного C<sub>1-6</sub>алкокси;

R<sup>4</sup> в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой R<sup>2</sup>;

R<sup>15</sup> представляет собой защитную группу гидроксила;

X, в каждом случае независимо представляет собой O или S;

t<sub>2</sub> равно целому числу от 3 до 20;

x<sub>2</sub> равно целому числу от 3 до 20; и

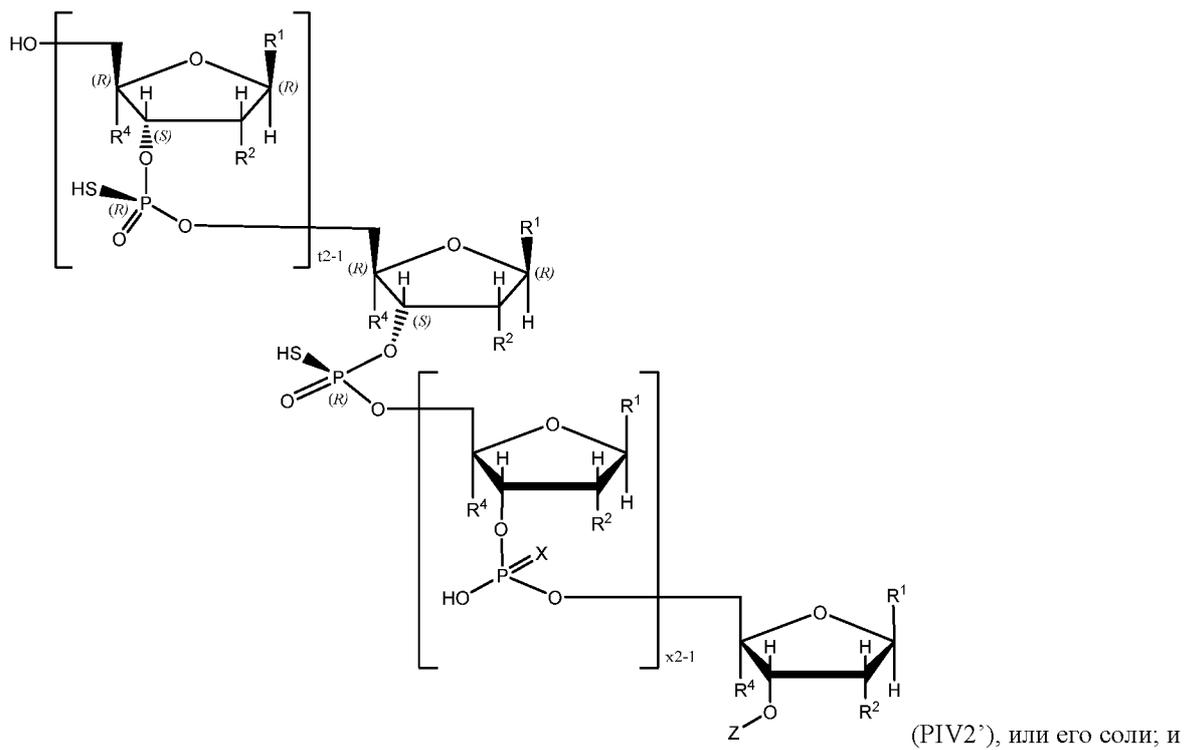
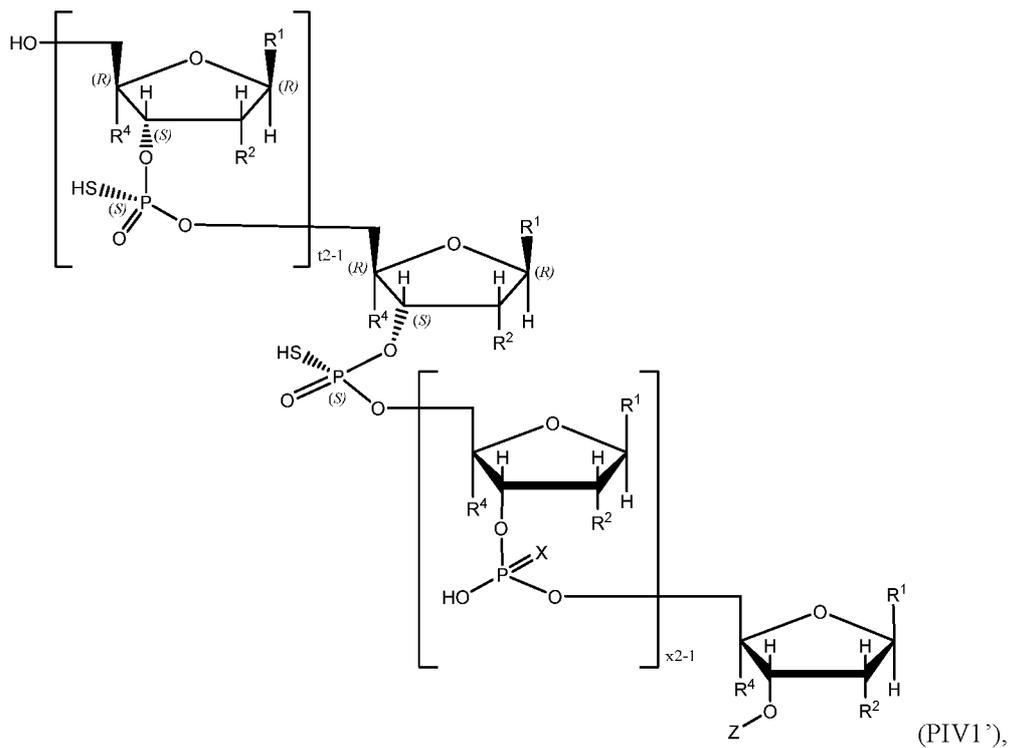
Z представляет собой силильную защитную группу гидроксила.

**[0296]** В частности, олигонуклеотид формулы (PIV1) или его соль образуется в результате реакции сочетания олигонуклеотидного фрагмента формулы (PIF3) или его соли с олигонуклеотидным фрагментом формулы (PF4) или его солью. Аналогичным образом олигонуклеотид формулы (PIV2) или его соль образуется в результате реакции сочетания олигонуклеотидного фрагмента формулы (P2F3) или его соли с олигонуклеотидным фрагментом формулы (PF4) или его солью.

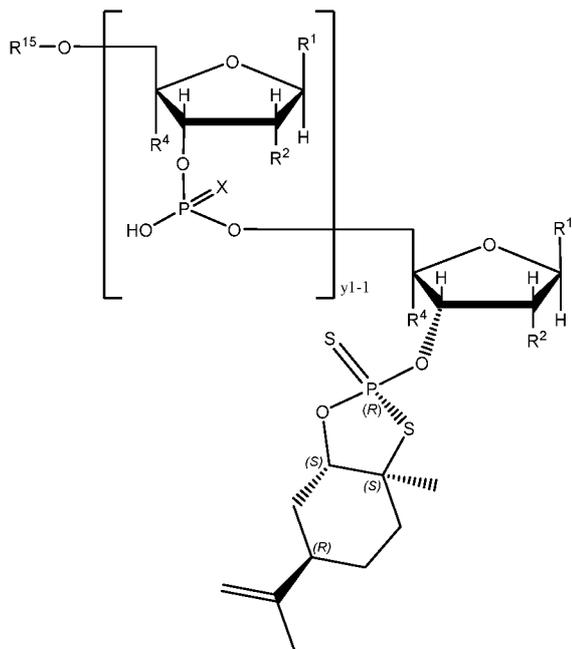
**[0297]** В определенных вариантах реализации олигонуклеотид формулы (PIV1) или (PIV2) или его соль очищают хроматографией.

**[0298]** 134<sup>iii</sup> вариант реализации раскрывает способ, описанный в 133<sup>m</sup> варианте реализации, в котором процесс дополнительно включает стадии:

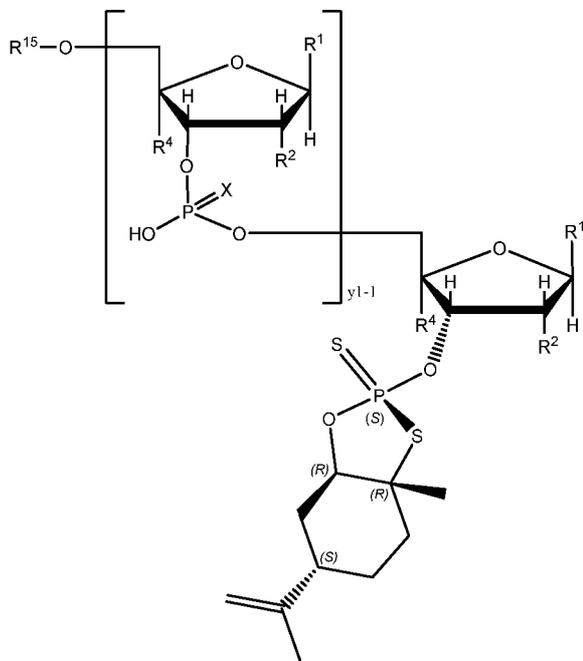
а) снятие защиты с олигонуклеотида формулы (PIV1) или (PIV2) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (PIV1') или (PIV2'):



б) связывание олигонуклеотида формулы (PIV1') или (PIV2') или его соли с олигонуклеотидным фрагментом формулы (PIF5) или (P2F5):

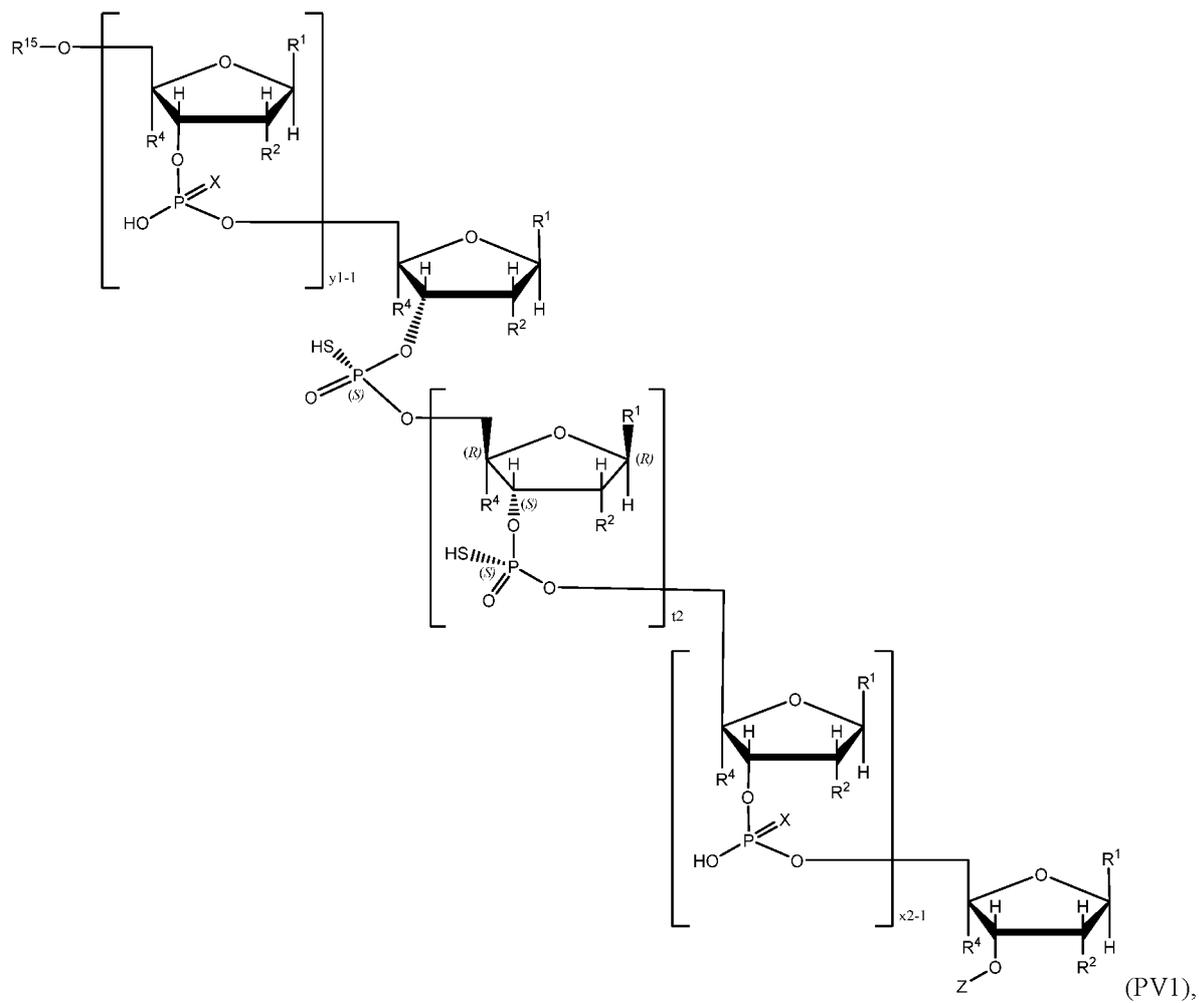


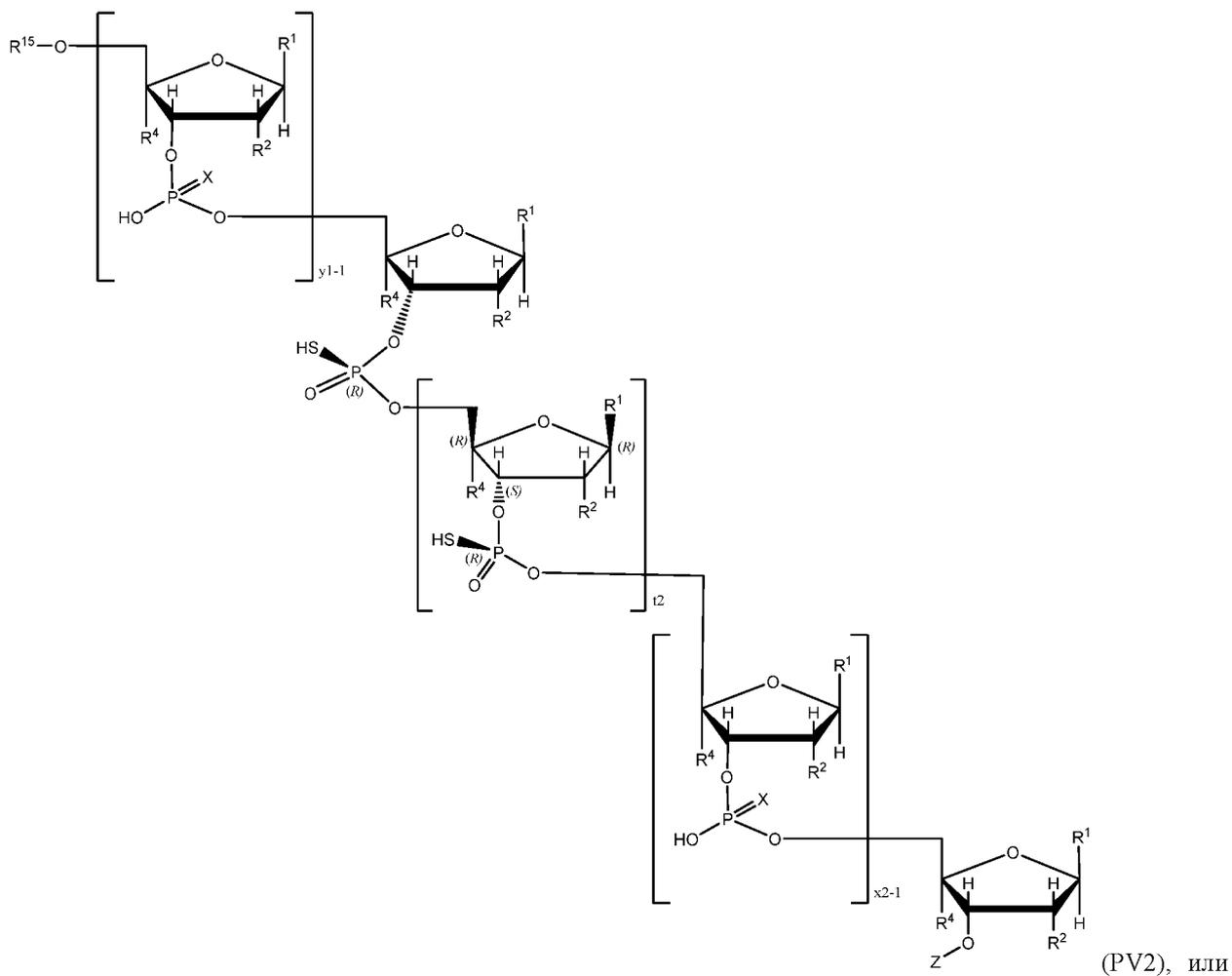
(P1F5),



(P2F5), или его соль,

с образованием олигонуклеотида формулы (PV1) или (PV2):



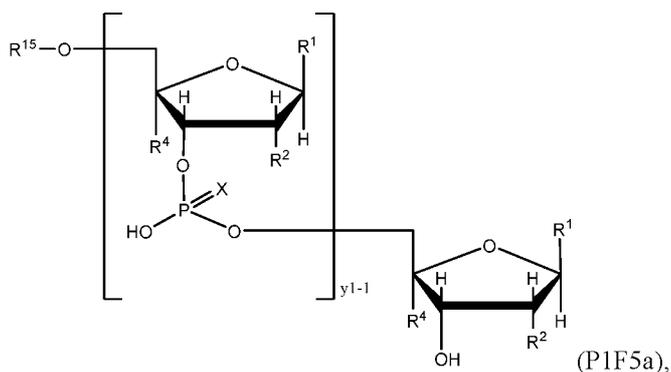


его соль, где  $y1$  равно целому числу от 3 до 20.

**[0299]** В частности, олигонуклеотид формулы (PV1) или его соль образуется путем реакции сочетания олигонуклеотида формулы (PIV1') или его соли с олигонуклеотидным фрагментом формулы (PIF5) или его солью. Аналогичным образом, олигонуклеотид формулы (PV2) или его соль образуется путем реакции сочетания олигонуклеотида формулы (PIV2') или его соли с олигонуклеотидным фрагментом формулы (P2F5) или его солью.

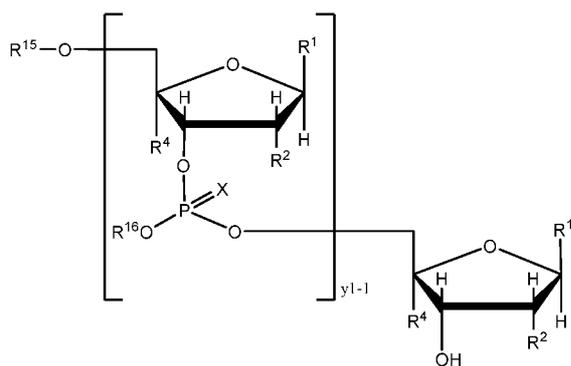
**[0300]** В определенных вариантах реализации олигонуклеотид формулы (PIV1') или (PIV2') или его соль и/или олигонуклеотид формулы (PV1) или (PV2) или его соль очищают хроматографией.

**[0301]** В определенном варианте реализации олигонуклеотидный фрагмент формулы (PIF5) или (P2F5) или его соль получают путем взаимодействия олигонуклеотидного фрагмента формулы (PF5a):



или его соли с реагентом PSI (*т.е.* соединение формулы (1) или (2) или его соль).

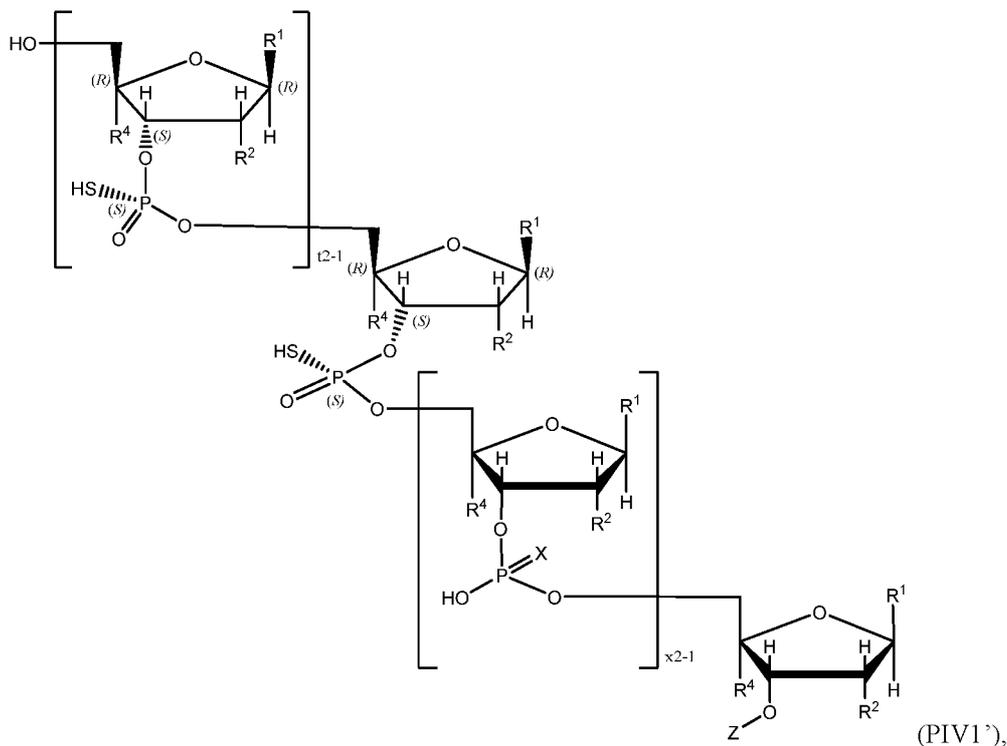
**[0302]** В определенных вариантах реализации олигонуклеотид формулы (PF5a) или его соль получают путем взаимодействия олигонуклеотида формулы (PF5b):

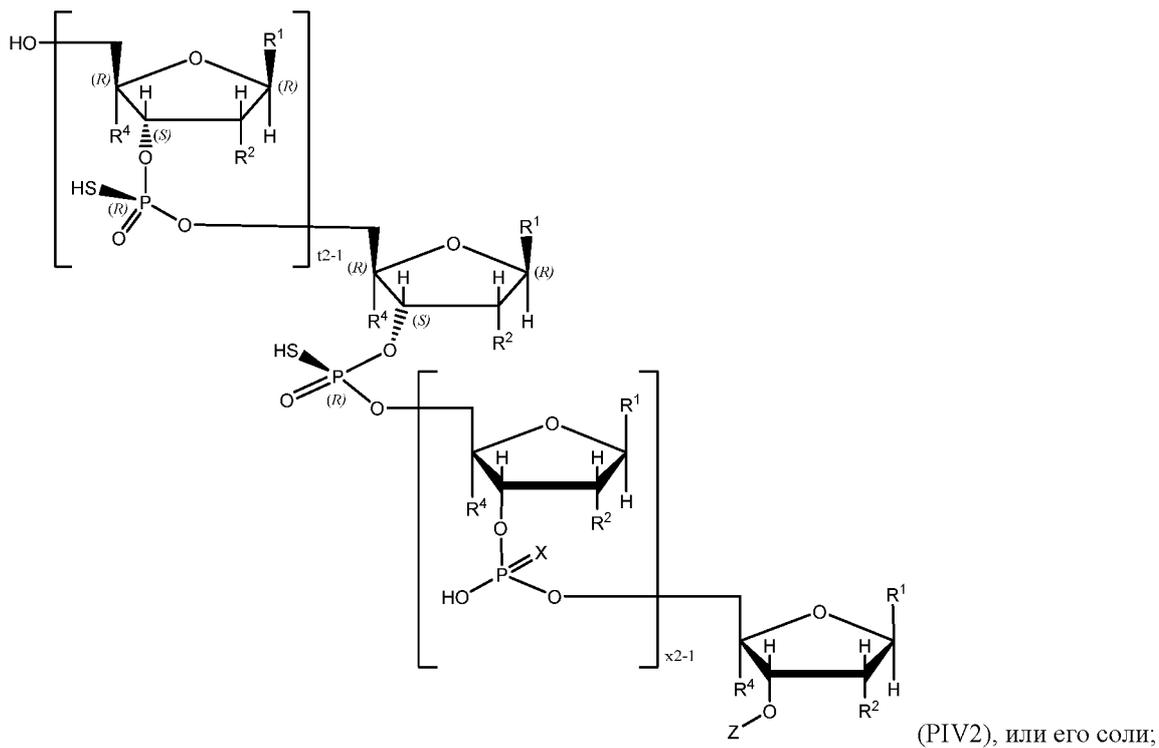


или его соли с основанием, где  $R^{16}$  представляет собой  $CH_2CH_2CN$ . В определенных вариантах реализации основание выбрано из DBU, алкиламина (например, трет-бутиламина, втор-бутиламина, диизопропилэтиламина, триметиламина, триэтиламина, 2-метилпропан-2-амина и т.д.) и других подходящих органических оснований. В конкретном варианте реализации основание представляет собой триэтиламин или 2-метилпропан-2-амин. В другом конкретном варианте реализации основание представляет собой триэтиламин.

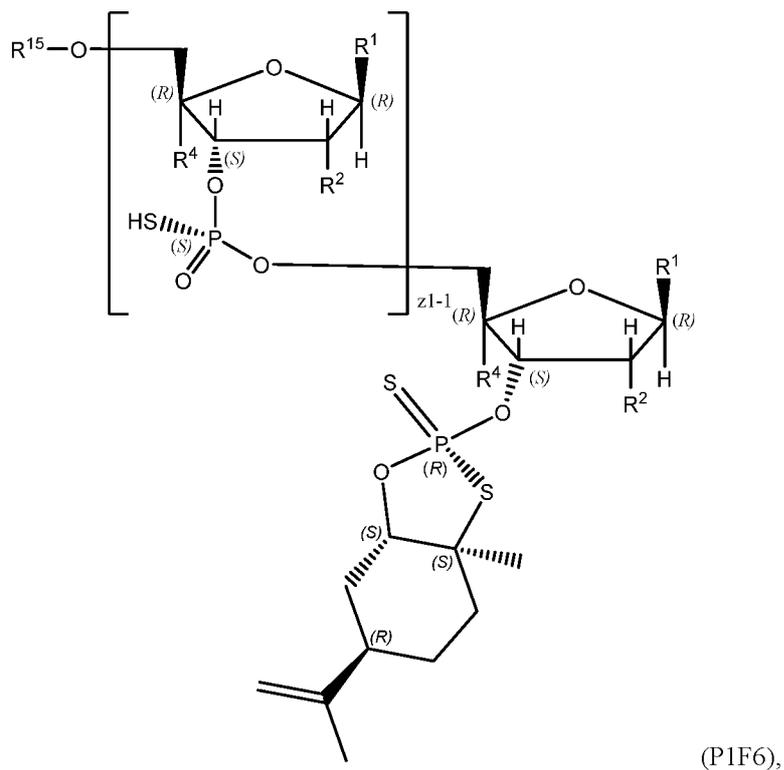
**[0303]** 135<sup>й</sup> вариант реализации раскрывает способ, описанный в 133<sup>м</sup> варианте реализации, при этом способ дополнительно включает стадии:

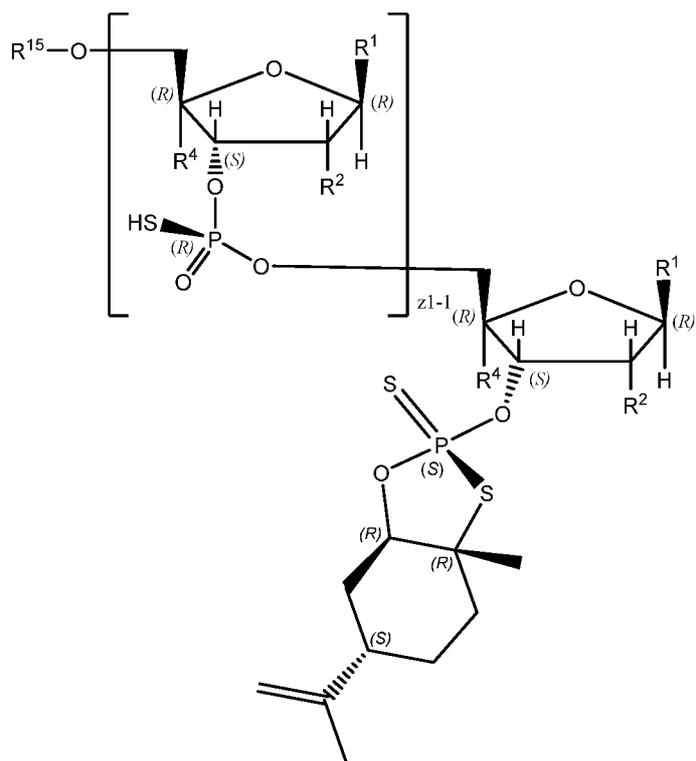
а) снятие защиты с олигонуклеотида формулы (PIV1) или (PIV2) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (PIV1') или (PIV2'):





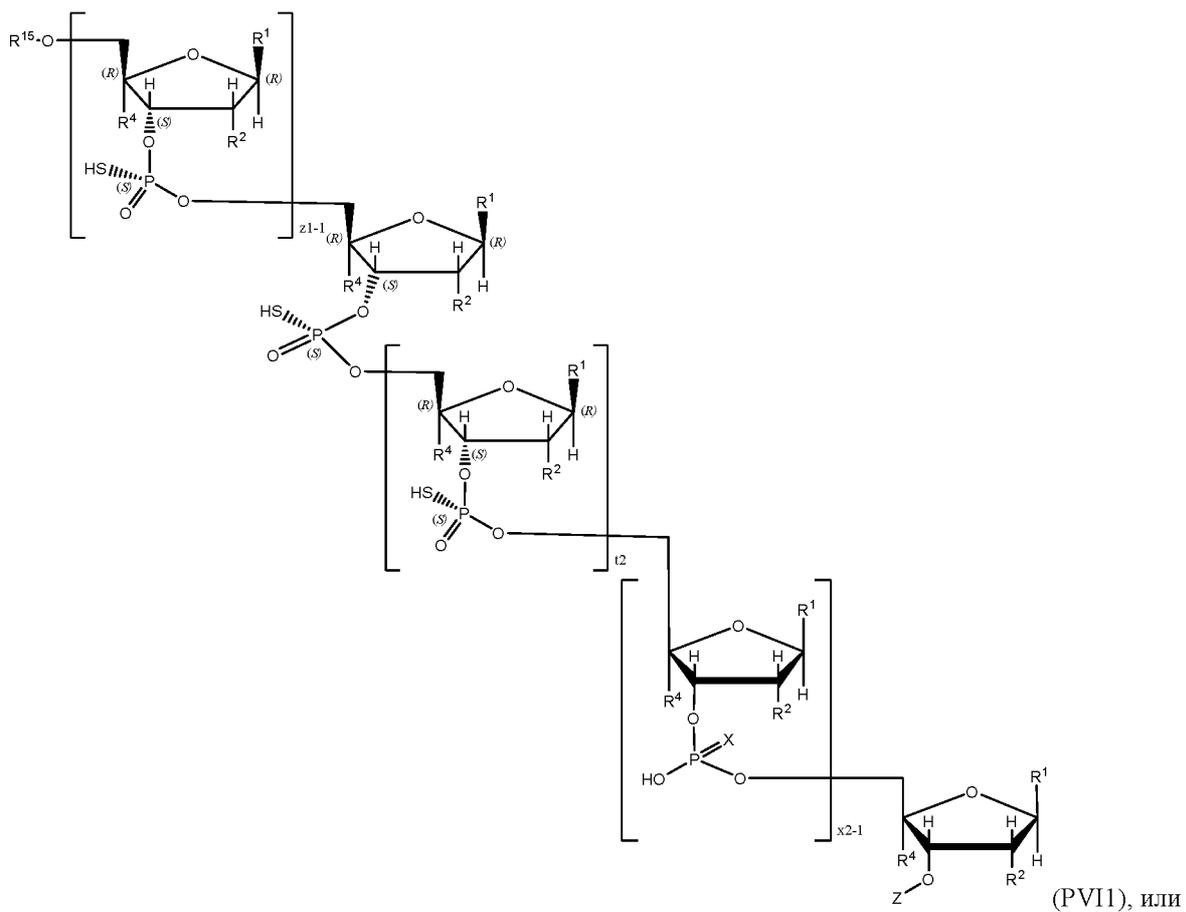
b) связывание олигонуклеотида формулы (PIV1') или (PIV2') или его соли с олигонуклеотидным фрагментом формулы (PIF6) или (P2F6):



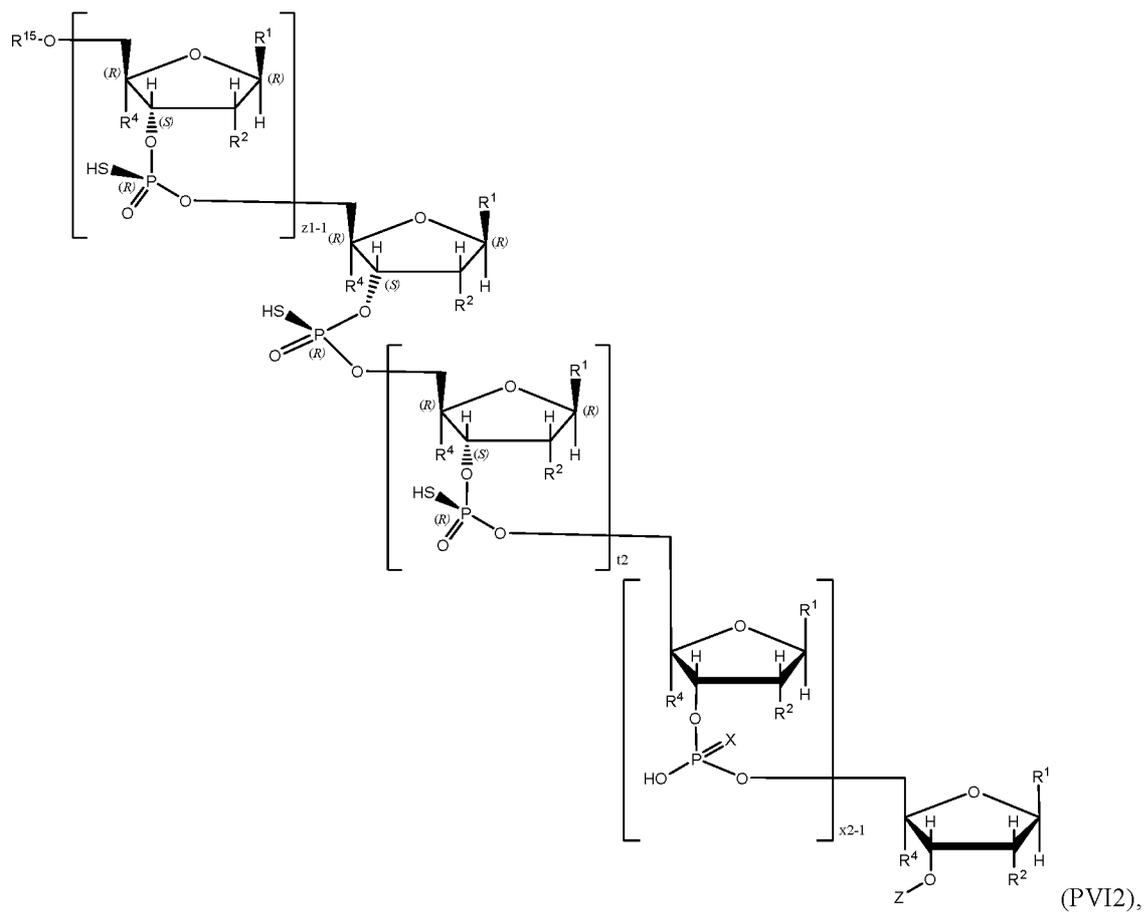


(P2F6), или его соль,

с образованием олигонуклеотида формулы (PVI1) или (PVI2):

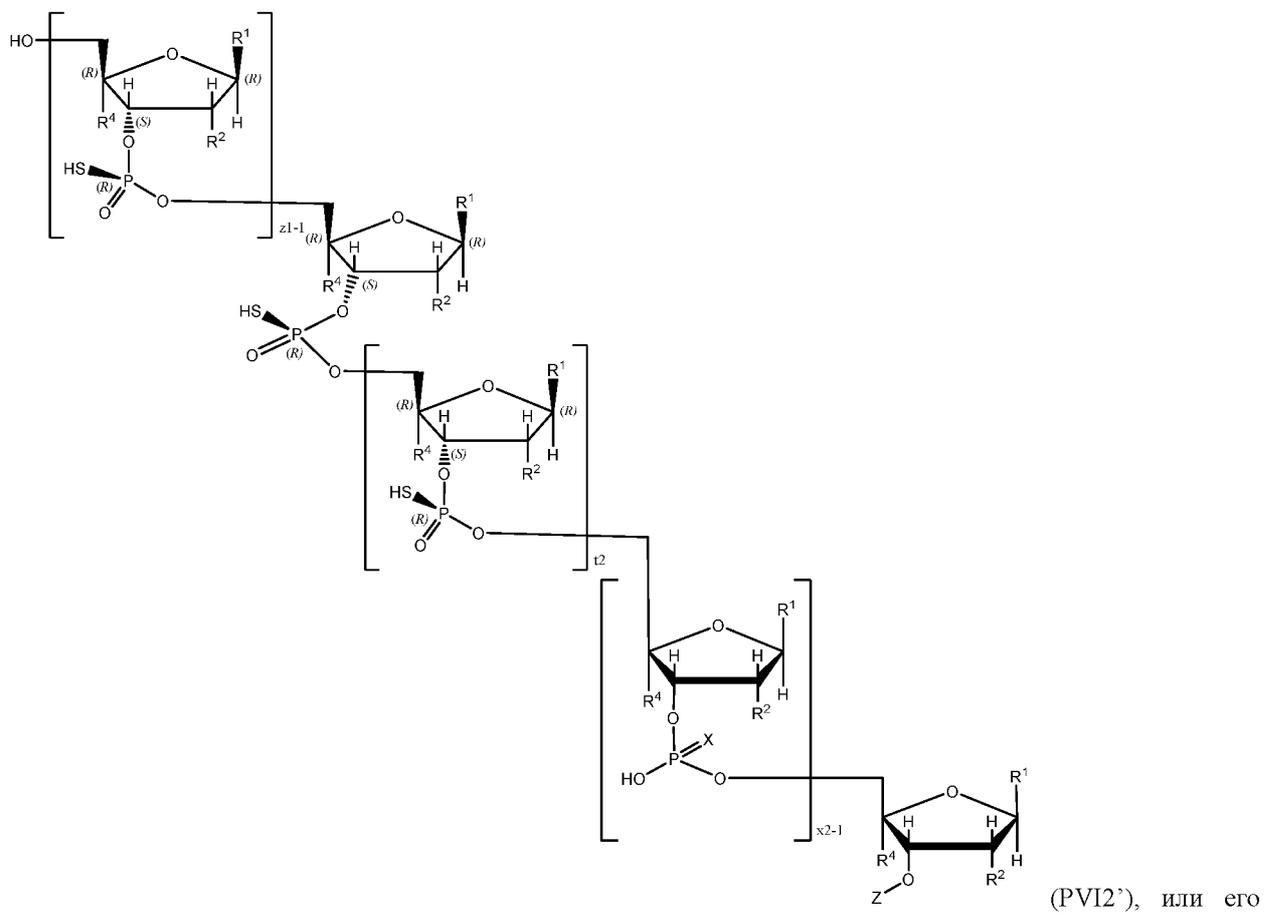
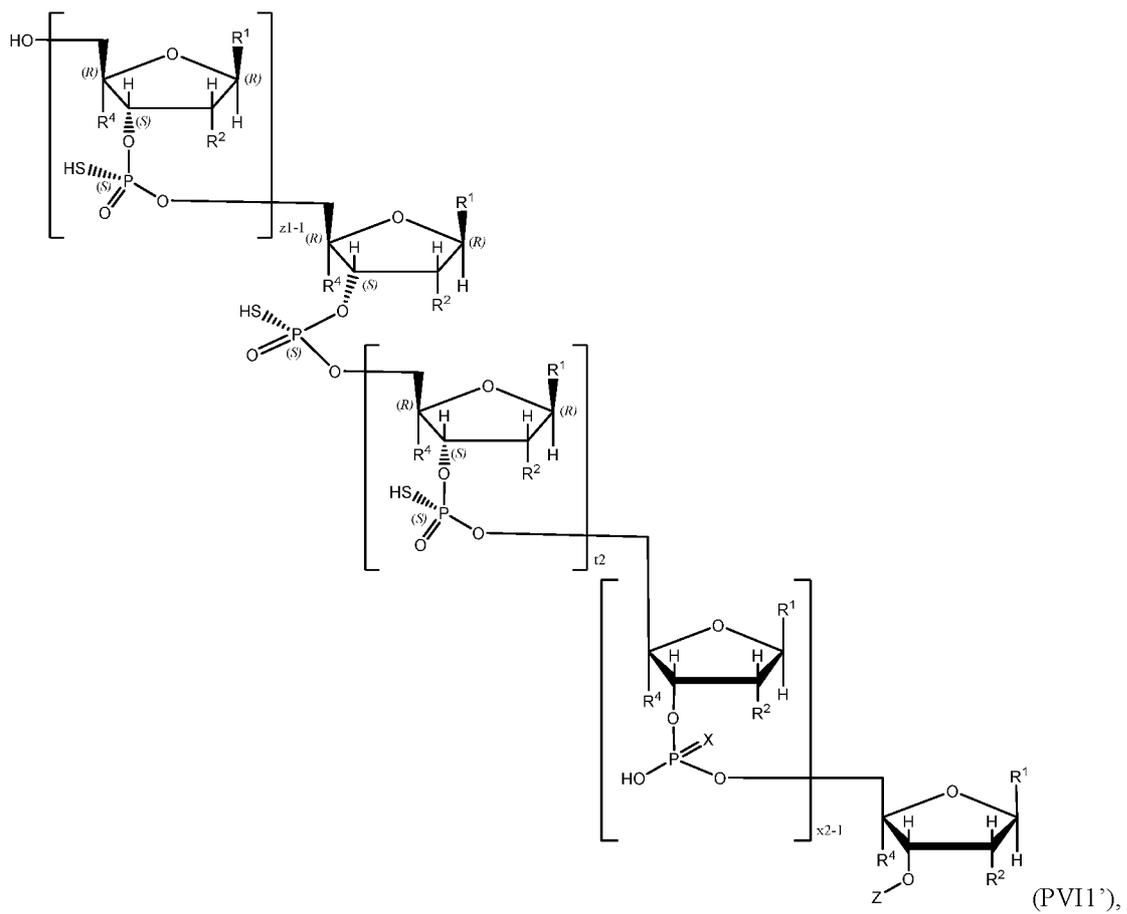


(PVI1), или



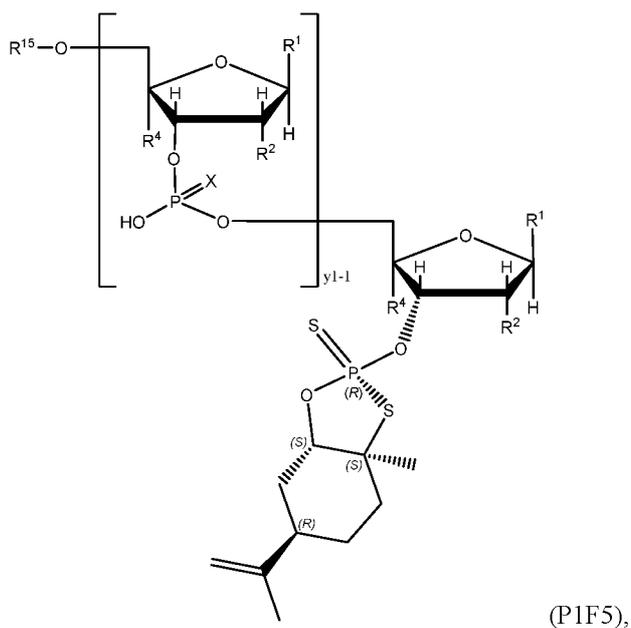
или его соль.

с) снятие защиты с олигонуклеотида формулы (PVI1) или (PIV2) или его соли с образованием олигонуклеотида (PVI1') или (PVI2')

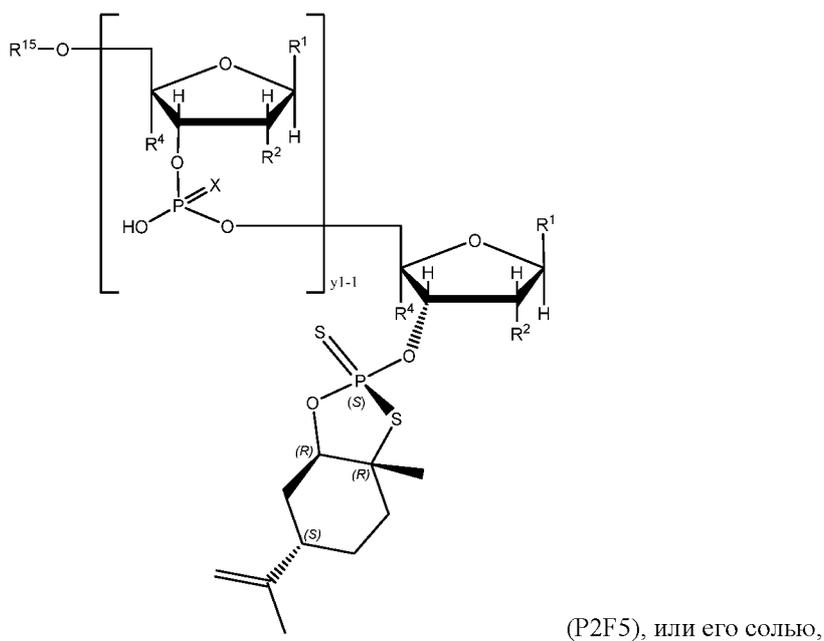


СОЛИ,

с) связывание олигонуклеотида формулы (PVI1') или (PVI2') или его соли с олигонуклеотидным фрагментом формулы (P1F5) или (P2F5):

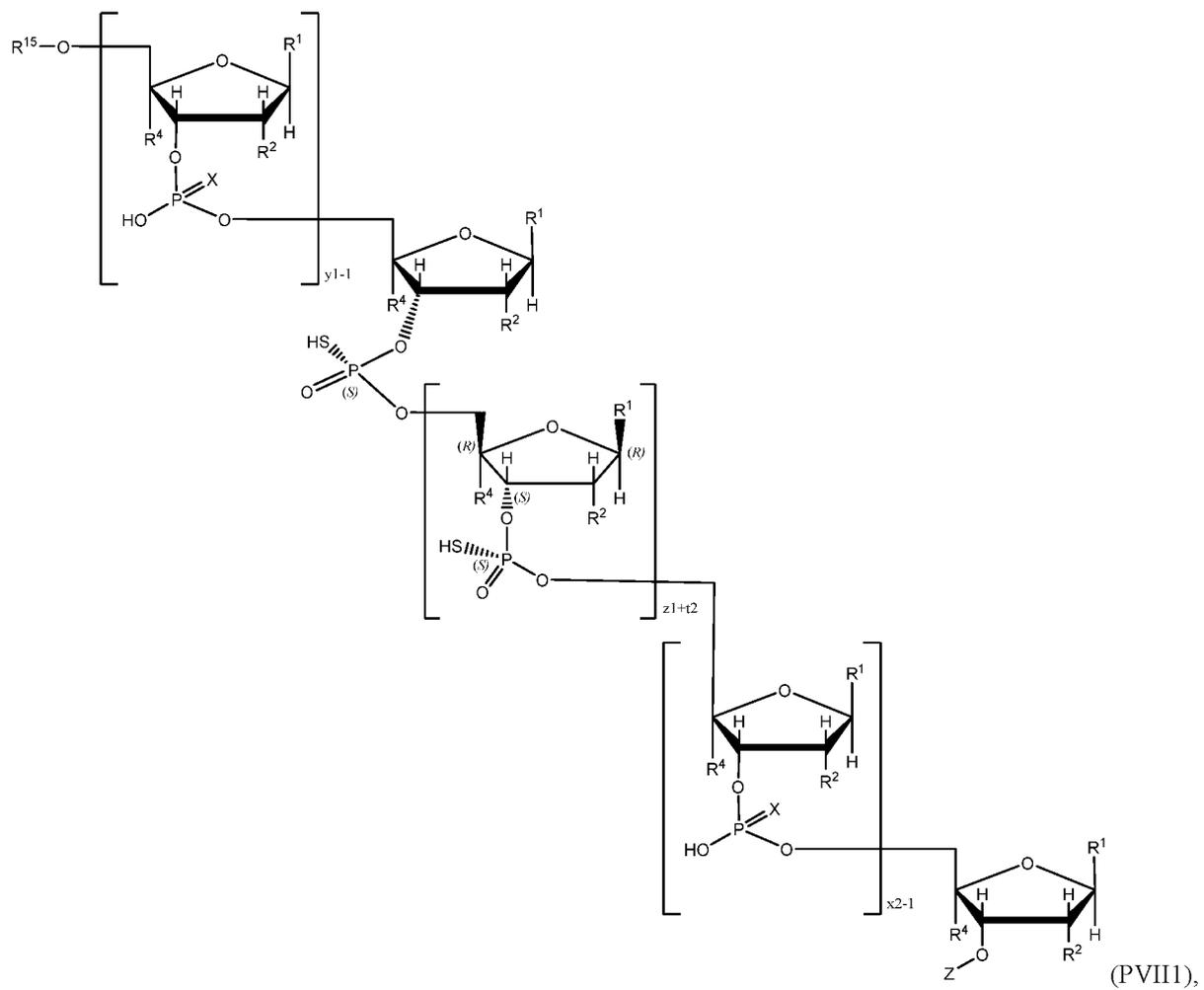


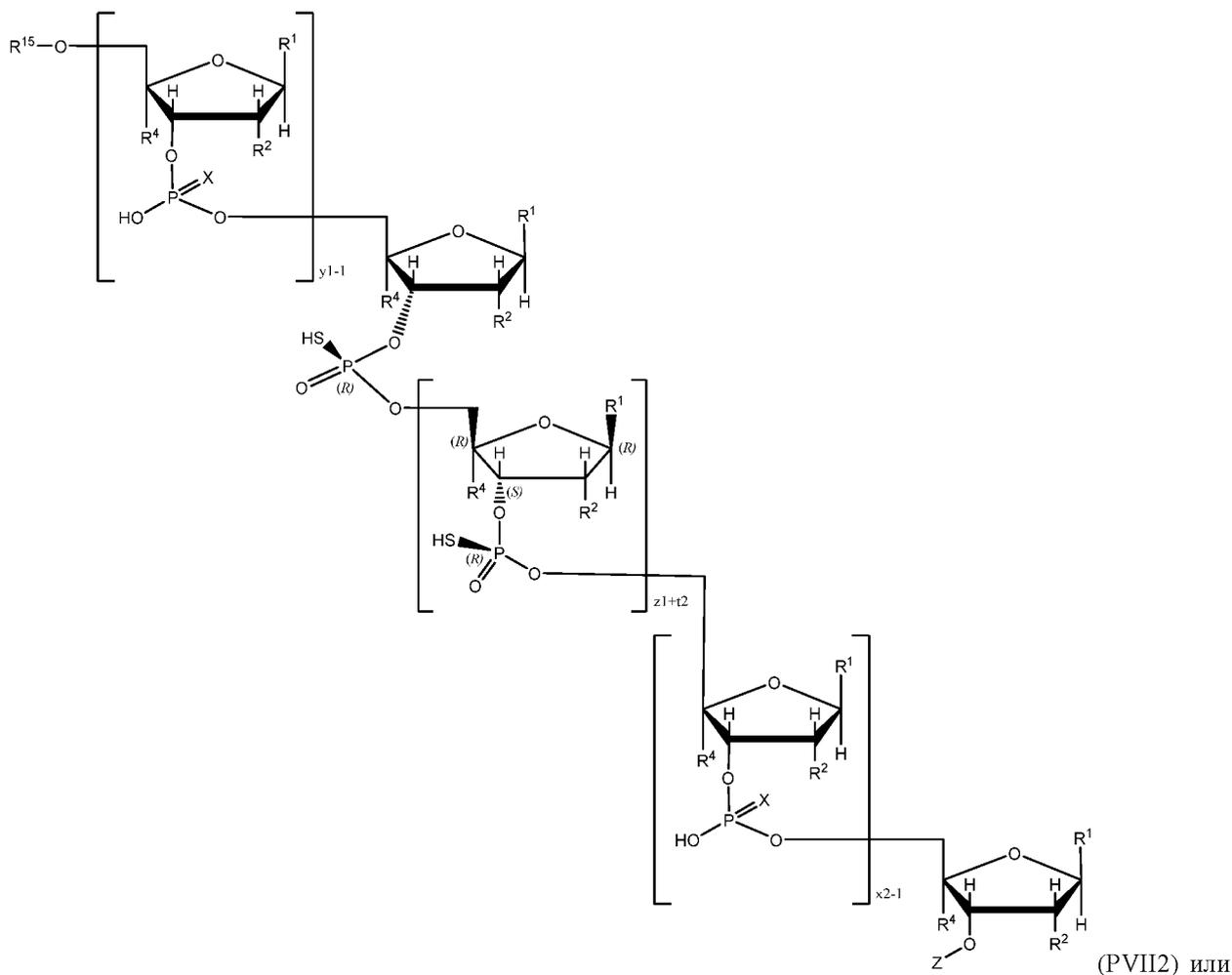
(P1F5),



(P2F5), или его соль,

с образованием олигонуклеотида формулы (PVII1) или (PVII2):





его соль, где  $y_1$  равно целому числу от 3 до 20; а  $z_1$  равно целому числу от 3 до 20.

**[0304]** В частности, олигонуклеотид формулы (PVI1) или его соль образуется путем реакции сочетания олигонуклеотида формулы (PIV1') или его соли с олигонуклеотидным фрагментом формулы (PIF6) или его солью и олигонуклеотид формулы (PVI1) или его соль образуется реакцией сочетания олигонуклеотида формулы (PVI1') или его соли с олигонуклеотидным фрагментом формулы (PIF5) или его солью. Аналогичным образом олигонуклеотид формулы (PVI2) или его соль образуется путем реакции сочетания олигонуклеотида формулы (PIV2') или его соли с олигонуклеотидным фрагментом формулы (PIF6) или его солью и олигонуклеотид формулы (PVI2) или его соль образуется реакцией сочетания олигонуклеотида формулы (PVI2') или его соли с олигонуклеотидным фрагментом формулы (PIF5) или его солью.

**[0305]** В определенных вариантах реализации любой из олигонуклеотидов формул (PIV1'), (PIV2'), (PVI1), (PVI2), (PVI1'), (PVI2'), (PVI1) и (PVI2) или его соли очищается хроматографией.

**[0306]** В определенных вариантах реализации реакцию сочетания, описанную в любом из с 132<sup>то</sup> по 135<sup>ти</sup> вариантов, проводят, как описано в 122<sup>м</sup> или 123<sup>м</sup> вариантах реализации. В конкретном варианте реализации реакцию сочетания проводят в присутствии основания. В другом конкретном варианте реализации реакцию сочетания проводят в присутствии основания и осушающего агента. В еще одном конкретном варианте реализации реакцию сочетания проводят в присутствии DBU и молекулярных сит.

**[0307]** В определенных вариантах реализации реакция снятия защиты, описанная в любом из 132<sup>то</sup> по 135<sup>ти</sup> варианты, проводится, как описано в 124<sup>м</sup> варианте реализации

**[0308]** В определенных вариантах реализации раскрытый в данном документе способ включает получение следующих олигонуклеотидов:

1. ASO 1 (ВИБ 058) (SEQ ID NO: 1), 18-мерный фосфоротиоатный олигонуклеотид, в котором каждый рибонуклеотид включает метоксиэтил (МоЕ) в 2' положении.
2. ASO 2 (ВИБ 067) (SEQ ID NO: 2), 5-10-5 гэммерный фосфотиоэфирный и фосфодиэфирный олигонуклеотид со смешанной основной цепью. Центральный блок гэммера представляет собой 10 дезоксирибонуклеотидов, фланкируемых блоками 2'-МоЕ рибонуклеотидов.
3. Фосфоротиоатные олигонуклеотиды А, В, С, D и Е, как показано в Таблице 2 ниже.
4. ASO 8 (SEQ ID NO: 8), 4-8-6 гэммерный фосфотиоэфирный и смешанный фосфодиэфирный олигонуклеотид основной цепи. Центральный блок гэммера представляет собой 8 дезоксирибонуклеотидов, фланкируемых блоками 2'-МоЕ рибонуклеотидов.

**5' - G<sup>Me</sup>U<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>U<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>U<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>A<sup>Me</sup>T<sup>Me</sup>A<sup>Me</sup>T<sup>Me</sup>A<sup>Me</sup>TC<sup>Me</sup>U<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>G<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>CAA - 3'** (SEQ ID NO:8)

5. ASO 9 (SEQ ID NO:9), 5-8-5 гэммерный фосфотиоэфирный и смешанный фосфодиэфирный олигонуклеотид основной цепи. Центральный блок гэммера представляет собой 8 дезоксирибонуклеотидов, фланкируемых блоками 2'-МоЕ рибонуклеотидов.

**5'-C<sup>Me</sup>C<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>GUUT<sup>Me</sup>T<sup>Me</sup>CTT<sup>Me</sup>CA<sup>Me</sup>CA<sup>Me</sup>C<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>CCU-3'** (SEQ ID NO:9)

**5'<sup>Me</sup>C<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>C<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>G<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>UUP=O<sup>Me</sup>TP=O<sup>Me</sup>TP=O<sup>Me</sup>C<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>TP=O<sup>Me</sup>TP=O<sup>Me</sup>A<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>C<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>C<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>A<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>C<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>C<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>C<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>U-3'** (ASO 9-1)

**5'-<sup>Me</sup>C<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>C<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>G<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>UUT<sup>Me</sup>CTP=O<sup>Me</sup>TP=O<sup>Me</sup>A<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>C<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>C<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>A<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>C<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>C<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>C<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>U-3'** (ASO 9-2)

где: **подчеркнуть:** МОЕ рибонуклеотид

**P=O:** фосфодиэфир

**любые другие:** фосфотиоэфир

Таблица 1. Фосфоротиоатные олигонуклеотиды А, В, С, D и Е

Код	Тип последовательности	Олигонуклеотидная последовательность с модифицированными основаниями
<b>A</b>	Полностью ДНК-последовательность	<sup>Me</sup> CGA <sup>Me</sup> CT ATA <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CAA TATGG ASO 3 (SEQ ID NO: 3)
<b>B</b>	5-10-5 гэммер Центральный блок гэммера представляет собой 10 дезоксирибонуклеотидов, фланкируемых блоками 2'-ОМе рибонуклеотидов.	<sup>Me</sup> CGA <sup>Me</sup> CU ATA <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CAA UAUGG ASO 4 (SEQ ID NO: 4)
<b>C</b>	5-10-5 гэммер Центральный блок гэммера представляет собой 10 дезоксирибонуклеотидов, фланкируемых блоками 2'-МоЕ рибонуклеотидов.	<sup>Me</sup> CGA <sup>Me</sup> CT ATA <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CAA TATGG ASO 5 (SEQ ID NO: 5)
<b>D</b>	5-10-5 гэммер Центральный блок гэммера представляет собой 10	<sup>Me</sup> CGA <sup>Me</sup> CU ATA <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CAA UAUGG ASO 6 (SEQ ID NO: 6)

	дезоксирибонуклеотидов, фланкируемых блоками сEt рибонуклеотидов.	
E	5-10-5 гэлмер Центральный блок гэлмера представляет собой 10 дезоксирибонуклеотидов, фланкируемых блоками 2'-фтор рибонуклеотидов.	CGACU ATA <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CAA UAUGG ASO 7 (SEQ ID NO: 7)

**[0309]** В определенных вариантах реализации целевой антисмысловой олигонуклеотид представляет собой фосфоротиоатный олигонуклеотид, имеющий последовательность (от 5 'до 3')

TCACTTTCATAATGCTGG (SEQ ID NO: 1),

где каждая межукулеозидная связь олигонуклеотида представляет собой фосфоротиоатную связь, каждый нуклеозид олигонуклеотида представляет собой 2'-О-метоксиэтил (МОЕ) нуклеозид, и каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин. SEQ ID NO:1 также известна как ВПВ058 и описана в WO2007/002390, WO2010/148249 и US 8 980 853, содержание каждой из которых включено в данный документ в качестве ссылки.

**[0310]** В определенных вариантах реализации последовательность антисмыслового олигонуклеотида представляет собой гэлмер 5-10-5 МОЕ, имеющий последовательность (от 5 'до 3')

CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 2),

где каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой нуклеозиды, модифицированные 2'-О-метоксиэтилрибозой, и каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозиды, причем межукулеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16 до 17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи и межукулеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфоротиоатные связи, и каждый цитозин представляет собой 5'-метилцитозин. SEQ ID NO:2 описывается следующей химической записью: mCes Aeо Ges Geo Aes Tds Ads mCds Ads Tds Tds Tds mCds Tds Ads mCeо Aes Geo mCes Te; где

A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин

G = гуанин,

T = тимин,

e = сахар, модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозой,

d = сахар 2'-дезоксирибозы,

s = фосфоротиоатная межукулеозидная связь, и

o = фосфодиэфирная межукулеозидная связь.

SEQ ID NO: 2 известна как ВПВ067 или ISIS 666853 и описана в WO2015153800, идеи которой включены в данный документ посредством ссылки.

**[0311]** В определенных вариантах реализации способ является таким, как описано в любом из вышеупомянутых вариантов реализации или в любом из их аспектов, где антисмысловый олигонуклеотид представляет собой гэлмер 4-8-6, имеющий последовательность (от 5 'до 3') :

GUUUUCATCAATATCUGCAA (SEQ ID NO: 8)

где каждый из нуклеозидов 1-4 и 13-18 представляет собой нуклеозиды, модифицированные 2'-О-метоксиэтилрибозой, и каждый из нуклеозидов 5-12 представляет собой 2'-дезоксирибонуклеотиды, при этом межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 3-4, 13 по 14, с 14 по 15 и с 15 по 16 представляют собой фосфодиэфирные связи и межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 4-5, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 16-17 и 17-18 представляют собой фосфоротиоатные связи, где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин, а урацил представляет собой 5-метилурацил. SEQ ID NO: 8 описывается следующей химической записью:

**5' - G<sup>Me</sup>U<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>U<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>U<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>CAT<sup>Me</sup>CAATATC<sup>Me</sup>U<sub>P=O</sub>G<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>CAA - 3'**

Подчеркнутый = рибонуклеотид МоЕ

G = гуанин,

<sup>Me</sup>C = 5-метилцитозин

T = тимин,

A = аденин,

<sup>Me</sup>U = 5-метилурацил (также известный как тимин)

P=O = фосфодиэфирная межнуклеозидная связь.

Любые другие межнуклеозидные связи представляют собой фосфотиоэфирные связи.

**[0312]** В определенных вариантах реализации способ является таким, как описано в любом из вышеупомянутых вариантов реализации или в любом из их аспектов, где антисмысловой олигонуклеотид представляет собой гэмпер 5-8-5 (ASO 9), имеющий последовательность (от 5' до 3') :

CCGUUTTCTTACCACCCU (SEQ ID NO: 9)

где каждый из нуклеозидов 1-5 и 14-18 представляет собой нуклеозиды, модифицированные 2'-О-метоксиэтилрибозой, и каждый из нуклеозидов 6-13 представляет собой 2'-дезоксирибонуклеотиды, при этом межнуклеозидные связи между нуклеозидами с 3 по 4 и с 16 по 17 представляют собой фосфодиэфирные связи и межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 2-3, 4-5, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16 и 17-18 представляют собой фосфоротиоатные связи, где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин, а урацил представляет собой 5-метилурацил.

SEQ ID NO: 9 описывается следующей химической записью:

**5' - C<sup>Me</sup>C<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>UTT<sup>Me</sup>CTT<sup>Me</sup>CTT<sup>Me</sup>CA<sup>Me</sup>CA<sub>P=O</sub><sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>CAA - 3'** (SEQ ID NO:9)

Подчеркнутый = рибонуклеотид МоЕ

G = гуанин,

<sup>Me</sup>C = 5-метилцитозин

T = тимин,

A = аденин,

<sup>Me</sup>U = 5-метилурацил (также известный как тимин)

P=O = фосфодиэфирная межнуклеозидная связь.

**[0313]** В определенных вариантах реализации ASO 9 получали используя конвергентного жидкофазного способа синтеза олигонуклеотидов согласно данному раскрытию следующим образом:

**[0314]** В определенных вариантах реализации ASO 9 получали используя конвергентного жидкофазного способа синтеза олигонуклеотидов согласно данному раскрытию. В определенных вариантах реализации способ включает добавление фосфорамидита к 3'-гидроксилу для фрагмента MTtO-T<sub>s</sub>T<sub>s</sub>A<sub>s</sub>C<sub>s</sub>C<sub>s</sub>-OH с образованием фрагмента MTtO-T<sub>s</sub>T<sub>s</sub>A<sub>s</sub>C<sub>s</sub>C<sub>s</sub>-OP. Фрагмент DMTrO-T<sub>s</sub>T<sub>s</sub>A<sub>s</sub>C<sub>s</sub>C<sub>s</sub>-OP соединяется с HO-

$A_sC_oC_sC_sU$ -LHPG с последующей сульфуризацией с образованием  $DMTrO-T_sT_sA_sC_sC_sA_sC_oC_sC_sU$ -LHPG. Этот ДМТ-защищенный фрагмент подвергается снятию 5'-гидроксильной защиты (детритилированию) с образованием  $HO-T_sT_sA_sC_sC_sA_sC_oC_sC_sU$ -LHPG, который дополнительно соединяется с фосфорамидитным фрагментом  $DMTrO-U_sT_sT_sC-OP$  (синтезирован методом, аналогичным синтезу  $DMTrO-T_sT_sA_sC_sC_s-OP$ , как описано выше) с последующей сульфуризацией с получением  $DMTrO-U_sT_sT_sC_sT_sT_sA_sC_sC_sA_sC_oC_sC_sU$ -LHPG. Этот ДМТ-защищенный фрагмент подвергается снятию 5'-гидроксильной защиты (детритилированию) с образованием  $HO-U_sT_sT_sC_sT_sT_sA_sC_sC_sA_sC_oC_sC_sU$ -LHPG, который соединен с  $DMTrO-C_sC_oG_sU-OP$  (синтезирован методом, аналогичным синтезу  $DMTrO-T_sT_sA_sC_sC_s-OP$ , как описано выше) с последующей сульфуризацией для получения  $DMTrO-C_sC_oG_sUsU_sT_sT_sC_sT_sT_sA_sC_sC_sA_sC_oC_sC_sU$ -LHPG (полностью защищенный ASO 9). В некоторых вариантах реализации фрагмент  $HO-A_sC_oC_sC_sU$ -LHPG может быть получен путем связывания  $HO-U$ -LHPG с  $DMTrOA_sC_oC_sCP$  с последующей сульфуризацией и снятием защиты с 5'-гидроксила (детритилирование). Фрагмент  $DMTrOA_sC_oC_sCP$  может быть получен добавлением фосфорамидита к 3'-гидроксилу фрагмента  $DMTrOA_sC_oC_sC-OH$ . В данном контексте O представляет собой фосфодиэфирную связь, а s представляет собой фосфотиолатную связь.

## ПРИВЕДЕНИЕ ПРИМЕРА

### Сокращенное название

ACN ацетонитрил

DBU = 8-диазабицикло [5.4. 0] ундец-7-ен

DCA =  $CHCl_2COOH$  или дихлоруксусная кислота

DCM = дихлорметан

DDTT = 3-(N,N-диметиламинометилен)амино)-3H-1,2,4-дитиазол

DCI = 4,5-дицианоимидазол DI =

DIEA = N,N-диизопропилэтиламин

DMT или DMTr = 4,4'-диметокситритил или бис-(4-метоксифенил) фенилметил

DMSO = диметилсульфоксид

EtOAc или EA = этилацетат

ETT = 5-этилтио-1H-тетразол

h или hr = час

HBTU = 3-[бис(диметиламино)метилюмил]-3H-бензотриазол-1-оксид гексафторфосфат.

HOBT = гидроксibenзотриазол

imid = имидазол

iPrOH = изопропиловый спирт

MOE = метоксиэтил

MC = молекулярное сито

MTBE или TBME = метил трет-бутиловый эфир

Pu = пиридин

RT = время удерживания

TBAF = фторид тетра-н-бутиламония

TBuAA = ацетат трибутиламина

TBDPSCl = трет-бутил (хлор) дифенилсилан

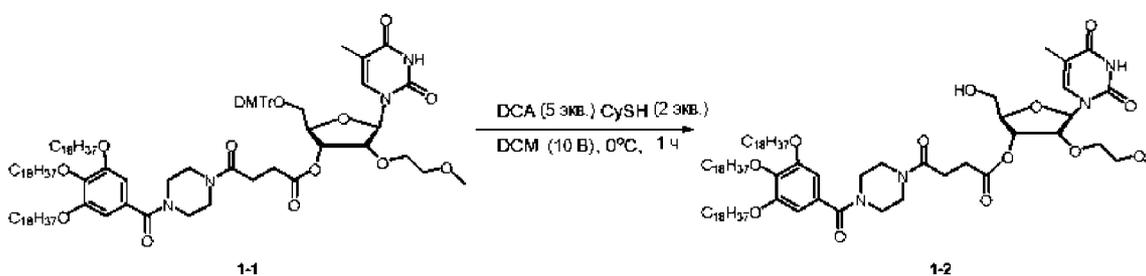
ТСА = трихлоруксусная кислота  
 ТЕА = триэтиламин  
 ТЕАВ = бромид тетраэтиламония  
 ТФУ = трифторуксусная кислота  
 ТГФ = тетрагидрофуран

**Пример 1. Синтез ASO 9.**

**А. Получение 3'-Фрагмента**

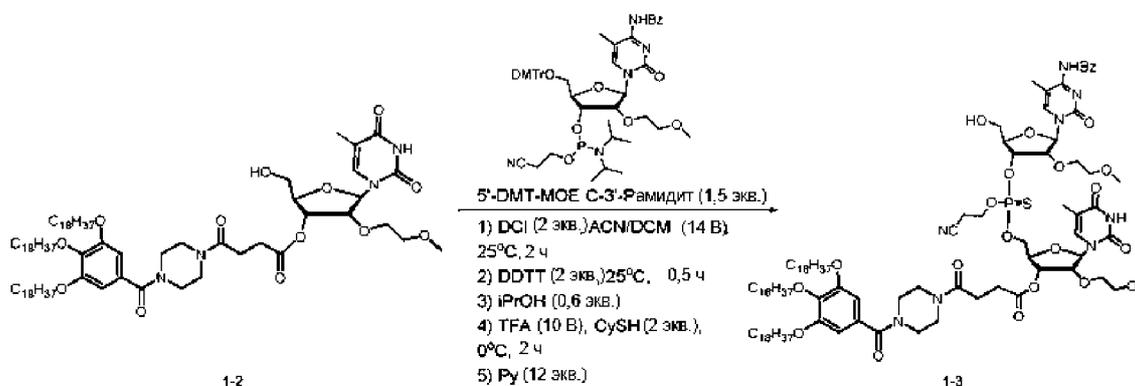
**1. Синтез 5'-ОН-АСССВ-ЛНРГ фрагмента (Фрагмент 1)**

**Общая методика получения соединения 1-2.**



**[0315]** К раствору соединения **1-1** (176 г, 103 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (1800 мл) добавляли DCA (66,8 г, 518 ммоль, 42,6 мл, 5,00 экв.) и CuSH (24,1 г, 207 ммоль, 25,3 мл, 2,00 экв.) при 0°C. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч. ТСХ (дихлорметан: этилацетат: метанол = 10:10:1, Rf продукта = 0,43) показала, что соединение **1-1** полностью израсходовалось и образовалось одно новое пятно. Согласно ТСХ, реакция была селективной. Реакционную смесь гасили добавлением NaHCO<sub>3</sub> (2,50%, 2000 мл) и собирали слой дихлорметана (ДХМ). Безводный ацетонитрил (ACN) (5000 мл, 30,0 Об) медленно добавляли при 25° для осаждения продукта. Соединение **1-2** (144 г, 103 ммоль, выход 99,5%) получали в виде белого твердого вещества.

**Общая методика получения соединения 1-3.**



**[0316]** Соединение **1-2** (125 г, 89,6 ммоль, 1,00 экв.) и **5'-DMT-MOE C-3'-P амидит** (124 г, 134 ммоль, 1,50 экв.) упаривали совместно с ACN (300 мл) и ДХМ (700 мл).

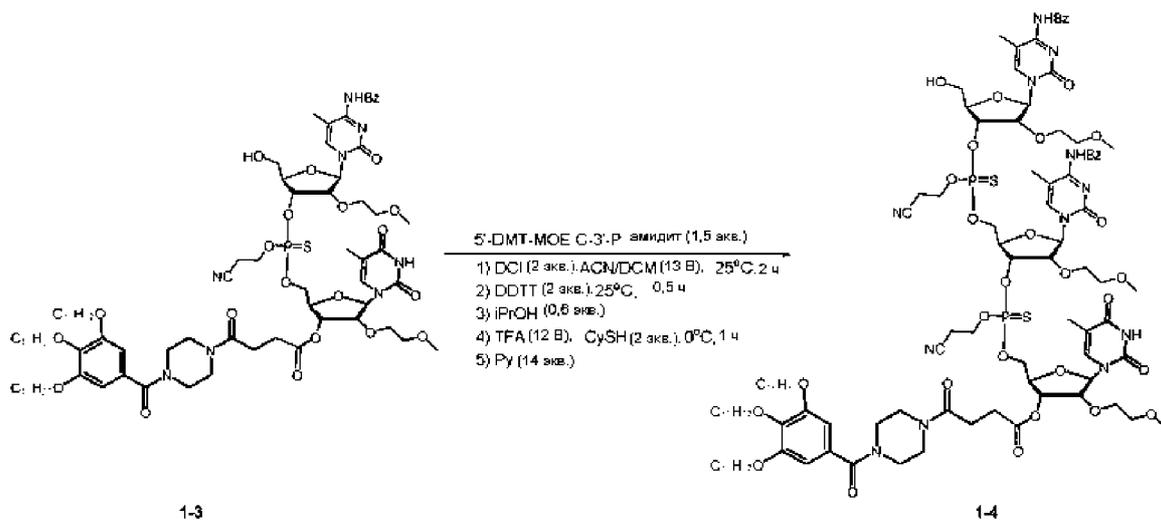
К раствору соединения **1-2** (125 г, 89,6 ммоль, 1,00 экв.) и 5'-DMT-МОЕ С-3'-Р амидита (124 г, 134 ммоль, 1,50 экв.) в ДХМ/АСН = 3: 1 (1800 мл) добавляли молекулярное сито 3А (54,0 г). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч. В смесь добавляли DCI (21,1 г, 179 ммоль, 2,00 экв.) Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч. ТСХ (дихлорметан: этилацетат: метанол = 10:10:1, Rf продукта = 0,55) показала, что соединение **1-2** полностью израсходовалось и образовалось одно новое пятно. Согласно ТСХ, реакция была селективной.

**[0317]** В смесь добавляли DDTT (36,7 г, 178 ммоль, 2,00 экв.) и пропан-2-ол (3,22 г, 53,6 ммоль, 4,11 мл, 0,600 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 ч. ТСХ (дихлорметан: этилацетат: метанол = 10:10:1, Rf продукта = 0,55) показала образование одного нового пятна. Согласно ТСХ, реакция была селективной.

**[0318]** В смесь добавляли CuSH (20,6 г, 178 ммоль, 21,7 мл, 2,00 экв.) и ТФУ (101 г, 890 ммоль, 65,9 мл, 10,0 экв.) при 0°C. Смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч. ТСХ (дихлорметан: этилацетат: метанол = 10:10:1, Rf продукта = 0,51) показала образование одного нового пятна. Согласно ТСХ, реакция была селективной.

**[0319]** К смеси добавляли пиридин (Py) (84,4 г, 1,07 моль, 86,2 мл, 12,0 экв.). Молекулярные сита удаляли фильтрованием и твердый осадок промывали ДХМ (500 мл). Значение pH реакционной смеси довели до 6-7 с помощью 2,5% водного NaHCO<sub>3</sub> (1000 мл). Объединенные органические слои сушили над Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и упаривали. Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ (450 мл) и по каплям прикапывали в АСН (4000 мл, 30,0 В) при интенсивном перемешивании. Желаемый продукт выпадал в осадок. Соединение **1-3** (173 г, 88,9 ммоль, выход 99,9%) получали в виде белого твердого вещества

#### Общая методика получения соединения 1-4.



**[0320]** Соединение **1-3** (123 г, 63,2 ммоль, 1 экв.) и 5'-DMT-МОЕ С-3'-Р амидит (87,4 г, 94,8 ммоль, 1,50 экв.) упаривали совместно с АСН (500 мл) и ДХМ (1500 мл).

К раствору соединения **1-3** (123 г, 63,2 ммоль, 1,00 экв.) и 5'-DMT-МОЕ С-3'-Р амидита (87,4 г, 94,8 ммоль, 1,50 экв.) в ДХМ/АСН = 3:1 (1600 мл) добавляли молекулярное сито 3А (48,0 г). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч. В смесь добавляли DCI. (14,9 г, 126 ммоль, 2,00 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч. ТСХ (дихлорметан: этилацетат: метанол = 10:10:1, Rf продукта = 0,64) показала, что соединение **1-3** полностью израсходовалось и образовалось одно новое пятно. Согласно ТСХ, реакция была селективной.

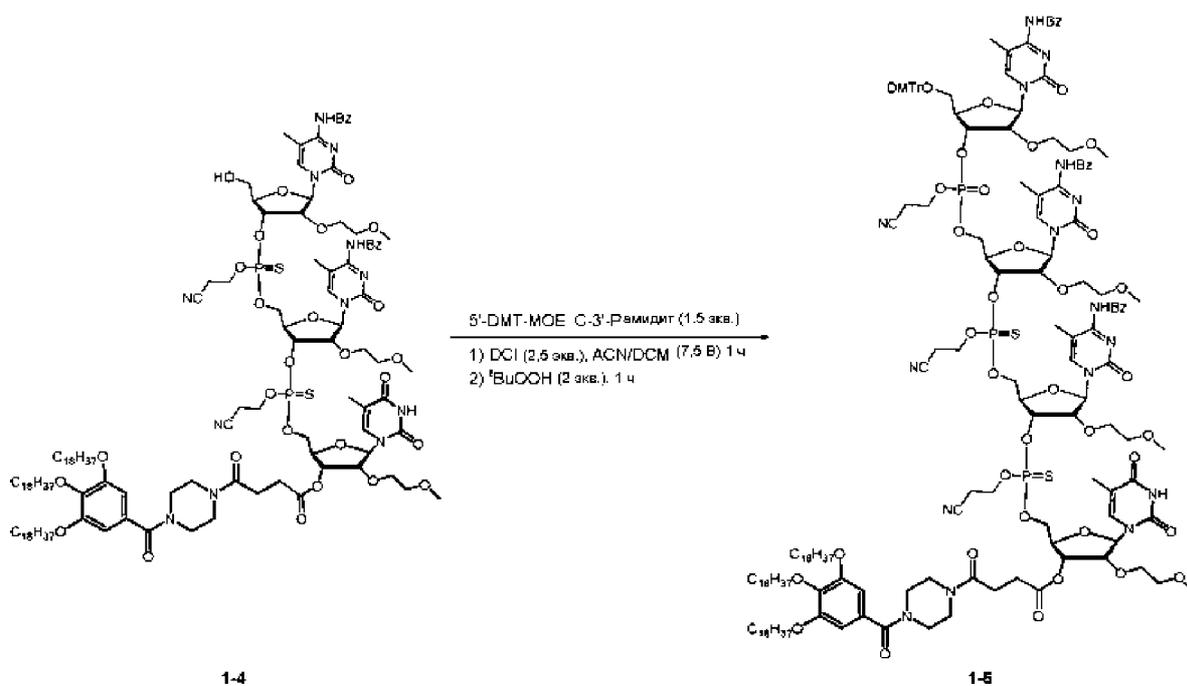
**[0321]** К смеси добавляли DDTT (25,9 г, 126 ммоль, 2,00 экв.) Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 ч. В смесь добавляли пропан-2-ол (2,28 г, 37,95 ммоль, 2,91 мл, 0,6 экв.) при 25°C. ТСХ (дихлорметан:

этилацетат: метанол = 10:10:1, Rf продукта = 0,68) показала образование одного нового пятна. Согласно ТСХ, реакция была селективной.

**[0322]** К смеси добавляли трифторуксусную кислоту (ТФУ) (86,5 г, 758 ммоль, 56,1 мл, 12,0 экв.) и  $\text{CuSH}$  (14,7 г, 126 ммоль, 15,4 мл, 2,00 экв.) при  $0^\circ\text{C}$ . Смесь перемешивали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 1 ч. ТСХ (дихлорметан: этилацетат: метанол = 10:10:1, Rf продукта = 0,56) показала образование одного нового пятна. Согласно ТСХ, реакция была селективной.

**[0323]** К смеси добавляли  $\text{Pu}$  (70,03 г, 885,31 ммоль, 71,46 мл, 14 экв.). Молекулярные сита удаляли фильтрованием и твердый осадок промывали ДХМ (1000 мл). Значение pH реакционной смеси довели до 6-7 с помощью 2,5% водного  $\text{NaHCO}_3$  (2000 мл). Объединенные органические слои сушили над  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$ . Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ (600 мл) и по каплям прикапывали в  $\text{ACN}$  (5000 мл, 30 V) при интенсивном перемешивании. Желаемый продукт выпадал в осадок. Соединение **1-4** (143 г, 57,31 ммоль, выход 90,63%) получали в виде белого твердого вещества

#### Общая методика получения соединения 1-5.



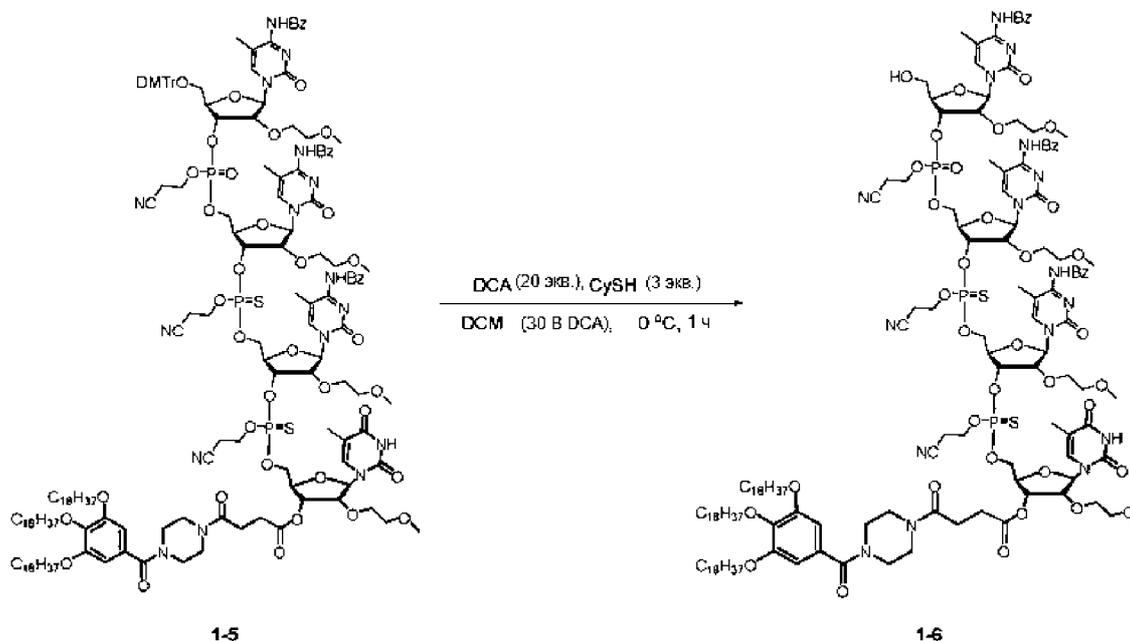
**[0324]** Соединение **1-4** (290 г, 116 ммоль, 1,00 экв.) и **5'-DMT-MOE C-3'-P амидит** (160 г, 174 ммоль, 1,50 экв.) упаривали совместно с  $\text{ACN}$  (500 мл) и ДХМ (1500 мл).

К раствору соединения **1-4** (290 г, 116,23 ммоль, 1 экв.) и **5'-DMT-MOE C-3'-P амидита** (160 г, 174 ммоль, 1,50 экв.) в ДХМ/ $\text{ACN}$  = 3:1 (2300 мл) добавляли молекулярное сито 3Å (69,0 г). Смесь перемешивали при  $25^\circ\text{C}$  в течение 1 ч. В смесь добавляли  $\text{DCl}$  (34,3 г, 290 ммоль, 2,50 экв.). Смесь перемешивали при  $25^\circ\text{C}$  в течение 1 ч. ТСХ (дихлорметан: этилацетат: метанол = 10:10:1, Rf продукта = 0,70) показала, что соединение **1-4** полностью израсходовалось и образовалось одно новое пятно. Согласно ТСХ, реакция была селективной.

**[0325]** К смеси добавляли  $t\text{-BuOOH}$  ( $\text{H}_2\text{O}$ , 31,8 мл, чистота 70,0%, 2,00 экв.), и полученную смесь перемешивали при  $25^\circ\text{C}$  в течение 1 часа. ТСХ (дихлорметан: этилацетат: метанол = 10:10:1, Rf продукта = 0,72) показала образование одного нового пятна. Согласно ТСХ, реакция была селективной. Молекулярные

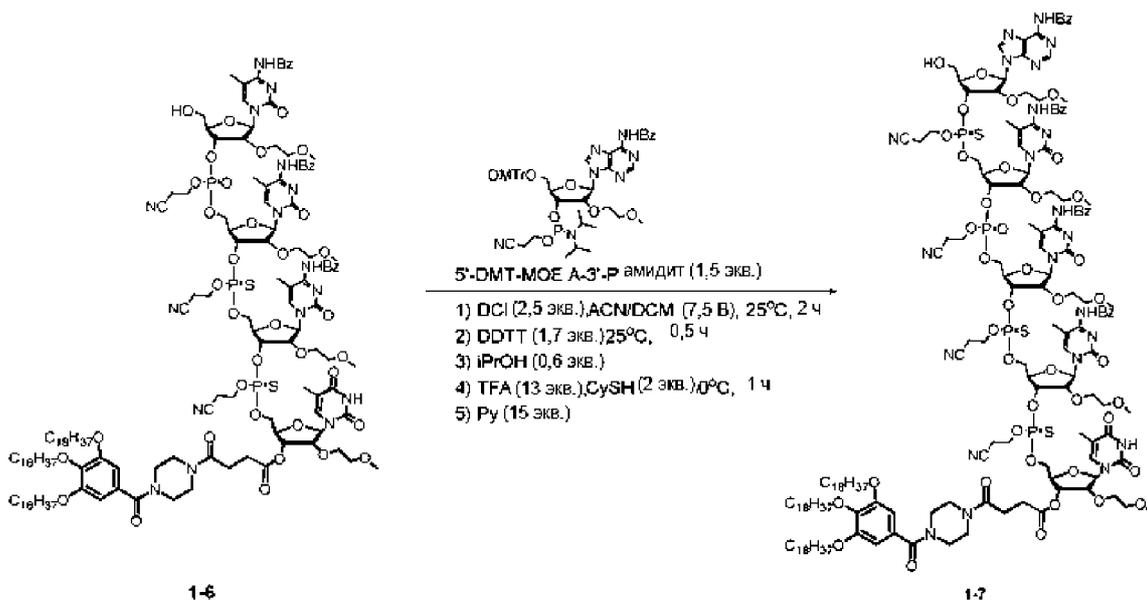
сита удаляли фильтрованием и твердый осадок промывали ДХМ (1000 мл). Неочищенный продукт по каплям добавляли в АСН (9000 мл, 30,0 V) при интенсивном перемешивании. Желаемый продукт выпадал в осадок. Соединение **1-5** (386 г, 116 ммоль, выход 99,8%) получали в виде белого твердого вещества.

**Общая методика получения соединения 1-6.**



**[0326]** К раствору соединения **1-5** (386 г, 115 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (5700 мл) добавляли CySH (40,3 г, 347 ммоль, 42,5 мл, 3,00 экв.) и дихлоруксусную кислоту (DCA) (298 г, 2,32 моль, 190 мл, 20,0 экв.) при 0°C. Смесь перемешивали при 0 °C в течение 1 ч. ТСХ (дихлорметан: этилацетат: метанол = 10:10:1, Rf продукта = 0,46) показала, что соединение **1-5** полностью израсходовалось и образовалось одно новое пятно. Согласно ТСХ, реакция была селективной. К смеси добавляли Ru (201 г, 2,55 ммоль, 205 мл, 22,0 экв.). Молекулярные сита удаляли фильтрованием и твердый осадок промывали ДХМ (800 мл). Значение pH реакционной смеси доводили до 6-7 с помощью 2,5% водного NaHCO<sub>3</sub> (4000 мл). Объединенные органические слои сушили над Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ (500 мл) и по каплям прикапывали в АСН (12000 мл, 30V) при интенсивном перемешивании. Желаемый продукт выпадал в осадок. Соединение **1-6** (310 г, 102 ммоль, выход 88,3%) получали в виде белого твердого вещества.

**Общая методика получения соединения 1-7 (5'-OH-ACCCU-LHPG)**

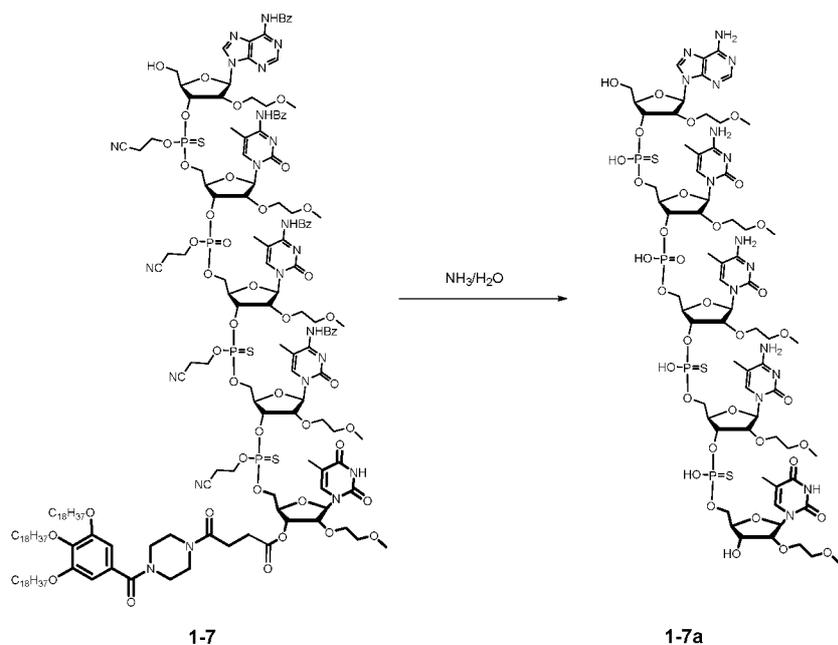


**[0327]** Соединение **1-6** (154 г, 50,8 ммоль, 1,00 экв.) и **5'-DMT-MOE A-3'-P** амидит (71,0 г, 76,2 ммоль, 1,50 экв.) упаривали совместно с ACN (500 мл) и ДХМ (1500 мл).

**[0328]** К раствору соединения **1-6** (154 г, 50,8 ммоль, 1,00 экв.) и **5'-DMT-MOE A-3'-P** амидита (71,0 г, 76,2 ммоль, 1,50 экв.) в ДХМ/ACN = 3:1 (1200 мл) добавляли молекулярное сито 3А (36,0 г). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч. В смесь добавляли DCI (15,0 г, 127 ммоль, 2,50 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч. ТСХ (дихлорметан: этилацетат: метанол = 10:10:1, Rf продукта = 0,57) показала, что соединение **1-6** полностью израсходовалось и образовалось одно новое пятно. Согласно ТСХ, реакция была селективной. В смесь добавляли DDTT (17,7 г, 86,3 ммоль, 1,70 экв.) и пропан-2-ол (iPrOH) (1,83 г, 30,4 ммоль, 2,33 мл, 0,600 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 ч. ТСХ (дихлорметан: этилацетат: метанол = 10:10:1, Rf продукта = 0,59) показала образование одного нового пятна. Согласно ТСХ, реакция была селективной.

**[0329]** К смеси добавляли трифторуксусную кислоту (ТФУ) (75,2 г, 659 ммоль, 48,8 мл, 13,0 экв.) и CySH (11,7 г, 101 ммоль, 12,4 мл, 2,00 экв.) при 0°C. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч. ТСХ (дихлорметан: этилацетат: метанол = 10:10:1, Rf продукта = 0,47) показала образование одного нового пятна. Согласно ТСХ, реакция была селективной.

**[0330]** К смеси добавляли Py (58,5 г, 739 ммоль, 59,7 мл, 15,0 экв.). Молекулярные сита удаляли фильтрованием и твердый осадок промывали ДХМ (300 мл). Значение pH реакционной смеси довели до 6-7 с помощью 2,5% водного NaHCO<sub>3</sub> (2000 мл). Объединенные органические слои сушили над Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ (400 мл) и по каплям прикапывали в ACN (4500 мл, 30,0 V) при интенсивном перемешивании. Желаемый продукт выпадал в осадок. Соединение **1-7 (5'-ОН-ACCCU-LHPG)** (169 г, 47,0 ммоль, выход 92,7%) получали в виде белого твердого вещества. Для анализов ВЭЖХ и ЖХ-МС с соединения **1-7** снимали защиту с помощью процедуры аммонолиза (NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O), аналогичной той, которая использовалась для аммонолиза соединения **1**, описанной ниже, с получением **1-7-а (5'-ОН-ACCCU-ОН)**. ВЭЖХ и ЖХ-МС соединения **1-7-а** показаны на ФИГ. 1.



**[0331]** Метод ВЭЖХ-МС для соединения **1-7-а** описан ниже:

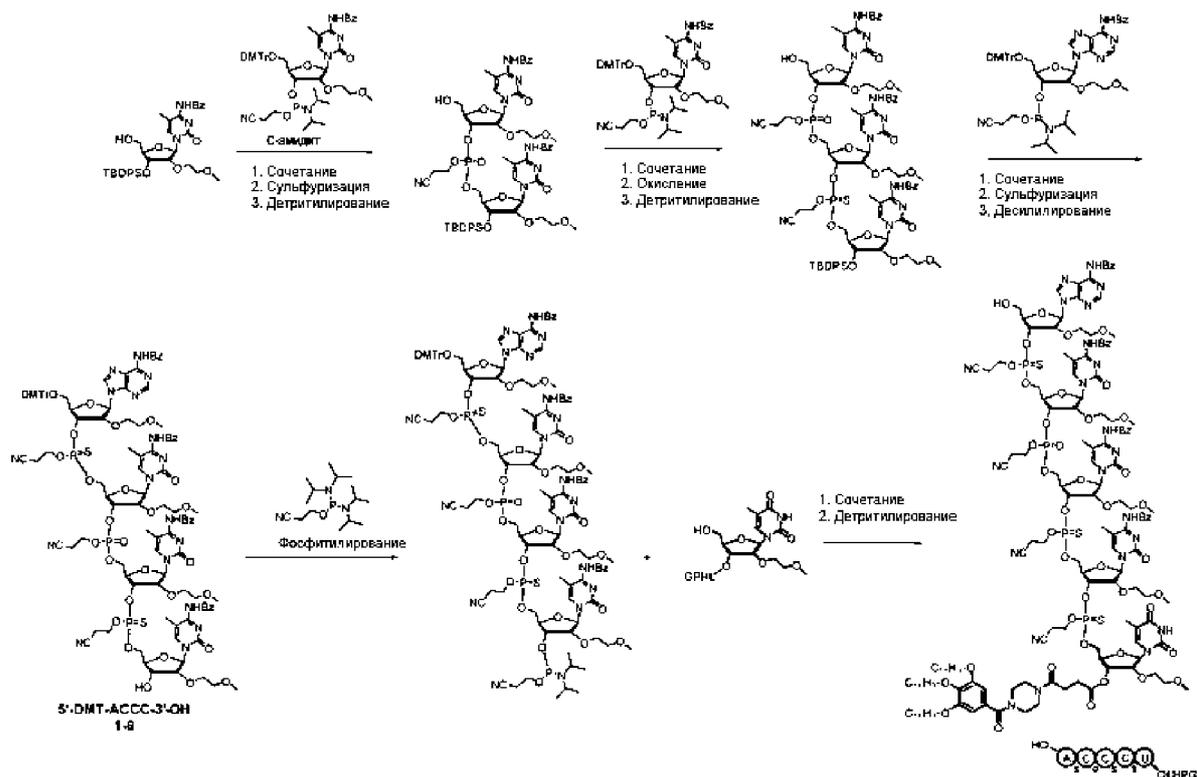
- Колонка -ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 Колонка, 130 Å, 1,7 мкм, 2,1 мм × 150 мм;
- Температура колонки: 65°C
- Диапазон сканирования масс-спектрометрии: 300-2000 m/z;
- Полярность МС: отрицательная
- Раствор А: 5 мМ ацетата трибутиламина (ТБуАА) в 10% CH<sub>3</sub>CN, 1 мкм ЭДТА; Раствор В: 5 мМ ТБуАА в 80% CH<sub>3</sub>CN, 1 мкм ЭДТА.
- Градиент:

Время	А	В	Поток	Давление
Мин	%	%	мл/мин	бар

0,00	84,00	16,00	0,45	---
0,50	84,00	16,00	0,45	---
1,50	84,00	16,00	0,45	---
30,0	68,00	32,00	0,45	---
35,0	15,00	85,00	0,45	---
36,0	15,00	85,00	0,45	---
37,0	84,00	16,00	0,45	---
41,0	84,00	16,00	0,45	---

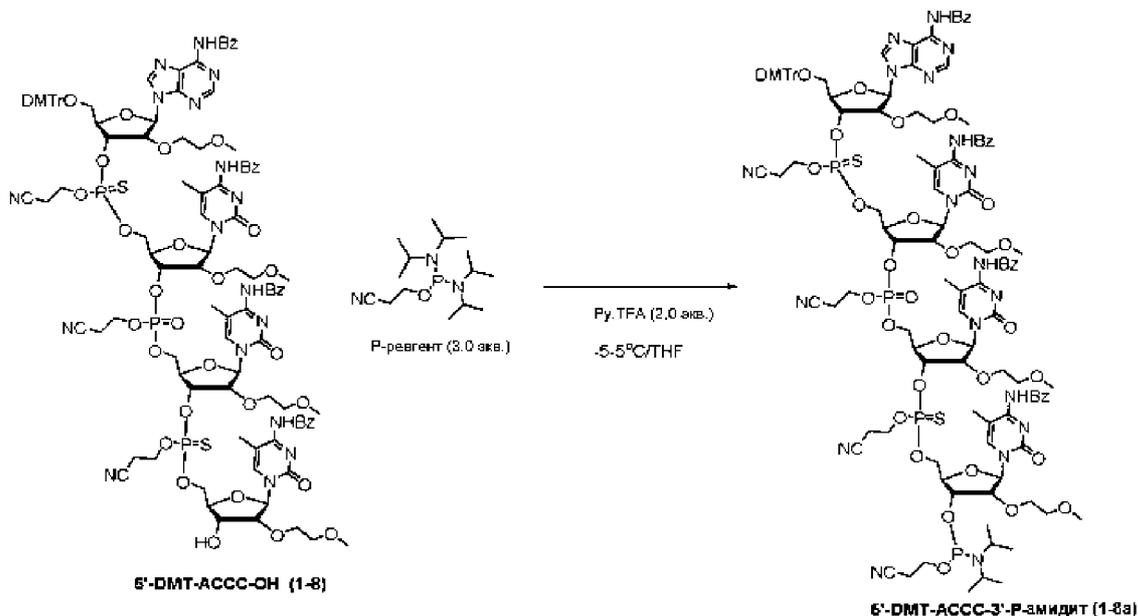
## 2. Альтернативный Синтез 5'-ОН-АСССУ-ЛНPG фрагмента (Фрагмент 1)

### Получение 5'-DMT-АССС-3' ОН



[0332] 5'-DMT-ACCC-3'-ОН (1-8) получали на основе схемы, изображенной выше, с использованием процедур, аналогичных описанным выше для соединения 1-3.

**Общая процедура получения 5'-DMT-ACCC-3'-P амидита(1-8a)**

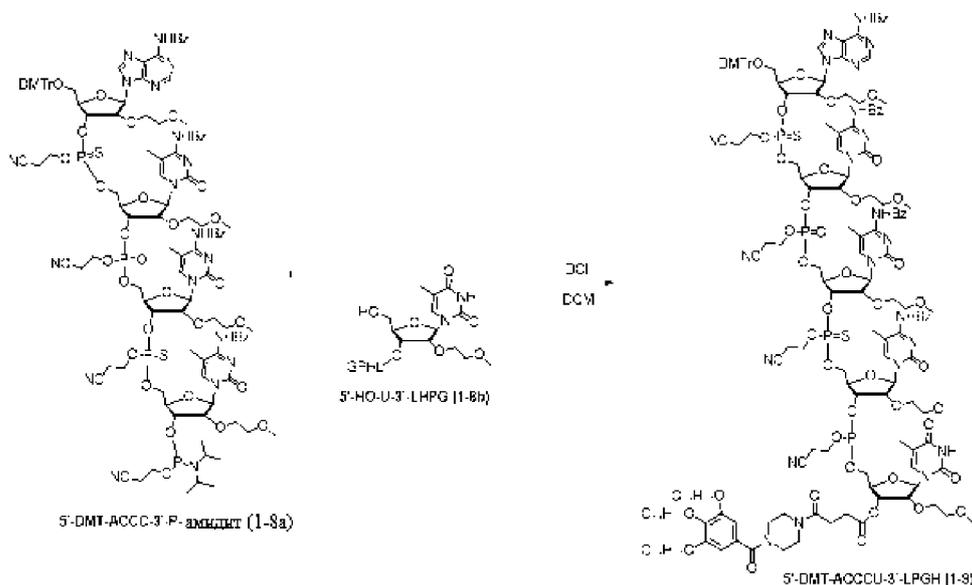


[0333] 5'-DMT-ACCC-3'-ОН (280,0 г, 1,0 экв.) загружали в реактор (R1) под защитной атмосферой N<sub>2</sub>. ДХМ (1000 мл, 3,57 V) загружали в колбу под защитной атмосферой N<sub>2</sub>. Соединение упаривали совместно с ДХМ в вакууме при 25-30 °С. Совместное упаривание с ДХМ повторяли трижды до тех пор, пока уровень остаточной воды не опустился ниже 0,01%. ТГФ (1400 мл 5 V) загружали в R1 под защитной атмосферой N<sub>2</sub>

Был взят образец для анализа. Температуру R1 регулировали от -5 °С до 5 °С. Р-реагент (106,7 г, 2,992 экв.) загружали в R1 под защитной атмосферой N<sub>2</sub> (пиридин; 2,2,2-трифторуксусная кислота 45,7 г, 2,001 экв.) в R1 под защитной атмосферой N<sub>2</sub> и реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при температуре от -5 °С до 5 °С.

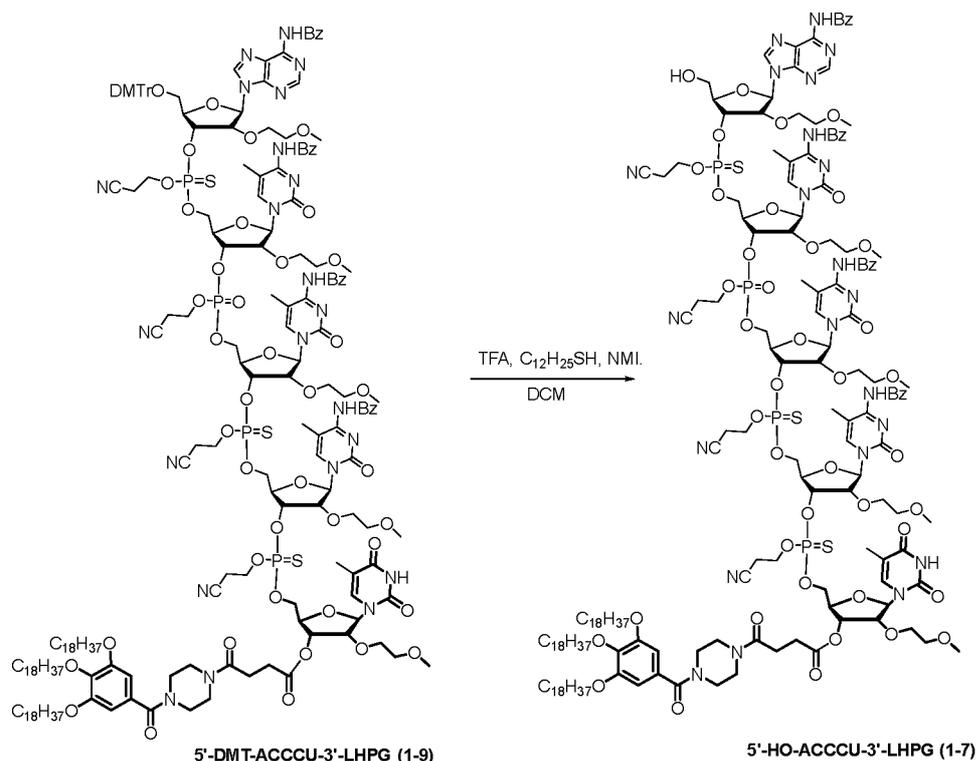
**[0334]** Метилтрет-бутиловый эфир (МТБЭ) (10080 мл, 36 V) загружали в другую колбу (R2) под защитной атмосферой N<sub>2</sub>. Ру (70 мл 0,25 V) загружали в R2 под защитной атмосферой N<sub>2</sub>. Гептан (3920 мл, 14 V) загружали в R1 под защитной атмосферой N<sub>2</sub>. Продуйте R2 N<sub>2</sub> при от -5 °С до 5 °С в течение 30 минут. Раствор из R1 медленно загружали в раствор R2 под защитной атмосферой N<sub>2</sub>. R2 перемешивали в течение 1 часа при температуре от -5 °С до 5 °С. Реакционную смесь фильтровали. Осадок дважды промывали раствором МТБЭ: гептан (5:2, 700 мл). Образец фильтрата был собран для анализа. Был взят образец для анализа. Осадок сушили при температуре от 25 °С до 30 °С в течение 24 часов с получением 5'-DMT-ACCCU-3'-P амидита **1-8a** (292,3 г, выход: 96,25%, чистота: 98%).

**Общая процедура приготовления 5'-DMT-ACCCU-3'-LHPG (1-9)**



**[0335]** 5'-HO-U-3'-LHPG (120,0 г) загружали в реактор, а затем молекулярные сита (3Å) (300,0 г), 5'-DMT-ACCCU-3'-P-амидит (280,68 г, 1,27 экв.) и ДХМ (3000 мл, 25 V). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при 20 °С~30 °С. В реакционную смесь загружали DCI (20,33 г, 2,00 экв.) и смесь перемешивали в течение 30 минут при 20 °С~30 °С. Образец был взят для анализа. В реакционную смесь загружали DDTT (35,35 г, 2,0 экв.). Был взят образец для анализа. Реакционную смесь фильтровали, упаривали и растворяли в ДХМ (720 мл, 6V). Раствор ДХМ по каплям добавляли к раствору ACN (9000 мл, 75 V) с последующим удалением большей части ДХМ роторной перегонкой. Смесь фильтровали и осадок дважды промывали ACN (600 мл, 10 V). Влажный осадок сушили при 20 °С~30 °С в течение 16 часов с получением 5'-DMT-ACCCU-3'-LHPG (287,15 г, выход 85,7%)

**Общая процедура приготовления 5'-OH-ACCCU-3'-LHPG (1-7)**



**[0336]** 5'-DMT-ACCCU-3'-LHPG (285,54 г), молекулярные сита (3А) (142,77 г) и ДХМ (2855 мл, 10 V) загружали в реактор. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при 20 °С~30 ° С, и температуру реакции доводили до -5 °С~5 °С. В реактор загружали додекан-1-тиол (51,97 г, 3,5 экв.), затем ТФУ (58,55 г, 7,0 экв.), и реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при -5 °С~ 5 °С. В реактор загружали 1-метилимидазол (NMI) (54,21 г, 9,0 экв.), и реакционную смесь перемешивали в течение 5 минут при 20 °С ~ 30 ° С. Реакционную смесь фильтровали и раствор упаривали для удаления ДХМ. Неочищенный продукт растворяли в ДХМ (427,5 мл, 1,5 V), и этот раствор по каплям добавляли к раствору АСН (8566 мл, 30 V). Полученную смесь упаривали, удаляя большую часть ДХМ роторной перегонкой, и фильтровали. Осадок дважды промывали АСН (571 мл, 4 V) и сушили при 20 °С~30 °С с получением соединения **1-7** (239,92 г; выход 91,1%).

**В. Общий порядок приготовления 5'-Фрагмента:**

**1. Синтез дезокси-ТТАСС 5-мерного Фрагмента (Фрагмент 2)**

*Общая методика получения соединения 2-2*



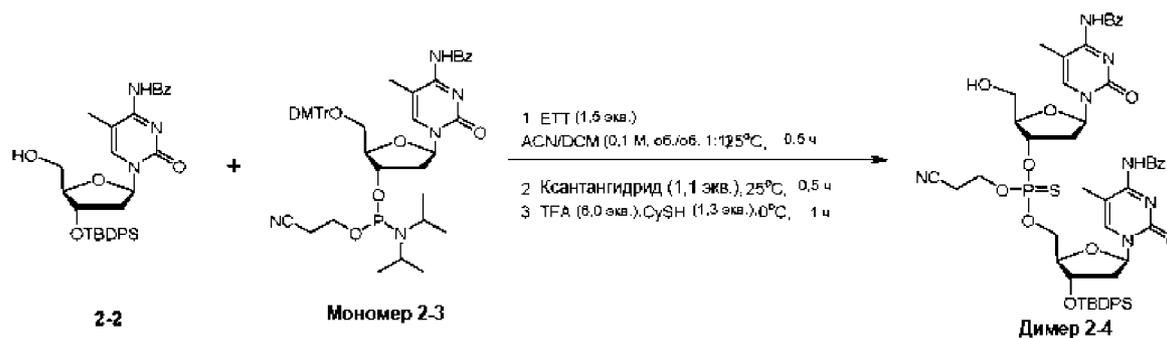
**[0337]** К раствору соединения **2-1** (300 г, 463 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (2300 мл) добавляли имидазол (94,6 г, 1,39 моль, 3,00 экв.) при 25°C. Смесь представляла собой светло-желтый гомогенный раствор TBDPSCI (трет-бутил(хлоро)дифенилсилан) (166 г, 602 ммоль, 1,30 экв.) добавляли при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 12 ч. Примечание. Во время добавления TBDPSCI температура повысилась на 5°C. ВЭЖХ показала, что реагирующий компонент полностью израсходован. Добавляли пропан-2-ол (27,8 г, 463 ммоль, 35,5 мл, 1,00 экв.) и смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа.

**[0338]** К вышеуказанному раствору добавляли циклогексантиол (70,0 г, 602 ммоль, 73,7 мл, 1,30 экв.) при 0°C. Смесь перемешивали при 0°C в течение 15 минут. ТФУ (264,06 г, 2,32 моль, 171,47 мл, 5 экв.) добавляли по каплям при 0°C в течение 45 минут. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа. Цвет раствора изменился от светло-желтого до темно-красного, наблюдаемого во время добавления ТФУ. ВЭЖХ показала, что реакция завершена.

**[0339]** Реакционную смесь выливали в раствор Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (245 г Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в 1,5 л воды), разбавляли метил трет-бутиловым эфиром (ТВМЕ или МТВЕ) (1,5 л) и разделяли два слоя. Органический слой промывали солевым раствором (750 мл × 2), сушили безводным MgSO<sub>4</sub> (232 г), фильтровали через целит и упаривали. Обратите внимание, что при добавлении водного Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> наблюдалось некоторое белое твердое вещество, и продукт не выпадал в осадок в процессе упаривания до тех пор, пока он не испарился досуха, давая сырой продукт в виде твердой пены желтого цвета.

**[0340]** Неочищенный продукт растворяли в ДХМ (300 мл) и загружали в делительную воронку на 1000 мл. К смеси растворителей гептан/ ТВМЕ (об./об. 9:1, 3,0 л) медленно по каплям добавляли раствор сырого продукта из воронки для проведения процесса осаждения. Этот процесс занял около 30 минут. Чистый продукт собирали в виде белого твердого вещества на воронке Бюхнера, осадок продукта промывали смесью растворителей гептана (100 мл × 2) и упаривали до высыхания. Соединение **2-2** (235 г, 395 ммоль, выход 85,2%, чистота 98,0%) получали в виде белого твердого вещества.

#### Общая методика получения соединения 2-4



**[0341]** Соединение **2-2** (10,0 г, 17,1 ммоль, 1,00 экв.) и соединение **Мономер 2-3** (17,4 г, 20,6 ммоль, 1,20 экв.) выпаривали совместно с CH<sub>3</sub>CN (20 мл × 2) в атмосфере Ar<sub>2</sub> в 250 мл одnogорлой круглодонной колбе.

**[0342]** Соединение **2-2** (10,0 г, 17,1 ммоль, 1,00 экв.) и соединение **Мономер 2-3** (17,4 г, 20,6 ммоль, 1,20 экв.) растворяли в ACN (80 мл) и ДХМ (80 мл) (CH<sub>3</sub>CN/ДХМ = 1/1) при 25°C. Добавляли ETT (3,34 г, 25,7 ммоль, 1,50 экв.), и раствор смеси перемешивали при 25°C в течение 30 минут в атмосфере Ar<sub>2</sub>. Важно отметить, что ацетонитрил, используемый в реакции, имел чистоту 99,9% и был дополнительно высушен с помощью молекулярных сит для получения содержания воды ≤ 50 ppm. Используемый ДХМ был также безводным

ДХМ. Смесь изменилась от светло-желтого гомогенного раствора до светло-желтого мутного. ВЭЖХ показала, что соединение **2-2** было полностью израсходовано.

[0343] К вышеуказанному раствору добавляли гидрид ксанта (2,83 г, 18,8 ммоль, 1,10 экв.) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. Примечание: смесь изменилась от светло-желтого гомогенного раствора до желтого мутного. ВЭЖХ показала, что реакция завершена.

[0344] Вышеуказанный раствор охлаждали до 0°C на бане с ледяной водой в течение 30 минут. ТФУ (13,7 г, 120 ммоль, 8,88 мл, 7,00 экв.) Добавляли к реакционной смеси при 0 ° С. Смесь перемешивали при 0°C в течение 2,5 ч. Цвет смеси изменился с желто-мутного на красный ВЭЖХ показала, что реакция завершена.

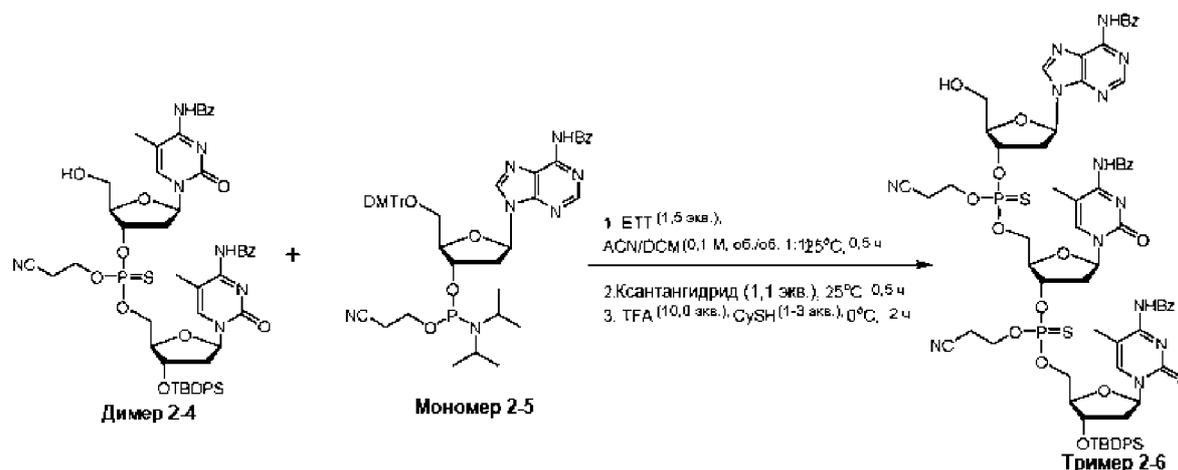
[0345] Раствор Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (12,7 г Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в 83 мл воды) медленно добавляли к реакционной смеси (наблюдали за скоростью высвобождения CO<sub>2</sub>, чтобы избежать бурления реакционного раствора). Процесс натурализации занимал примерно 12 часов, а затем все растворители реакционной смеси удаляли на роторном испарителе, получая молочно-белую водную суспензию сырого продукта.

[0346] Неочищенный продукт растворяли в смеси растворителей EtOAc/ТВМЕ (об./об. 1: 3, 800 мл) и два слоя разделяли. Органический слой промывали водой (400 мл), солевым раствором (2 x 400 мл) и сушили безводным MgSO<sub>4</sub> (~ 42,0 г). фильтровали через целит и упаривали.

[0347] Неочищенный продукт растворяли в ДХМ (55 мл) и загружали в делительную воронку на 100 мл. К смеси растворителей гептан/ТВМЕ (об./об. 9: 1, 1600 мл) медленно добавляли раствор сырого продукта из воронки для проведения процесса осаждения. Этот процесс занял около 60 минут. Время заковки было увеличено на 1 час.

[0348] Чистый продукт собирали в виде белого твердого вещества на воронке Бюхнера. Осадок продукта промывали смесью растворителей гептана (50 мл x 2) и упаривали досуха. Соединение **Димер 2-4** (25,5 г, 16,6 ммоль, выход 96,6%, чистота 68,2%) получали в виде светло-желтого твердого вещества.

#### Общая методика получения соединения 2-6



[0349] Соединение **Димер 2-4** (10,0 г, 9,43 ммоль, 1,00 экв.) и соединение **Monomer 2-5** (8,90 г, 10,4 ммоль, 1,10 экв.) упаривали совместно с ACN (100 мл x 3) в односторонней круглодонной колбе объемом 500 мл., а затем растворяли в ACN (30 мл) и ДХМ (30 мл) (CH<sub>3</sub>CN/ДХМ = 1/1) при 25°C. 5-этилсульфанил-2Н-тетразол (1,84 г, 14,2 ммоль, 1,5 экв.) добавляли при 25°C и смесь перемешивали при 25°C в течение 30 минут. ВЭЖХ показала, что реагент димер 2-4 полностью израсходован.

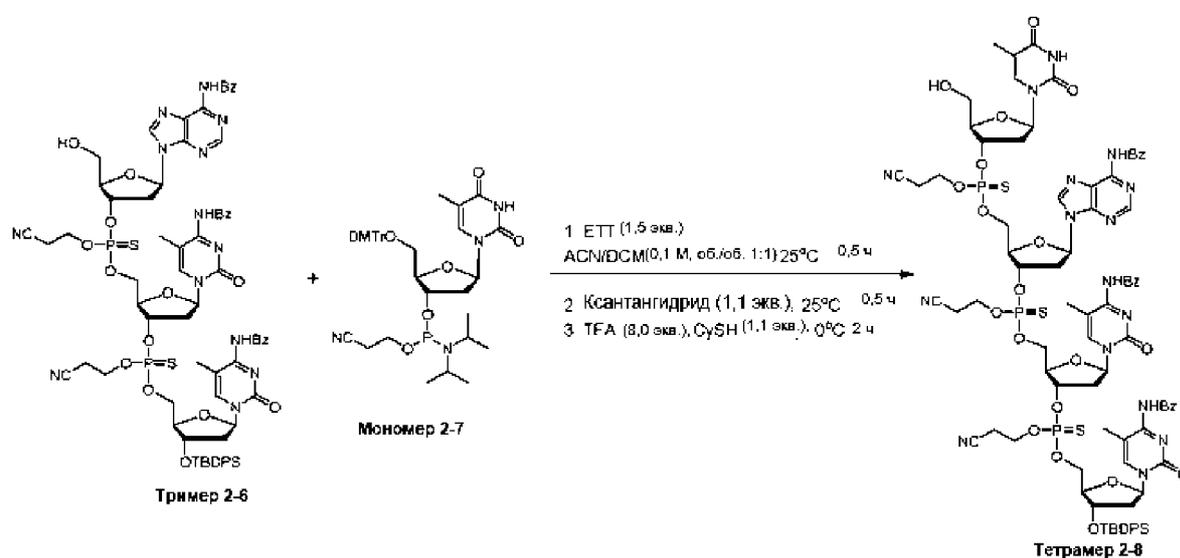
**[0350]** К вышеуказанному раствору добавляли 5-амино-1,2,4-дигиазол-3-тион (1,56 г, 10,4 ммоль, 1,10 экв.) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25°С в течение 0,5 часа. Смесь изменилась от светло-желтого гомогенного раствора до желтого мутного. ВЭЖХ показала, что реакция завершена.

**[0351]** Вышеуказанный раствор охлаждали до 0°С. ТФУ добавляли по каплям (6,45 г, 56,6 ммоль, 4,20 мл, 6,00 экв.) при 0°С. Смесь перемешивали при 0-25°С в течение 3 часов. Цвет смеси изменился от желтой мутной до оранжево-желтой суспензии. ВЭЖХ показала, что реакция завершена.

**[0352]** Раствор Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6,00 г, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в 46,6 мл воды) медленно добавляли к реакционной смеси (наблюдали за скоростью высвобождения CO<sub>2</sub>, чтобы избежать ударов вспучивания реакционного раствора). Процесс натурализации выполнялся примерно за 1 час, а затем все растворители реакционной смеси удалялись роторным испарителем, давая молочно-белую водную суспензию сырого продукта. Неочищенный продукт растворяли в смеси растворителей EtOAc / ТВМЕ (об./об. 3:1, 622 мл) и два слоя разделяли. Органический слой промывали водой (155 мл), солевым раствором (2 × 155 мл) и сушили безводным MgSO<sub>4</sub> (~ 15,5 г), фильтровали и упаривали в вакууме. Обратите внимание, что в этом процессе твердые частицы желтого геля не осаждались. Неочищенный продукт растворяли в ДХМ (70 мл) и загружали в делительную воронку на 100 мл.

**[0353]** К растворителю ТВМЕ (1,24 л) медленно добавляли раствор сырого продукта из воронки для процесса осаждения. Этот процесс занял около 1,5 часов. Чистый продукт собирали в виде белого твердого вещества на воронке Бюхнера, осадок продукта промывали смесью растворителей гептана (50 мл × 2) и концентрировали до высыхания. Соединение **Тример 2-6** (11,4 г, 6,63 ммоль, выход 70,3%, чистота 90,0%) получали в виде светло-желтого твердого вещества.

#### Общая методика получения соединения 2-8.



**[0354]** К раствору соединения **Тримера 2-6** (4,20 г, 2,72 ммоль, 1,00 экв.) в CH<sub>3</sub>CN (10 мл) добавляли **Мономер 2-7** (3,03 г, 4,07 ммоль, 1,50 экв.) и раствор упаривали совместно с CH<sub>3</sub>CN (10 мл × 2) в атмосфере Ar<sub>2</sub> в однокорольной круглодонной колбе объемом 100 мл.

**[0355]** Соединение **Тример 2-6** (4,20 г, 2,72 ммоль, 1,00 экв.) и **Мономер 2-7** (3,03 г, 4,07 ммоль, 1,50 экв.) растворяли в CH<sub>3</sub>CN (12 мл) и ДХМ (12 мл) (CH<sub>3</sub>CN/ДХМ = 1/1) при 25 °С. Добавляли молекулярное сито 3Å (4,00 г, 1,00 экв.), и раствор смеси перемешивали при 25°С в течение 1 часа в атмосфере Ar<sub>2</sub>. 5-этилсульфанил-

2Н-тетразол (530 мг, 4,07 ммоль, 1,50 экв.) Добавляли при 25 °С. Смесь перемешивали при 25°С в течение 0,5 часа. Смесь изменилась от светло-желтого гомогенного раствора до светло-желтого мутного. Реакционную смесь фильтровали для удаления молекулярных сит 3 Å.

**[0356]** Важно отметить, что и ацетонитрил, и ДХМ были оба повторно дистиллированы. ВЭЖХ показала, что тример полностью израсходован.

**[0357]** К вышеуказанному раствору добавляли 5-амино-1,2,4-дигиазол-3-тион (449 мг, 2,99 ммоль, 1,10 экв.) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25°С в течение 0,5 часа. Смесь изменилась от светло-желтого гомогенного раствора до желтого мутного. ВЭЖХ показала, что реакция завершена.

**[0358]** К указанной выше смеси по каплям при 0°С добавляли ТФУ (2,48 г, 21,7 ммоль, 1,61 мл, 8,00 экв.). Смесь перемешивали при 0°С в течение 4,5 ч. Смесь изменилась от желтой мутной до оранжево-желтой суспензии. ВЭЖХ показала, что реакция завершена.

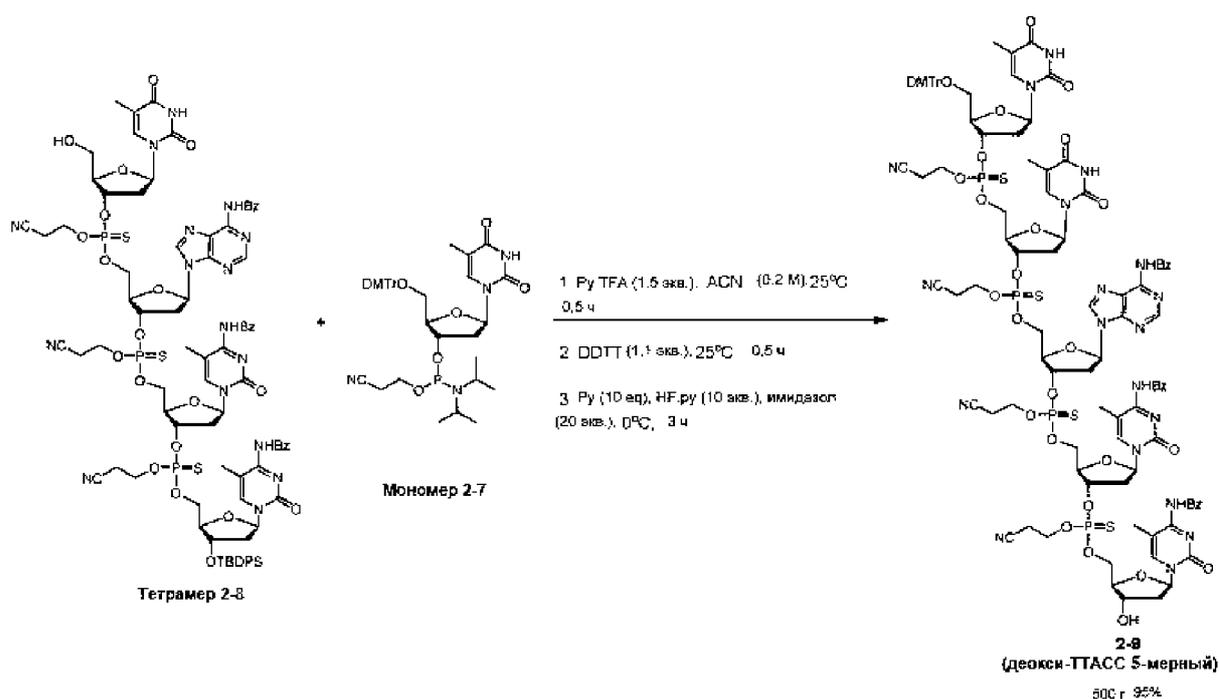
**[0359]** Раствор Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,88 г Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в 20 мл воды) медленно добавляли к реакционной смеси (наблюдали за скоростью высвобождения CO<sub>2</sub> чтобы избежать бурления реакционного раствора). Процесс натурализации выполнялся примерно за 1 час, а затем все растворители реакционной смеси удалялись роторным испарителем, давая молочно-белую водную суспензию сырого продукта.

**[0360]** Неочищенный продукт растворяли в смеси растворителей EtOAc/ТВМЕ (об./об. 3:1, 260 мл) и два слоя разделяли. Органический слой промывали водой (64 мл), соевым раствором (2 x 64 мл) и сушили безводным MgSO<sub>4</sub> (~ 6,44 г), фильтровали через целит, и упаривали.

**[0361]** Неочищенный продукт растворяли в ДХМ (28 мл) и загружали в делительную воронку на 100 мл. К растворителю ТВМЕ (518 л) медленно по каплям добавляли раствор сырого продукта из воронки для процесса осаждения. Этот процесс занял около 30 минут.

**[0362]** Чистый продукт собирали в виде белого твердого вещества на воронке Бюхнера. Осадок продукта промывали смесью растворителей гептана (20 мл x 2) и упаривали досуха. Получали соединение **Тетрамер 2-8** (4,37 г, 2,07 ммоль, выход 76,2%, чистота 91,0%) в виде светло-желтого твердого вещества.

### Общая процедура получения соединения 2-9 (дезоксигТАСС 5мер)



**[0363] Тетрамер 2-8** (120 г, 62,5 ммоль, 1,00 экв.) упаривали совместно с ACN (500 мл × 2), затем добавляли **Мономер 2-7** (51,2 г, 68,8 ммоль, 1,10 экв.) и раствор совместно упаривали с ACN (500 мл × 2) в атмосфере Ar<sub>2</sub> в 3-литровом одностороннем круглодонной колбе.

**[0364]** К смешанному раствору **Тетрамера 2-8** (120 г, 62,5 ммоль, 1,00 экв.) и **Мономера 2-7** (51,2 г, 68,8 ммоль, 1,10 экв.) в ACN (485 мл) добавляли молекулярное сито 3A (36 г) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25°С в течение 1 ч. Ру•ТФУ (1 М, 93,8 мл, 1,50 экв.) добавляли при 25 °С. Полученную смесь перемешивали при 25°С в течение 30 минут. Важно отметить, что ацетонитрил был заново подвергнут повторной дистилляции. ВЭЖХ показала, что **Тетрамер 2-8** израсходован полностью.

**[0365]** К указанной выше смеси добавляли DDTT (14,1 г, 68,8 ммоль, 1,10 экв.) при 25°С. Смесь перемешивали при 25°С в течение 0,5 часа. После завершения сульфуризации вышеуказанную смесь разбавляли бидистиллированным MeCN (480 мл) и затем охлаждали до 0°С. Ру (49,4 г, 625 ммоль, 50,5 мл, 10,0 экв.) добавляли при 0°С.

**[0366]** Одновременно в трехгорлую круглодонную колбу объемом 1 л загружали имидазол (85,1 г, 1,25 моль, 20,0 экв.) и безводный ТГФ (240 мл) и помещали на ледяную баню на 30 мин. Медленно добавляли HF (17,9 г, 625 ммоль, 16,3 мл, чистота 70%, 10,0 экв.) и затем перемешивали еще 15 мин (на этой стадии получали гомогенный продукт). Раствор добавляли к указанной выше суспензии при 0°С с помощью шприцевого насоса (скорость падения 2 мл/мин). Смесь перемешивали при 0°С в течение 3 ч. ВЭЖХ показала, что реакция завершена.

**[0367]** Реакционную смесь разводили EtOAc (2,8 л). Органический слой промывали насыщенным водным NaHCO<sub>3</sub> (1,4 л × 2), водой (1,4 л × 3), соевым раствором (1,4 л) и сушили безводным MgSO<sub>4</sub> (~208 г), фильтровали и упаривали в вакууме. В этом процессе твердые частицы желтого геля не осаждались.

**[0368]** Неочищенный продукт растворяли в ДХМ (840 мл) и ACN (240 мл), загружали в делительную воронку на 1 л. К растворителю ТВМЕ (8,5 л) медленно добавляли раствор сырого продукта из воронки для проведения процесса осаждения. Этот процесс занял около 3 часов. Чистый продукт собирали в виде белого твердого вещества на воронке Бюхнера, осадок продукта промывали смесью растворителей ТВМЕ (1 л × 2) и упаривали досуха. **Дезокси-ТТАСС 5-мер** (145,5 г, 57,8 ммоль, выход 92,4%, чистота 93,6%) получали в виде белого твердого вещества. ВЭЖХ-МС для **дезокси-ТТАСС 5-мер (2-9)** с RT = 7,174 мин показана на ФИГ. 2.

**[0369]** Метод ВЭЖХ-МС для соединения **2-9**:

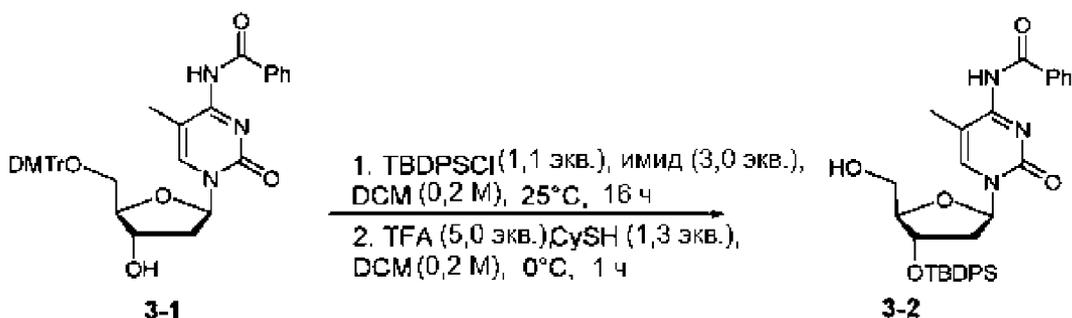
- Колонка: колонка ACQUITY UPLC BEH Shield RP18, 130Å, 1,7 мкм, 2,1 мм × 150 мм;
- Температура колонки: 60°С
- МС-анализ был выполнен на Thermo Orbitrap Fusion с разрешением 60k и диапазоном масс от 700 до 2000;
- Полярность МС: положительная
- Подвижная фаза А: 20 mM ацетат аммония в ACN: вода = 25: 75; Подвижная фаза В: ацетонитрил;
- Градиент:

Время	А	В	Поток	Давление
Мин	%	%	мл/мин	бар
0,00	64,00	36,00	0,50	---
1,00	64,00	36,00	0,50	---
29,0	54,00	46,00	0,50	---

30,0,	20,00	80,00	0,50	---
31,0,	20,00	80,00	0,50	---
32,0,	64,00	36,00	0,50	---
35,0,	64,00	36,00	0,50	---
36,0,	64,00	36,00	0,50	---

## 2. Синтез УТТС 4мер (Фрагмент 3)

### Общая методика получения соединения 3-2.



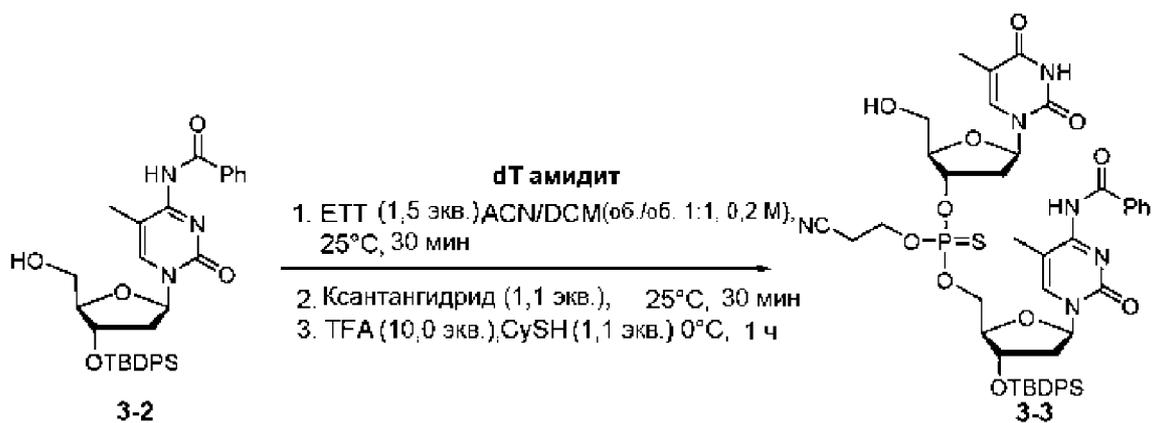
**[0370]** К раствору соединения **3-1** (500 г, 772 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (3800 мл) добавляли имидазол (158 г, 2,32 моль, 3,00 экв.). Добавляли TBDPSCI (276 г, 1,00 ммоль, 258 мл, 1,30 экв.) Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 ч. ТСХ (петролейный эфир/этилацетат = 5/1, продукт: Rf = 0,40) показала, что соединение **3-1** полностью израсходовалось. Добавляли пропан-2-ол (46,4 г, 59,1 мл, 1,00 экв.), и смесь перемешивали в течение 30 минут.

**[0371]** К вышеуказанному раствору добавляли CuSH (117 г, 1,00 моль, 123 мл, 1,30 экв.) при 0 °С. Смесь перемешивали при 0°C в течение 15 минут. ТФУ (440 г, 3,86 моль, 286 мл, 5,00 экв.) добавляли по каплям при 0°C в течение 30 минут. Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 часа. ВЭЖХ показала, что реакция завершена. Обратите внимание, что цвет раствора изменился от светло-желтого до темно-красного, наблюдаемого во время добавления ТФУ.

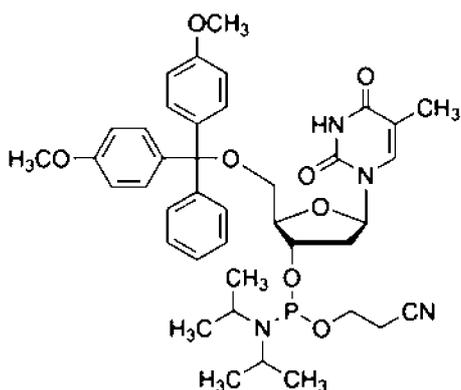
**[0372]** Реакционную смесь выливали в раствор Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (410 г Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в 2,5 л воды), разбавляли ТВМЕ (2,5 л) и разделяли два слоя. Органический слой промывали рассолом (1,3 л × 2), сушили безводным MgSO<sub>4</sub> (321 г), фильтровали через целит и упаривали.

**[0373]** Неочищенный продукт растворяли в ДХМ (600 мл) и загружали в делительную воронку на 1000 мл. К смеси растворителей гептан/ТВМЕ (об./об. 9:1, 5,0 л) медленно добавляли раствор сырого продукта из воронки для проведения процесса осаждения. Этот процесс занял около 30 минут. Чистый продукт собирали в виде белого твердого вещества на воронке Бюхнера, осадок продукта промывали смесью растворителей гептана (500 мл × 2) и упаривали досуха. Соединение **3-2** (390 г, 660 ммоль, выход 85,5%, чистота 98,8%) получали в виде белого твердого вещества.

### Общая методика получения соединения 3-3.



**[0374]** Соединение **3-2** (110 г, 188 ммоль, 1,00 экв.) и **dT-амидит** (168 г, 226 ммоль, 1,20 экв.) выпаривали совместно с  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1,0 л x 3). Смесь растворяли в  $\text{CH}_3\text{CN}$  (500 мл) и ДХМ (500 мл) при 25°C. 5-(Этилтио)-1Н-тетразол (ЕТТ) (1,67 г, 12,8 ммоль, 1,50 экв.) добавляли при перемешивании, и раствор смеси перемешивали при 25°C в течение 30 минут в атмосфере  $\text{Ar}_2$ . Обратите внимание, что ацетонитрил и ДХМ были оба повторно дистиллированы. ВЭЖХ показала, что соединение **3-2** было полностью израсходовано. Обратите внимание, что амидит dT - это DMT-2'-дезокситимидин-фосфорамидит:



**[0375]** К вышеуказанному раствору добавляли ксантан гидрид (31,1 г, 207 ммоль, 1,10 экв.) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 ч. ВЭЖХ показала, что реакция завершена.

**[0376]** Вышеуказанную смесь охлаждали до 0°C на бане с ледяной водой. CySH (24,1 г, 207 ммоль, 25,4 мл, 1,10 экв.) добавляли к реакционной смеси при 0°C. TФУ (215 г, 1,88 ммоль, 140 мл, 10,0 экв.) добавляли по каплям при 0°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч. ВЭЖХ показала, что реакция завершена. Цвет смеси изменился с желто-мутного на красный

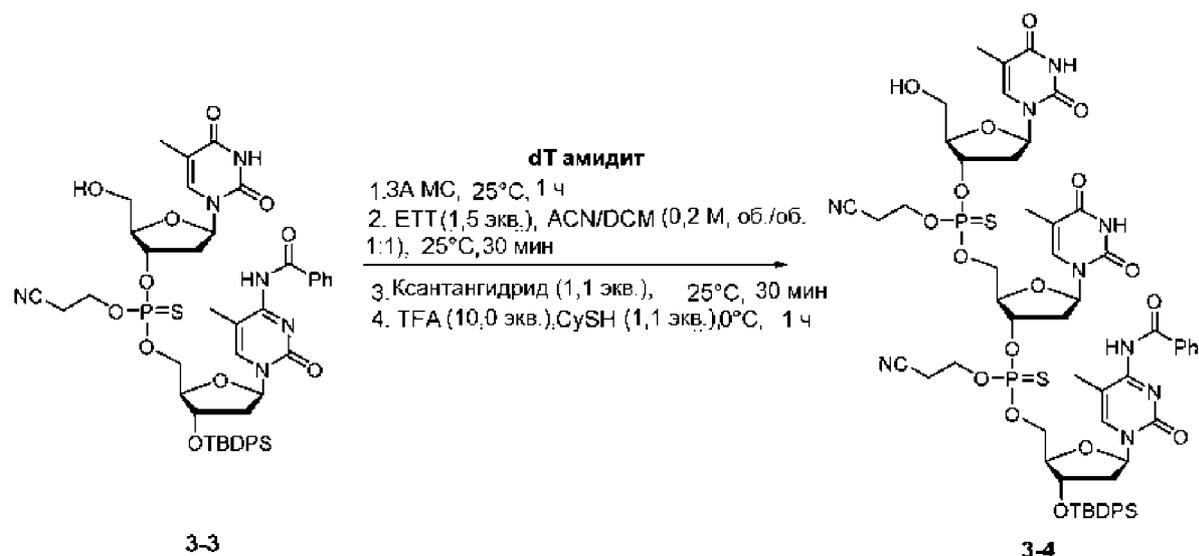
**[0377]** Раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (254 г,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в 3,4 л воды) медленно добавляли к реакционной смеси (наблюдали за скоростью высвобождения  $\text{CO}_2$ , чтобы избежать бурления реакционного раствора). Процесс натурализации выполнялся примерно за 1 час, а затем все растворители реакционной смеси удалялись роторным испарителем, давая молочно-белую водную суспензию сырого продукта.

**[0378]** Здесь объединяли две реакции, и полученный водный раствор сырого продукта разбавляли 7,5 л MeCN (добавление MeCN может растворить лепешку сырого продукта) и экстрагировали смесью ТВМЕ/гептан (3 x 3,4 л, об./об., 1:4) три раза для удаления неполярных примесей (таких как CySH и DMTrSCy и т. д.). Фракцию водного слоя собирали в круглодонной колбе объемом 3,0 л и создавали пониженное

давление с помощью роторного испарителя для удаления всего MeCN с получением водного раствора с желто-гелевой лепешкой сырого продукта.

**[0379]** Водный раствор сырого продукта разбавляли смесью растворителей EtOAc/ТВМЕ (об./об. = 1:3, 5,1 л) (убедитесь, что в растворе не осталось твердого геля) и два слоя разделяли. Органический слой трижды промывали деионизированной водой (3 x 2,5 л), солевым раствором (2,5 л) и сушили безводным MgSO<sub>4</sub> (~ 500 г) и конденсировали досуха, получая желтую пену сырого продукта, которую непосредственно использовали для следующей стадии без дальнейшей обработки. Соединение **3-3** (420 г, 330 ммоль, выход 88,5%, чистота 76,0%) получали в виде светло-желтого твердого вещества.

**Общая методика получения соединения 3-4.**



**[0380]** Соединение **3-3** (200 г, 208 ммоль, 1,00 экв.) и **dT-амидит** (186 г, 250 ммоль, 1,20 экв.) выпаривали совместно с ACN (1,0 л x 3) в атмосфере Ar<sub>2</sub> в 3-литровом односторонней колбе. К вышеуказанному раствору в ACN (525 мл) и ДХМ (525 мл) добавляли молекулярное сито 3А (52,0 г) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч. ETT (40,8 г, 313 ммоль, 1,50 экв.) добавляли при 25°C. Полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 30 минут. Обратите внимание, что ацетонитрил и ДХМ были оба повторно дистиллированы. ВЭЖХ показала, что соединение **3-3** было полностью израсходовано.

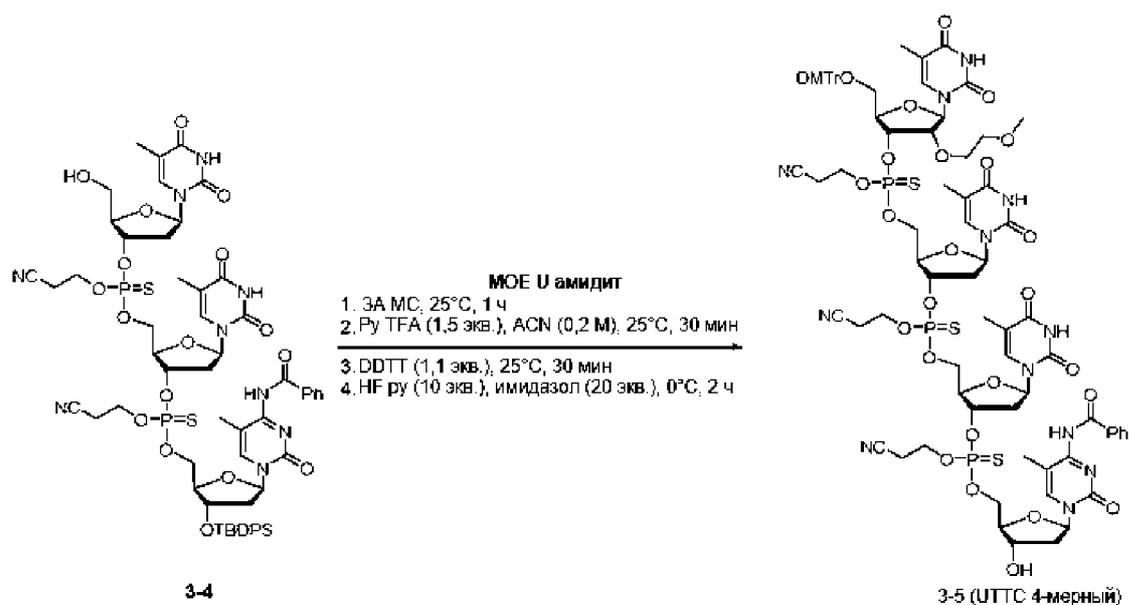
**[0381]** К вышеуказанному раствору добавляли ксантан гидрид (34,5 г, 229 ммоль, 1,10 экв.) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 ч. ВЭЖХ показала, что реакция завершена.

**[0382]** Вышеуказанную смесь охлаждали до 0°C на бане с ледяной водой. CuSH (26,7 г, 229 ммоль, 28,1 мл, 1,10 экв.) добавляли к реакционной смеси при 0°C в течение 10 мин. ТФУ (238 г, 2,09 моль, 154 мл, 10,0 экв.) добавляли к реакционной смеси при 0°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч. ВЭЖХ показала, что реакция завершена. Обратите внимание, что цвет смеси изменился с желтого мутного на красный.

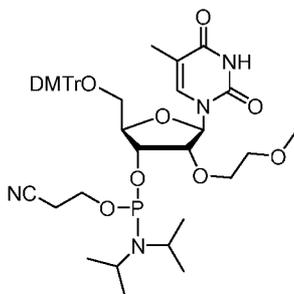
**[0383]** Раствор Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (156 г, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в 2100 мл воды) медленно добавляли к реакционной смеси (наблюдали за скоростью высвобождения CO<sub>2</sub>, чтобы избежать вспучивания реакционного раствора). Процесс натурализации занимал около 1 час, а затем все растворители реакционной смеси были удалены с помощью ротационного испарителя, давая молочно-белую водную суспензию сырого продукта. Неочищенный продукт растворяли в смеси растворителей EtOAc/ТВМЕ (об./об. 1:2, 6400 мл) и два слоя разделяли. Органический слой промывали водой (3 x 3200 мл), солевым раствором (3200 мл) и сушили безводным MgSO<sub>4</sub> (~ 520 г), фильтровали и упаривали в вакууме.

**[0384]** Здесь объединяли две реакции, и сырой продукт растворяли в ДХМ (1,0 л × 2) и загружали в делительную воронку на 1000 мл. К растворителю ТВМЕ/гептан (об./об. = 9:1, 21 л) медленно добавляли раствор сырого продукта из воронки для проведения процесса осаждения. Этот процесс занял около 3 часов. Чистый продукт собирали в виде белого твердого вещества на воронке Бюхнера, осадок продукта промывали смесью растворителей гептана (800 мл × 2) и упаривали досуха. Соединение **3-4** (301 г, 216 ммоль, выход 51,8%, чистота 95,8%) получали в виде светло-желтого твердого вещества. ВЭЖХ оказывает соединение **2-4**: RT = 6,778 мин.

*Общий порядок приготовления 3-5 (UTTC 4-мерный) Amer)*



**[0385]** Соединение **3-4** (200 г, 150 ммоль, 1,00 экв.) и **МОЕ U амидит** (129 г, 157,85 ммоль, 1,05 экв.) выпаривали совместно с CH<sub>3</sub>CN (500 мл × 3). К раствору соединения **3-4** (200 г, 150 ммоль, 1,00 экв.) и **МОЕ U амидит** (129 г, 157 ммоль, 1,05 экв.) в безводном CH<sub>3</sub>CN (800 мл) добавляли молекулярное сито (МС) 3Å (40,0 г, 150 ммоль, 1,00 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч. Затем к реакционной смеси добавляли Py-TФУ (1,00 M, 225 мл, 1,50 экв.) при 25°C. Полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 30 минут. Обратите внимание, что ацетонитрил и ДХМ были оба повторно дистиллированы. ВЭЖХ показала, что соединение **2-4** было полностью израсходовано. Обратите внимание, что амидит МОЕ U представляет собой:



**[0386]** К вышеуказанному раствору добавляли DDTT (33,9 г, 165 ммоль, 1,10 экв.) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 ч. Затем смесь охлаждали до 0°C на ледяной бане в течение 30 мин. ВЭЖХ показала, что реакция завершена. Обратите внимание, что смесь изменилась от желтого мутного до желтого гомогенного раствора.

**[0387]** Одновременно в трехгорлую круглодонную колбу объемом 1 л загружали имидазол (204 г, 3,01 моль, 20,0 экв.) и безводный ТГФ (400 мл) и помещали на ледяную баню на 30 мин. Медленно добавляли HF (43,0 г, 1,50 моль, 39,1 мл, чистота 70,0%, 10,0 экв.) и затем перемешивали еще 15 мин. Смесь добавляли к указанной выше суспензии при 0°C в течение 1 часа. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч. ВЭЖХ показала, что реакция завершена.

**[0388]** Реакционную смесь разводили EtOAc (5,2 мл). Органический слой промывали насыщенным водным NaHCO<sub>3</sub> (3,6 л x 2), водой (2,6 л x 3), соевым раствором (2,6 л) и сушили безводным MgSO<sub>4</sub> (~ 440 г), фильтровали и упаривали в вакууме. Обратите внимание, что в этом процессе твердые частицы желтого геля не осаждались.

**[0389]** Неочищенный продукт растворяли в ДХМ (2,0 л) и загружали в делительную воронку на 1 л. К смеси растворителей ТВМЕ (17,6 л) медленно добавляли раствор сырого продукта из воронки для проведения процесса осаждения. Этот процесс занял около 30 минут. Чистый продукт собирали в виде белого твердого вещества на воронке Бюхнера, осадок продукта промывали смесью растворителей ТВМЕ (500 мл x 2) и упаривали досуха. Соединение **3-5 (УТТС 4mer)** (258 г, 134 ммоль, выход 89,0%, чистота 95,6%) получали в виде светло-желтого твердого вещества. ВЭЖХ-МС для соединения **УТТС 4mer (3-5)** показана на ФИГ. 3.

**[0390]** Метод ВЭЖХ-МС для соединения **3-5**:

- Колонка: колонка ACQUITY UPLC BEH Shield RP18, 130Å, 1,7 мкм, 2,1 мм × 150 мм;
- Температура колонки: 60°C
- МС-анализ был выполнен на Thermo Orbitrap Fusion с разрешением 60k и диапазоном масс от 300 до 2000;
- Полярность МС: положительная
- Подвижная фаза А: 20 mM ацетат аммония в ACN; вода = 25:75; Подвижная фаза В: ацетонитрил;
- Градиент:

Время	А	В	Поток	Давление
Мин	%	%	мл/мин	бар

0,00,	70,00	30,00	0,50	---
1,00,	70,00	30,00	0,50	---
28,0,	55,00	45,00	0,50	---
30,0,	10,00	90,00	0,50	---
31,0,	10,00	90,00	0,50	---
32,0,	70,00	30,00	0,50	---
35,0,	70,00	30,00	0,50	---
36,0,	70,00	30,00	0,50	---

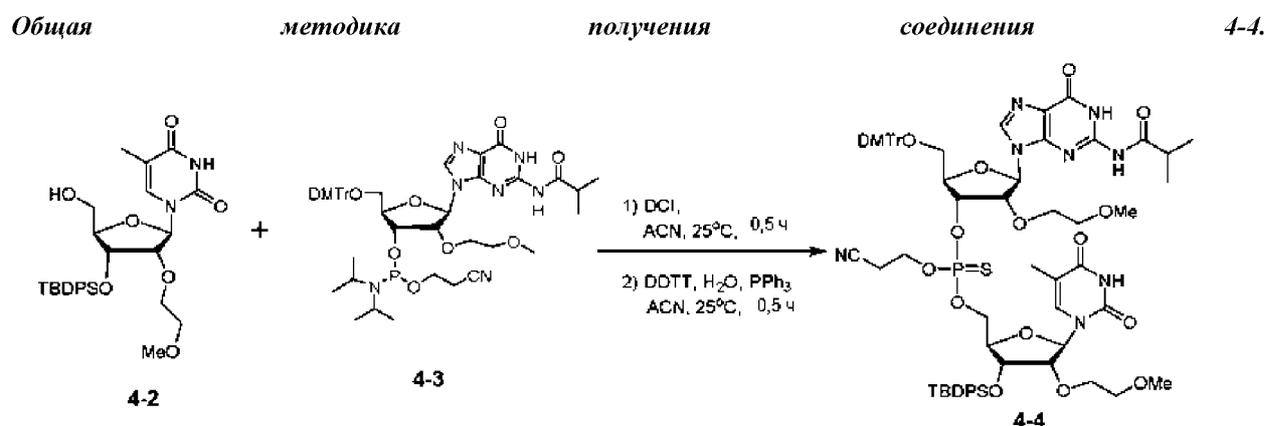
### 3. Синтез 5 'DMT-МОЕ CCGU-ОН (Фрагмент 4)

*Общая методика получения соединения 4-2.*



**[0391]** К раствору соединения **4-1** (200 г, 323 ммоль) в ДХМ (1600 мл) добавляли имидазол (66,0 г, 969 ммоль) и TBDPSCI (115 г, 420 ммоль, 107 мл) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 12 часов. ТСХ (петролейный эфир/этилацетат = 1/1,  $R_f = 0,63$  мин) выявила соединение **4-1** вместе с одним большим новым пятном с более низкой полярностью. Пропан-2-ол (19,4 г, 323 ммоль, 24,7 мл) добавляли в смесь и перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа.

**[0392]** К раствору на последней стадии по каплям добавляли CySH (48,8 г, 420 ммоль) и ТФУ (184 г, 1,62 моль) при 0°C. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа. ТСХ (петролейный эфир/этилацетат = 1/1,  $R_f = 0,50$ ) показала, что реакция завершилась. Реакционную смесь гасили добавлением раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (185 г, 1600 мл DI  $\text{H}_2\text{O}$ ) при 25°C, а затем разбавляли ТВМЕ (500 мл) и разделяли два слоя. Объединенные органические слои промывали рассолом (500 мл), сушили над  $\text{MgSO}_4$  фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт, соединение **4-2**, растворяли в ACN (2000 мл) и DI  $\text{H}_2\text{O}$  (300 мл) и экстрагировали гептаном/ТВМЕ (4/1, 8 л, 1,6 л  $\times$  5). Слой ACN разбавляли ДХМ (3,2 л), отделяли воду, сушили над сухим  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка. Соединение **4-2** (176 г, выход 98,1%, чистота 95,8%) получали в виде белой пены. **<sup>1</sup>H ЯМР:** 400 МГц ДМСО: 11,30 (с, 1H), 7,69 (м,  $J = 6,4$  Гц, 3H), 7,61 (дд,  $J = 7,73, 1,47$  Гц, 2H), 7,44 (м, 6H), 5,97 (д,  $J = 5,87$  Гц, 1H), 5,12 (т,  $J = 4,89, 4,89$  Гц, 1H), 4,31 (м, 1H), 3,9 (q,  $J = 2,8, 2,8, 2,8$  Гц, 1H), 3,76 (t,  $J = 5,38, 5,38$  Гц, 1H), 3,46 (м, 2H), 3,28 (м, 2H), 3,21 (дд,  $J = 12,23, 4,4, 3,13$  Гц, 1H), 3,14 (с, 3H), 1,73 (с, 3H), 1,05 (с, 9H)



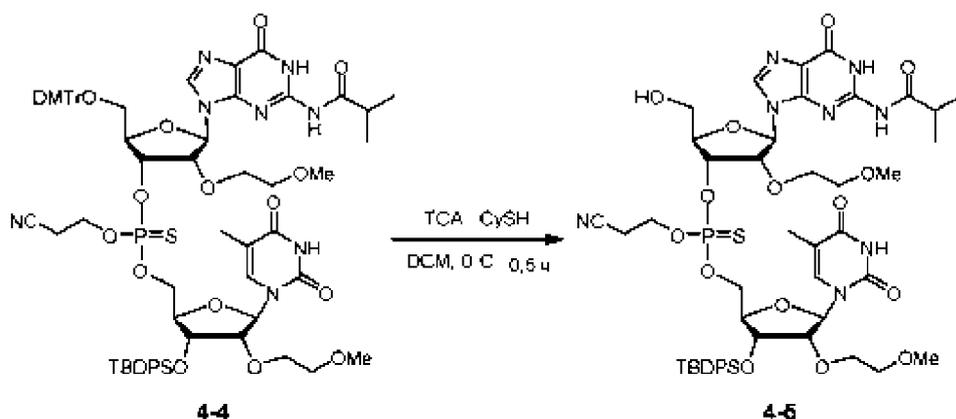
**[0393]** Соединение **4-3** (164 г, 179 ммоль) и соединение **4-2** (90,5 г, 163 ммоль) выпаривали совместно с ACN (450 мл  $\times$  3) под  $\text{Ar}_2$  в одnogорлой круглодонной колбе на 3000 мл и молекулярное сито 3Å. (10,0 г) добавляли в одnogорлую колбу, под давлением  $\text{Ar}_2$  добавляли ACN (1000 мл). Смесь перемешивали при 25°C в течение

1 ч, а затем к смеси добавляли DCI (28,9 г, 244 ммоль). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 0,5 часа. ВЭЖХ показала, что исходный материал полностью израсходован.

**[0394]** После завершения реакции сочетания к смеси добавляли DDTT (37,7 г, 183 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 25°С в течение 0,5 часа, а затем к смеси добавляли DI H<sub>2</sub>O (0,12 мл), PPh<sub>3</sub> (4,38 г, 16,7 ммоль) и смесь перемешивали при 25°С в течение 0,5 часа. ВЭЖХ показала, что исходный материал полностью израсходован.

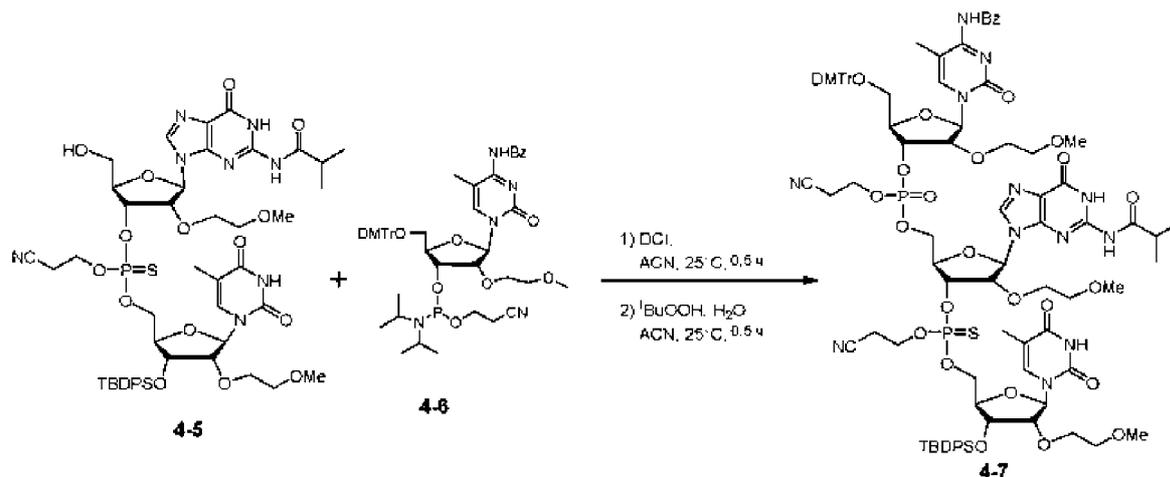
**[0395]** Удалите большую часть ACN с помощью роторного испарителя, а затем разбавьте реакционную смесь tBuOMe/EtOAc (3/1, 1500 мл). Выпадало желтое твердое вещество. Фильтруют и промывают фильтрат DI H<sub>2</sub>O (1000 мл x 2), солевым раствором (600 мл x 2). Органический слой сушили и упаривали досуха. Соединение **4-4** (233,8 г, сырое, чистота 80,1%) получали в виде светло-желтого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

#### Общая методика получения соединения 4-5



**[0396]** Соединение **4-4** (234 г, 167 ммоль) растворяли в безводном ДХМ (1600 мл), затем добавляли при 0°С TCA (81,8 г, 501 ммоль) и CySH (29,1 г, 250 ммоль). Смесь перемешивали при 0°С в течение 0,5 часа. ВЭЖХ показала, что исходный материал полностью израсходован.

**[0397]** Реакцию гасили, медленно добавляя NaHCO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (84,0 г NaHCO<sub>3</sub> в 1200 мл DI H<sub>2</sub>O). Смесь интенсивно перемешивали в течение 10 мин и разделяли два слоя. Слой H<sub>2</sub>O экстрагировали ДХМ (600 мл), и объединенный органический слой сушили и упаривали досуха. Смесь повторно растворяли в CH<sub>3</sub>CN/DI H<sub>2</sub>O (2/1, 1200 мл) и слой CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O промывали смесью гепта /tBuOMe (4/1, 1000 мл x 5). Удалите большую часть CH<sub>3</sub>CN с помощью роторного испарителя, а затем разбавьте смесь tBuOMe/EtOAc (2/1, 1500 мл), промойте смесь NaHCO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (1000 мл x 2, удалите DCI), солевым раствором (600 мл x2). Органический слой сушили MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и упаривали досуха. Неочищенный продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Неочищенный продукт, соединение **4-5** (180 г, выход 98,2%, чистота 94,6%) получали в виде твердого вещества светло-желтого цвета, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.



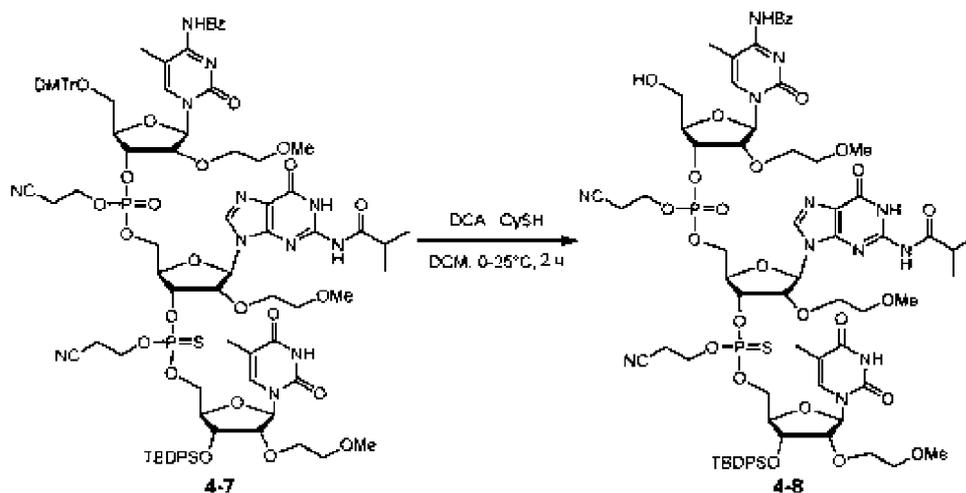
Соединение **4-5** (115 г, 104 ммоль) и соединение **4-6** (106 г, 115 ммоль) выпаривали совместно с ACN (500 мл × 3) в атмосфере Ar<sub>2</sub> в одногорлой круглодонной колбе объемом 2000 мл. и молекулярное сито 3Å (45,0 г) добавляли в одногорлую колбу, под давлением Ar<sub>2</sub> добавляли ACN (1050 мл). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа, а затем к смеси добавляли DCl (18,6 г, 157 ммоль). ВЭЖХ показала, что исходный материал полностью израсходован.

**[0399]** После завершения реакции сочетания к реакционной смеси добавляли tBuOOH (5,5 М, 38,1 мл) и H<sub>2</sub>O (10 мл). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 30 мин. ВЭЖХ показала, что исходный материал полностью израсходован.

**[0400]** После завершения окисления реакционную смесь охлаждали до 0°C на водяной бане со льдом в течение 5 мин и добавляли раствор окисления I<sub>2</sub> технической чистоты (628,87 мл 0,05 М в смеси пиридин/H<sub>2</sub>O, об./об. 9:1) к смеси в течение 20 мин. Реакционную смесь перемешивали при 0°C еще пять минут. ВЭЖХ показала, что исходный материал полностью израсходован.

**[0401]** Реакционную смесь медленно выливали в раствор Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (33,1 г Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> в 2300 мл H<sub>2</sub>O) и раствор интенсивно перемешивали в течение 10 мин. Затем смесь разбавляли 3000 мл смеси растворителей EtOAc/tBuOMe (1/3). Органический слой отделяли и промывали NaHCO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (2000 мл), соевым раствором (1000 мл). Органический слой сушили и упаривали досуха. Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ/tBuOMe (1/1, 460 мл). Неочищенный растворитель медленно добавляли по каплям к смеси растворителей гептан/tBuOMe (2/1, 2300 мл). Желаемый продукт выпадал в осадок. Продукт собирали в виде светло-желтого твердого вещества после фильтрации, твердый осадок промывали смесью гептан/tBuOMe (1/1, 230 мл × 2). Соединение **7** (217 г, сырое, чистота 87,6%) получали в виде светло-желтого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

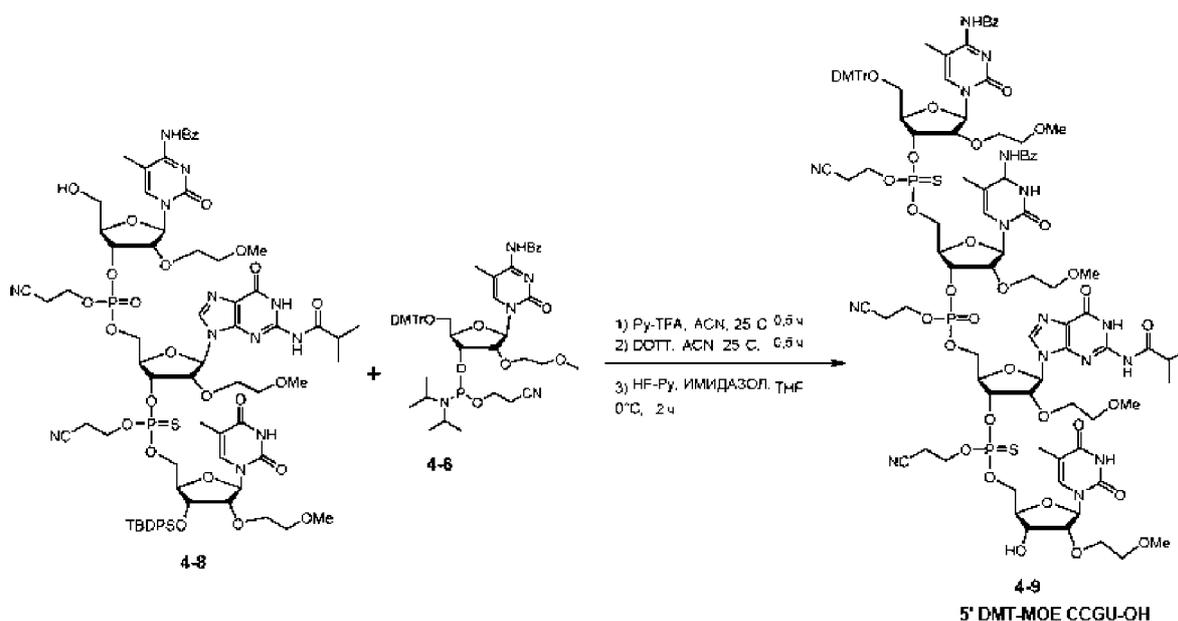
**[0402]** *Общая методика получения соединения 4-8.*



**[0403]** Соединение **4-7** (204 г, 104 ммоль) растворяли в безводном ДХМ (2000 мл), затем при 0°C добавляли DCA (67,5 г, 524 ммоль) и CySH (18,2 г, 157 ммоль). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 2 часа. ВЭЖХ показала, что исходный материал полностью израсходован.

**[0404]** Реакцию гасили, медленно добавляя Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (77,4 г Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в 1200 мл DI H<sub>2</sub>O). Смесь интенсивно перемешивали в течение 10 мин и разделяли два слоя. Слой H<sub>2</sub>O экстрагировали ДХМ (600 мл), и объединенный органический слой сушили и упаривали досуха. Смесь повторно растворяли в CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (2/1, 900 мл) и слой CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O промывали смесью гептан/tBuOMe = (4/1, 800 мл × 5). Удалите большую часть CN<sub>3</sub>CN с помощью роторного испарителя, а затем разбавьте смесь tBuOMe/EtOAc (1/3, 1800 мл), промойте смесь NaHCO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (900 мл × 2), соевым раствором (600 мл). Органический слой сушили и упаривали досуха. Неочищенный продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Соединение **4-8** (130 г, выход 75,3%, чистота 92,4%) получали в виде твердого вещества светло-желтого цвета, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

**[0405]** *Общая процедура получения* **5** *'DMT-MOE CCGU-OH*



Соединение **4-8** (153 г, 92,8 ммоль) и соединение **4-6** (89,9 г, 97,5 ммоль) совместно упаривали с ACN (400 мл

х 3) в атмосфере Ar<sub>2</sub> в одногорлую круглодонную колбу на 3000 мл и молекулярное сито 3А (45,0 г) добавляли в одногорлую колбу, под давлением Ar<sub>2</sub> добавляли ACN (928 мл). Смесь перемешивали при 25°C в течение часа, а затем к смеси добавляли Ru-ТФУ (1 М, 139 мл). ВЭЖХ показала, что исходный материал полностью израсходован.

**[0406]** После завершения реакции сочетания к смеси добавляли DDTT (20,0 г, 97,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа и ее вид менялся от желтого мутного до желтого гомогенного раствора, что свидетельствовало о завершении реакции, а затем охладили до 0°C на ледяной бане в течение 30 мин

**[0407]** Одновременно в круглодонную колбу на 500 мл загружали имидазол (127 г, 1,87 моль) и безводный ТГФ (232 мл) и помещали на ледяную баню на 30 мин. Медленно добавляли HF-Ru (24,3 мл, чистота 70,0%) и затем перемешивали еще 15 мин (на этой стадии получали гомогенный раствор). Раствор из последней стадии медленно добавляли к реакционной смеси из последней реакционной смеси с помощью перистальтического насоса (скорость капания 1 мл/5 мин) и перемешивали в течение 1-2 часов при 0°C. Завершение реакции можно контролировать с помощью ВЭЖХ. ВЭЖХ показала, что исходный материал полностью израсходован. Смесь разбавляли EA (4500 мл) и медленно нейтрализовали NaHCO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (2500 мл) при 0°C. Органический слой отделяли и промывали NaHCO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (2500 мл), солевым раствором (2000 мл). Органический слой сушили и упаривали досуха. Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ (600 мл). Неочищенный растворитель медленно добавляли по каплям в растворитель tBuOMe (6000 мл). Желаемый продукт выпадал в осадок. Продукт собирали в виде светло-желтого твердого вещества после фильтрации, и твердый осадок промывали tBuOMe (600 мл x2). **4-9 (5' DMT-МОЕ CCGU-OH)** (190 г, выход 90,5%, 94,8% чистота) получали в виде светло-желтого твердого вещества. ВЭЖХ-МС для соединения МОЕ-CCGU 4mer (4-9) показана на ФИГ. 4.

**[0408]** Метод ВЭЖХ-МС для соединения **4-9**:

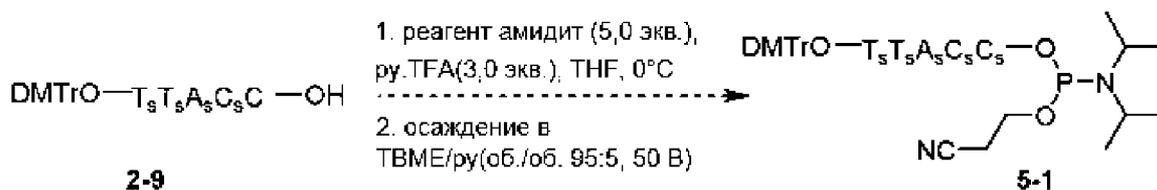
- Колонка: колонка ACQUITY UPLC BEH Shield RP18, 130Å, 1,7 мкм, 2,1 мм × 150 мм;
- Температура колонки: 60°C
- МС-анализ был выполнен на Thermo Orbitrap Fusion с разрешением 60k и диапазоном масс от 400 до 2000;
- Полярность МС: положительная
- Подвижная фаза А: 20 mM ацетат аммония в ACN: вода = 25: 75; Подвижная фаза В: ацетонитрил;
- Градиент:

Время	А	В	Поток	Давление
Мин	%	%	мл/мин	бар

0,00,	60,00	40,00	0,50	---
1,00,	60,00	40,00	0,50	---
28,0,	40,00	60,00	0,50	---
30,0,	10,00	90,00	0,50	---
31,0,	10,00	90,00	0,50	---
32,0,	60,00	40,00	0,50	---
35,0,	60,00	40,00	0,50	---
36,0,	60,00	40,00	0,50	---

### С. Конвергентный синтез целевого олигонуклеотида

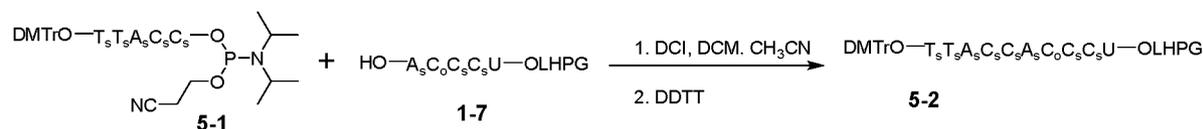
**Общая методика получения соединения 5-1**



**[0409]** К раствору реагента амидита (63,9 г, 212 ммоль, 67,3 мл, 5,0 экв.) и соединения **2-9** (100 г, 42,4 ммоль, 1,0 экв.) в ТГФ (400 мл) добавляли Ру-ТФУ (24,5 г, 127 ммоль, 15,9 мл, 3,0 экв.) при 0°C. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа. ВЭЖХ показала, что соединение **2-9** было полностью израсходовано.

**[0410]** Реакционную смесь переносили в делительную воронку на 500 мл (~ 20 мл после объединения с промывным объемом ДХМ). К растворителю ТВМЕ/ру (об./об. 100: 0,7, 15 л) медленно по каплям добавляли раствор сырого продукта из воронки для проведения процесса осаждения. Этот процесс занял около 90 минут. Чистый продукт собирали в виде белого твердого вещества на воронке Бюхнера, осадок продукта промывали чистым ТВМЕ (1,0 л × 3) и упаривали досуха. Соединение **5-1** (106 г, выход 90,8%, чистота 93%) получали в виде белого твердого вещества. Обратите внимание, что использовался безводный ТГФ. Соединение **2-9** и Ру-ТФУ совместно упаривали с ТГФ 3 раза. Пиридин добавляли для поддержания основной среды, чтобы минимизировать гидролиз амидитного продукта.

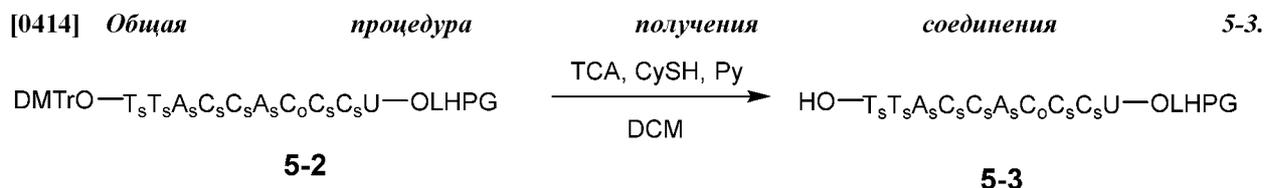
**Общая методика получения соединения 5-2**



**[0411]** Соединение **5-1** (122 г, 48,0 ммоль, 1,5 экв.), молекулярное сито 3Å (45,0 г) и соединение **1-7** (115 г, 32,0 ммоль, 1,0 экв.) находились в ДХМ/АСН = 2/1 (900 мл), добавляли DCI (9,46 г, 80,08 ммоль, 2,5 экв.). Смесь перемешивали при 10 °C в течение 1 часа.

**[0412]** Контролировать реакцию с помощью ТСХ (полное превращение 60 мин). После завершения реакции сочетания к смеси добавляли DDTT (9,87 г, 48,05 ммоль, 1,5 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 10°C в течение 30 мин. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат упаривали до 1/2 объема. Остаточный раствор добавляли к АСН (5,0 л). Продукт выпал в осадок. Фильтровали, и осадок на фильтре собирали. Осадок на фильтре промывали АСН (1 л) и сушили в вакууме. Соединение **5-2** (194 г, выход 99,6%) получали в виде светло-желтого твердого вещества. Обратите внимание, чтобы ацетонитрил и ДХМ были оба свежеперегнанными. Соединение **5-1** и соединение **1-7** совместно упаривали с ДХМ/АСН три раза.

**[0413]** Для анализов ВЭЖХ и ЖХ-МС с соединения **5-2** снимали защиту с помощью процедуры аммонолиза (NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O), процедуры аналогичной той, которая использовалась для аммонолиза соединения **1**, описанной ниже, с получением **5-2-а(DMTrO-TsTsAsCsCsAsCoCsCsU-OH)**. ВЭЖХ и ЖХ-МС соединения **5-2-а** показаны на ФИГ. 5.



Соединение **5-2** (194 г, 31,9 ммоль, 1,0 экв.) и молекулярное сито 3Å (65,0 г) добавляли в круглодонную колбу, под давлением аргона добавляли безводный ДХМ (1,3 л). Смесь перемешивали при 15°C в течение 1 часа, а затем к смеси добавляли CuSH (7,42 г, 63,8 ммоль, 7,81 мл, 2,0 экв.) и TCA (52,1 г, 319 ммоль, 32,1 мл, 10,0 экв. экв.) при 0°C.

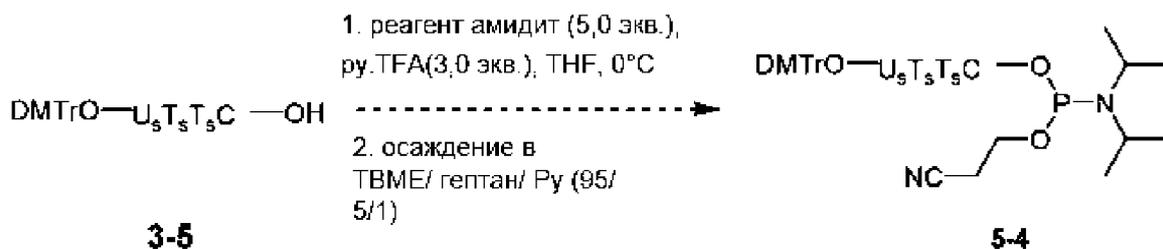
[0415] Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 90 мин (проверка реакции с помощью ТСХ), а затем к смеси добавляли Py (30,2 г, 382 ммоль, 30,9 мл, 12,0 экв.). Смесь перемешивали при 15°C в течение 5 минут. Молекулярные сита 3Å удаляли фильтрацией. Растворитель ДХМ медленно добавляли к CH<sub>3</sub>CN (7,0 л), выпадал светло-желтый твердый осадок. Удаляют большую часть ДХМ с помощью роторного испарителя, белый осадок собирают и промывают CH<sub>3</sub>CN (500 мл × 3). Соединение **5-3** (180 г, выход 97,6%) получали в виде светло-желтого твердого вещества. Обратите внимание, что ДХМ был свежеперегнанным. Соединение **5-2** совместно упаривали с ДХМ 3 раза. Продукт хорошо растворяется в ДХМ, важно удалить большую часть ДХМ перед фильтрацией. Для анализов ВЭЖХ и ЖХ-МС с соединения **5-3** снимали защиту с использованием процедуры аммонолиза (NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O), процедуры аналогичной той, которая использовалась для аммонолиза соединения **1**, описанной ниже, с получением **5-3-а (HO-TsTsAsCsCsAsCoCsCsU-OH)**. ВЭЖХ и ЖХ-МС соединения **5-3-а** показаны на ФИГ. 6.

[0416] Метод ВЭЖХ-МС для соединения **5-3-а**:

- Колонка: колонка ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 мкм, 2,1 мм × 50 мм;
- Температура колонки: 50°C ;
- Режим ионизации: ионизация электрораспылением при атмосферном давлении (API-ES)
- Диапазон масс от 1350 до 2300;
- Полярность МС: отрицательная
- Подвижная фаза А: 5 mM TBusAA в 10% CH<sub>3</sub>CN, 1 мкМ ЭДТА; Раствор В: 5 mM TBusAA в 80% CH<sub>3</sub>CN, 1 мкМ ЭДТА;
- Градиент:

Время	А	В	Поток	Давление
Мин	%	%	мл/мин	бар
0,14	60,00	40,00	0,51	---
3,70	20,00	80,00	0,51	---
4,00	10,00	90,00	0,51	---
4,20	60,00	40,00	0,51	---
5,00	60,00	40,00	0,51	---

**Общая методика получения соединения 5-4.**

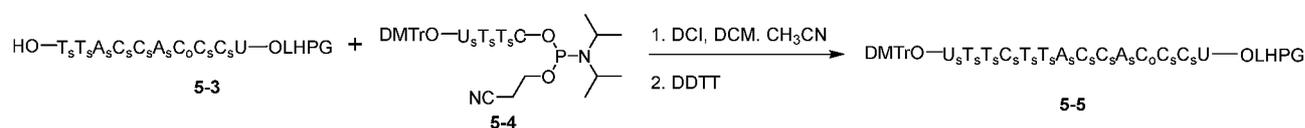


**[0417]** Соединение **3-5** (102 г, 55,3 ммоль, 1,0 экв.) упаривали совместно с ТГФ (300 мл × 3). Py-ТФУ (32,0 г, 166 ммоль, 3,0 экв.) упаривали совместно с ТГФ (300 мл × 3). В круглодонную колбу на 2000 мл добавляли соединение **3-5** (102 г, 55,3 ммоль, 1,0 экв.) и реагент AMidite (83,4 г, 276 ммоль, 87,9 мл, 5,0 экв.) в безводном ТГФ (400 мл) и охлаждали до 0°C на ледяной бане в течение 30 мин. Добавляли активатор Py-ТФУ (32,0 г, 166 ммоль, 3,0 экв.) и затем реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа. ВЭЖХ показала, что исходный материал полностью израсходован.

**[0418]** К растворителю ТВМЕ/гептан/Py (95/5/1, 15,8 л) медленно по каплям добавляли раствор сырого продукта из воронки для проведения процесса осаждения. Этот процесс занял около 30 минут. Чистый продукт собирали в виде грязно-белого твердого вещества с предыдущей стадии, лепешку продукта промывали чистым ТВМЕ (500 мл × 3) и сушили в высоком вакууме в течение 3 часов.

**[0419]** Соединение **5-4** (107 г, 52,4 ммоль, выход 94,6%) получали в виде белого твердого вещества. Обратите внимание, что ТГФ был безводным, а соединение **3-5** и Py-ТФУ совместно упаривали с безводным ТГФ 3 раза.

#### Общая методика получения соединения 5-5.



**[0420]** Соединение **5-3** (177 г, 30,6 ммоль, 1,0 экв.), соединение **5-4** (106 г, 52,0 ммоль, 1,7 экв.) и молекулярное сито 3Å (60 г) добавляли в круглодонную колбу, под давлением Ag добавляли безводный ДХМ (850 мл, H<sub>2</sub>O < 50 ч/млн), АСН (425 мл, H<sub>2</sub>O < 50 ч/млн). Смесь перемешивали при 15°C в течение 1 часа, а затем к смеси добавляли DCI (9,05 г, 76,6 ммоль, 2,5 экв.) Смесь перемешивали при 15°C в течение 0,67 часа. ТСХ (ДХМ: MeOH = 10:1) показала, что соединение **5-3** было полностью израсходовано.

**[0421]** После завершения реакции сочетания к смеси добавляли DDTT (10,7 г, 52,0 ммоль, 1,7 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 15°C в течение 10 минут.

**[0422]** Молекулярное сито 3Å удаляли фильтрованием и реакционную смесь разбавляли 6000 мл CH<sub>3</sub>CN (выпал белый твердый осадок). ДХМ удаляли на роторном испарителе, белое твердое вещество собирали и промывали CH<sub>3</sub>CN (500 мл × 3). Светло-желтое твердое вещество использовали непосредственно на следующей стадии без какой-либо очистки. Соединение **5-5** (237 г, выход 99,6%) получали в виде светло-желтого твердого вещества.

**[0423]** Для анализов ВЭЖХ и ЖХ-МС с соединения **5-5** снимали защиту с помощью процедуры аммонолиза (NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O), процедуры аналогичной той, которая использовалась для аммонолиза соединения **1**, описанной

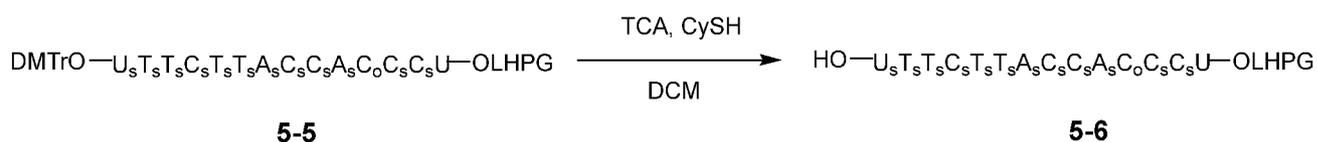
ниже, с получением **5-5-а (DMTrO-U<sub>s</sub>T<sub>s</sub>T<sub>s</sub>C<sub>s</sub>T<sub>s</sub>T<sub>s</sub>AsCsCsAsCoCsCsU-OH)**. ВЭЖХ и ЖХ-МС соединения **5-5-а** показаны на ФИГ, 7.

**[0424]** Метод ВЭЖХ-МС для **5-5-а**:

- Колонка: колонка ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 мкм, 2,1 мм × 50 мм.
- Температура колонки: 50°C
- Режим ионизации: ионизация электрораспылением при атмосферном давлении (API-ES)
- Диапазон масс от 1350 до 2300;
- Полярность МС: отрицательная
- Подвижная фаза А: 5 мМ ТВuAA в 10% CH<sub>3</sub>CN, 1 мкМ ЭДТА; Раствор В: 5 мМ ТВuAA в 80% CH<sub>3</sub>CN, 1 мкМ ЭДТА;
- Градиент:

Время	А	В	Поток	Давление
Мин	%	%	мл/мин	бар
0,14	60,00	40,00	0,51	---
3,70	20,00	80,00	0,51	---
4,00	10,00	90,00	0,51	---
4,20	60,00	40,00	0,51	---
5,00	60,00	40,00	0,51	---

**Общая методика получения соединения 5-6.**



**[0425]** Соединение **5-5** (234 г, 30,2 ммоль, 1,0 экв.) и молекулярное сито 3Å (12,5 г) добавляли в круглодонную колбу, добавляли безводный ДХМ под давлением Ar (1500 мл, H<sub>2</sub>O <50 ч/мл). Смесь перемешивали при 15°C в течение 1 часа, а затем к смеси добавляли CySH (10,5 г, 90,5 ммоль, 11,1 мл, 3,0 экв.) и TCA (59,2 г, 362 ммоль, 12,0 экв.).

**[0426]** Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 60 мин (проверка реакции с помощью ТСХ), а затем к смеси добавляли Ru (35,8 г, 452 ммоль, 36,5 мл, 15,0 экв.). Смесь перемешивали при 15°C в течение 5 минут.

**[0427]** Молекулярные сита 3Å удаляли фильтрацией. Растворитель ДХМ медленно добавляли к 10 л CH<sub>3</sub>CN, выпадал светло-желтый твердый осадок. Удаляют большую часть ДХМ с помощью роторного испарителя, белый осадок собирают и промывают CH<sub>3</sub>CN (500 мл × 3). Соединение **5-6** (210 г, выход 93,3%) получали в виде светло-желтого твердого вещества.

**[0428]** Для анализов ВЭЖХ и ЖХ-МС с соединения **5-6** снимали защиту с помощью процедуры аммонолиза (NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O), процедуры аналогичной той, которая использовалась для аммонолиза соединения **1** описанной ниже, с получением **5-6-а (HO-U<sub>s</sub>T<sub>s</sub>T<sub>s</sub>C<sub>s</sub>T<sub>s</sub>T<sub>s</sub>AsCsCsAsCoCsCsU-OH)**. ВЭЖХ и ЖХ-МС соединения **5-6-а** показаны на ФИГ, 8.

**[0429]** Метод ВЭЖХ-МС для **5-6-а**:

- Колонка: колонка ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 мкм, 2,1 мм × 50 мм.
- Температура колонки: 50°C
- Режим ионизации: ионизация электрораспылением при атмосферном давлении (API-ES)
- Диапазон масс от 1350 до 2300;
- Полярность МС: отрицательная
- Подвижная фаза А: 5 мМ ТВuАА в 10% CH<sub>3</sub>CN, 1 мкМ ЭДТА; Раствор В: 5 мМ ТВuАА в 80% CH<sub>3</sub>CN, 1 мкМ ЭДТА;

• Градиент:

Время А В Поток Давление

Мин % % мл/мин бар

-----

0,14, 60,00 40,00 0,51 ---

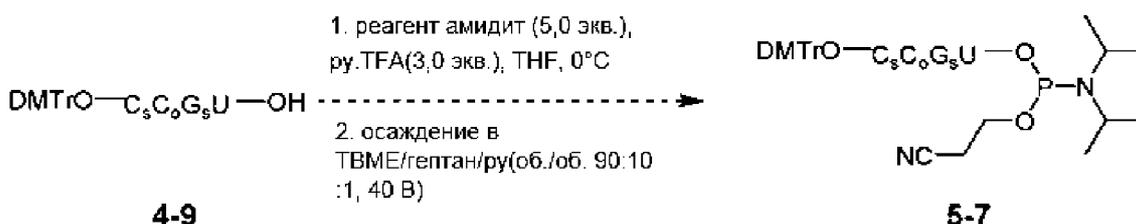
3,70, 20,00 80,00 0,51 ---

4,00, 10,00 90,00 0,51 ---

4,20, 60,00 40,00 0,51 ---

5,00, 60,00 40,00 0,51 ---

**Общая методика получения соединения 5-7.**

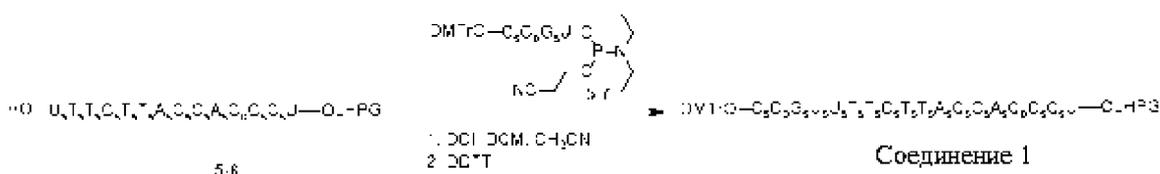


**[0430]** В круглодонную колбу на 2000 мл добавляли соединение **4-9** (130 г, 57,8 ммоль, 1,0 экв.), реагент амидит (87,2 г, 289 ммоль, 91,9 мл, 5,0 экв.) в безводном ТГФ (520 мл) и охлаждали до 0°C на ледяной бане в течение 30 мин. Добавляли активатор Ру-ТФУ (33,5 г, 173 ммоль, 34,2 мл, 3,0 экв.) и затем реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа. ВЭЖХ показала, что исходный материал полностью израсходован.

**[0431]** К раствору сырого продукта из воронки медленно добавляли растворитель ТВМЕ/ГЕПТАН/Ру (95/5/1, 15850 мл) для проведения процесса осаждения. Этот процесс занял около 30 минут. Чистый продукт собирали в виде не совсем белого твердого вещества с предыдущей стадии, слой продукта промывали чистым ТВМЕ (500 мл × 3) и сушили в высоком вакууме в течение 3 часов.

**[0432]** Соединение **5-7** (133 г, выход 93,9%) получали в виде белого твердого вещества.

**Общая методика получения соединения 1, полностью защищенного ASO 9**



[0433] К соединению **5-6** (242 г, 32,5 ммоль, 1,0 экв.), соединению **5-7** (135 г, 55,2 ммоль, 1,7 экв.) и молекулярному сити 3Å (80,0 г) в круглодонной колбе добавляли безводный ДХМ (1200 мл, H<sub>2</sub>O <50 ч./млн) и АСN (600 мл, H<sub>2</sub>O <50 ч./млн) под давлением Ar. Смесь перемешивали при 15°C в течение 1 часа, а затем к смеси добавляли DCI (9,60 г, 81,2 ммоль, 2,5 экв.). Смесь перемешивали при 15 °С в течение 1 часа. Завершение реакции подтверждали с помощью ТСХ.

[0434] После завершения реакции сочетания к смеси добавляли DDTT (11,3 г, 55,2 ммоль, 1,7 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 15°C в течение 10 минут. Молекулярные сита 3Å удаляли фильтрованием и реакционную смесь разбавляли 10 л CH<sub>3</sub>CN (выпал светло-желтый твердый осадок). DCM удаляли на роторном испарителе, и светло-желтое твердое вещество собирали и промывали CH<sub>3</sub>CN (500 мл × 3). **Соединение 1** (264 г, выход 82,8%) получали в виде светло-желтого твердого вещества

[0435] В ходе анализа ВЭЖХ и ЖХ-МС с соединения **1** сняли защиту с использованием процедуры аммонолиза (NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O), описанной ниже, с получением **1-а** (**DMTrO-CsCoGsUsUsTsCsTsTsAsCsCsAsCoCsCsU-OH**) ВЭЖХ и ЖХ-МС для соединения **1-а** показаны на ФИГ. 9.

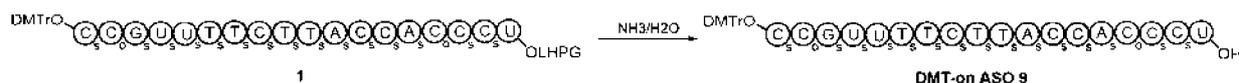
[0436] Метод ВЭЖХ-МС для **1-а**:

- Колонка: колонка ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 мкм, 2,1 мм × 50 мм.
- Температура колонки: 50°C
- Режим ионизации: ионизация электрораспылением при атмосферном давлении (API-ES)
- Диапазон масс от 1350 до 2300;
- Полярность МС: отрицательная
- Подвижная фаза А: 5 мМ ТВuAA в 10% CH<sub>3</sub>CN, 1 мкМ ЭДТА; Раствор В: 5 мМ ТВuAA в 80% CH<sub>3</sub>CN, 1 мкМ ЭДТА;
- Градиент:

Время	А	В	Поток	Давление
Мин	%	%	мл/мин	бар

0,14,	60,00	40,00	0,51	---
3,70,	20,00	80,00	0,51	---
4,00,	10,00	90,00	0,51	---
4,20,	60,00	40,00	0,51	---
5,00,	60,00	40,00	0,51	---

#### Снятие защиты и аммонолиз соединения **1**, полностью защищенный ASO 9



[0437] В колбу объемом 1 л добавляли соединение **1** (64 г) и CH<sub>3</sub>CN:Et<sub>3</sub>N (640 мл, об./об.). Смесь перемешивали при 25°C в течение двух часов, затем растворители удаляли с помощью Rotovar. В колбу добавляли 500 мл NH<sub>4</sub>OH (~ 30% масс.) и смесь перемешивали при 25 °С в течение ~ 30 мин. Полученный раствор переносили в стеклянную колбу под давлением на 1 л, и смесь нагревали до 65 °С в течение 5 часов. Смесь охлаждали до температуры окружающей среды для последующей очистки.

### ***Процесс очистки ASO 9:***

**[0438]** DMT-оп ASO 9 из аммонолиза (2 л) разбавляли 1111 мМ раствором сульфата аммония (18 л) до конечной концентрации сульфата аммония ~ 1000 мМ. Затем суспензию фильтровали через глубинный фильтр, который увлажняли, промывали и уравнивали 3 объемами слоя раствора (1000 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5).

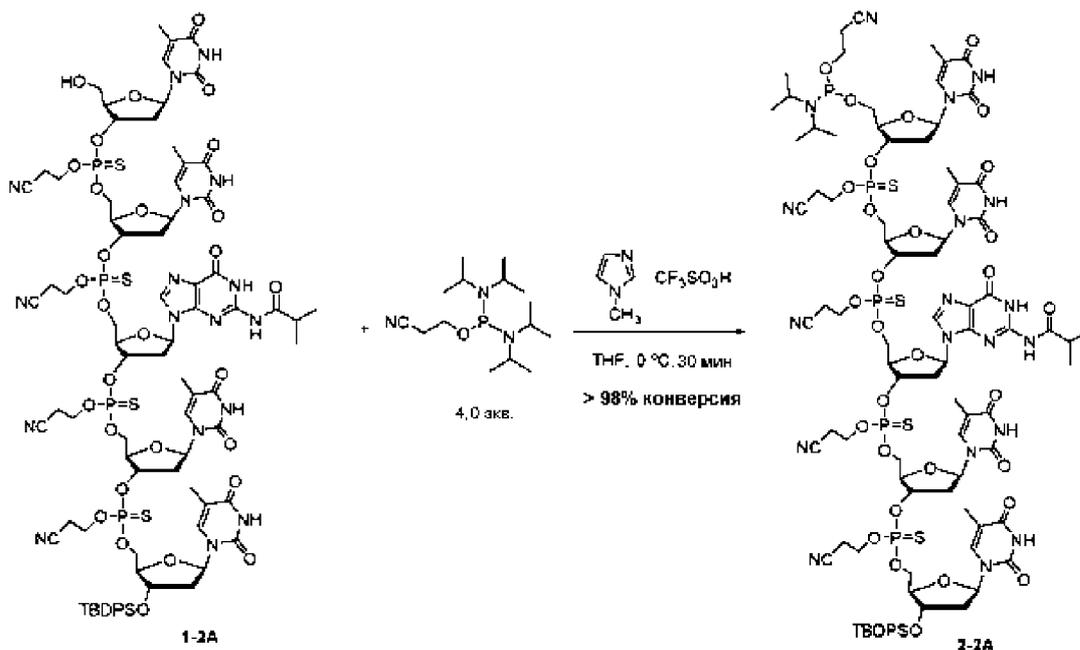
**[0439]** Для стадии хроматографии гидрофобного взаимодействия (НІС) колонку НІС с высотой слоя 20 см (ВН) и внутренним диаметром 14 см (ID) уравнивали 4 объемами колонки (CV) уравнивающего буфера (1000 мМ сульфат аммония, 50 мМ трис, pH 8,5). Фильтрат из глубинного фильтра загружали в колонку. В колонку наносили 4 CV буфера (1000 мМ сульфат аммония, 50 мМ трис, pH 8,5), промывали буфером (800 мМ сульфат аммония, 50 мМ трис, pH 8,5) со скоростью 100 см/час до тех пор, пока УФ-вентиль (проточная ячейка 2 мм) не попадал в точку 0,5 АЕ. Как только УФ-вентиль достиг 0,5 АУ, колонку промывали еще 2 CV того же буфера (800 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5). На стадии промывки скорость потока составляла 100 см/час. Колонку элюировали 8 объемами буфера (50 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5) для получения DMT-оп ASO 9. Колонку промывали 4 объемами деионизированной воды. Колонку очищали 3 CV 1 н. гидроксида натрия и хранили в 0,1 н. гидроксиде натрия. Процесс НІС проводили со скоростью 200 см/час, за исключением промывки, которая выполнялась со скоростью 100 см/час.

**[0440]** Элюат НІС (~ 9 л), содержащий DMT-оп ASO 9, охлаждали до 10°C и добавляли раствор (0,9 л) 25% (мас./мас.) лимонной кислоты, чтобы довести pH смеси до 2,7. Эту смесь перемешивали при 10 °С в течение 4,5 часов и добавляли 5 н. гидроксид натрия (0,8 л), чтобы получить pH 8,5. Затем смесь фильтровали для удаления побочного продукта DMT-ОН с использованием стерилизующего фильтра 0,22 мкм. Затем фильтрат очищали анионообменной хроматографией.

**[0441]** Для анионообменной хроматографии (АЕХ) в колонку АЕХ 15 см ВН x 14 см ID загружали 2 CV высокосолевого буферного раствора (2000 мМ хлорида натрия, 250 мМ трис, pH 8,5) и уравнивали 4 CV буферного раствора для уравнивания. (100 мМ хлорид натрия, 50 мМ трис, pH 8,5). Фильтрат со стадии детритилирования разбавляли водой до проводимости ~ 20 мСм и загружали в колонку. Колонку промывали буферным раствором (300 мМ хлорид натрия, 50 мМ трис, pH 8,5) до тех пор, пока значение УФ-затвора (проточная ячейка 2 мм) не достигло 0,4 АУ. Колонку непрерывно промывали еще 4 CV того же буфера (300 мМ хлорид натрия, 50 мМ трис, pH 8,5). Колонку элюировали 7 CV буфера (525 мМ хлорид натрия, 50 мМ трис, pH 8,5) с получением раствора ASO 9. Колонку очищали 4 CV буфера (2000 мМ хлорид натрия, 250 мМ трис, pH 8,5), а затем очищали 3 CV 1 н. гидроксида натрия и хранили в 0,1 н. гидроксиде натрия. Процесс АЕХ выполнялся со скоростью 200 см/час. ВЭЖХ-МС для ASO 9 показана на ФИГ. 12.

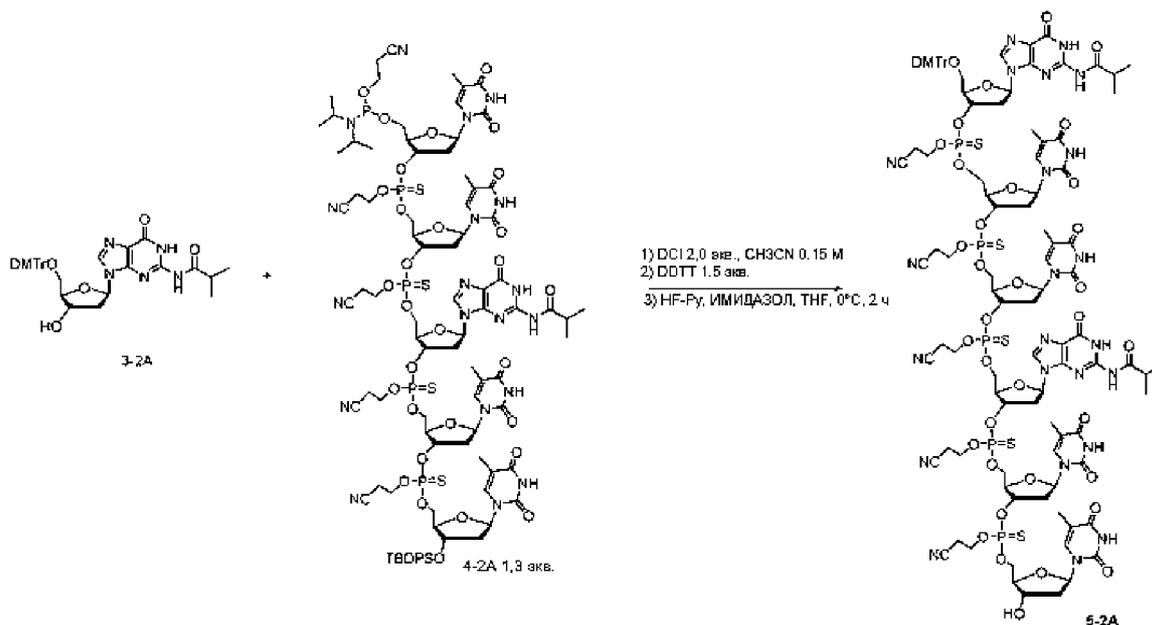
### ***Пример 2. Синтез ASO с использованием стратегии удлинения от 5'-конца к 3'-концу (10-мерный)***

#### ***1. Общий синтез 5' Р-амидитового фрагмента (5-мерного)***



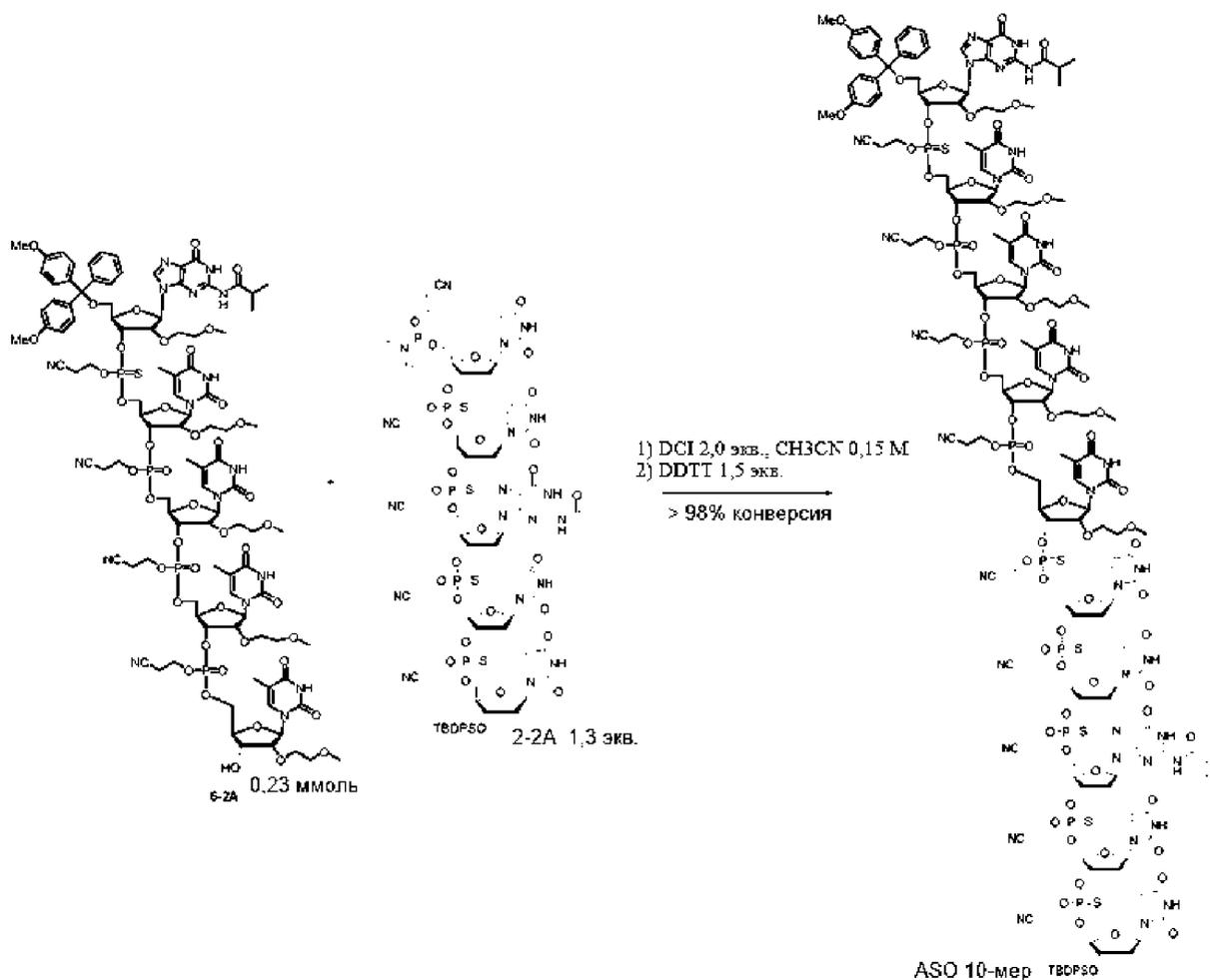
[0442] Исходя из **1-2A** и фосфорамидита, соединение **2-2A** было получено с выходом > 98% с использованием процедуры, аналогичной описанной выше для синтеза соединения **1-8a**.

## 2. Синтез ASO 6-мера.



[0443] Соединение **4-2A** сочетали с соединением **3-2A** с получением 6-мера (соединение **5-2A**) с выходом > 98%, используя процедуру, аналогичную описанной выше для синтеза фрагмента **1-9**, с последующей процедурой десилилирования, описанной в стадии 3 из **4-9** синтеза. Масс-спектр 6-мера ASO перед десилилированием показан на фиг. 13.

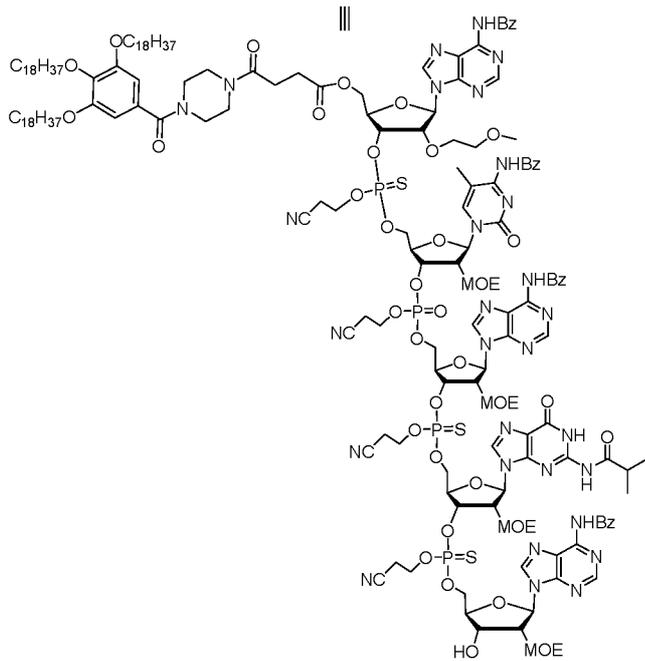
## 3. Синтез 10-мерного ASO



**[0444]** 5-мерный ASO 6-2A был связан с 5-мерным фрагментом **2-2A** с получением 10-мерного ASO с выходом > 98% с использованием процедуры, аналогичной описанной выше для синтеза фрагмента **1-9**. Масс-спектр 10-мера ASO показан на ФИГ. 14.

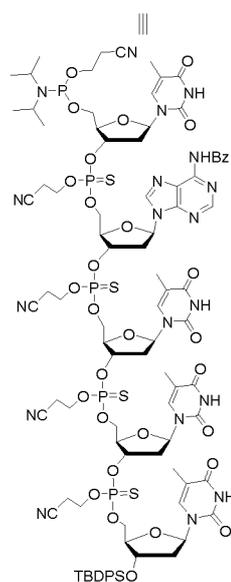
**4. Конвергентный синтез 15-мерного ASO 5'-ACoAGATATTTTTGTT-3'-OH.**

**5'-LHPG-ACoAGA-3'-OH**

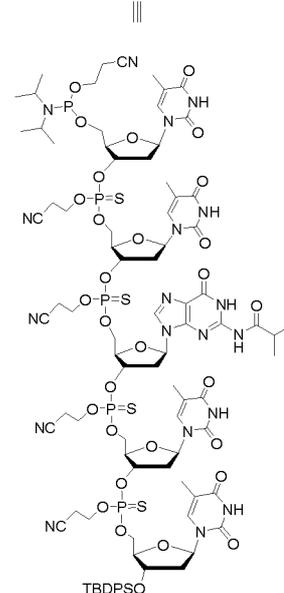


1-3A

**5'-P-TATTT-3'-OTBDPS    5'-P-TTGTT-3'-OTBDPS**

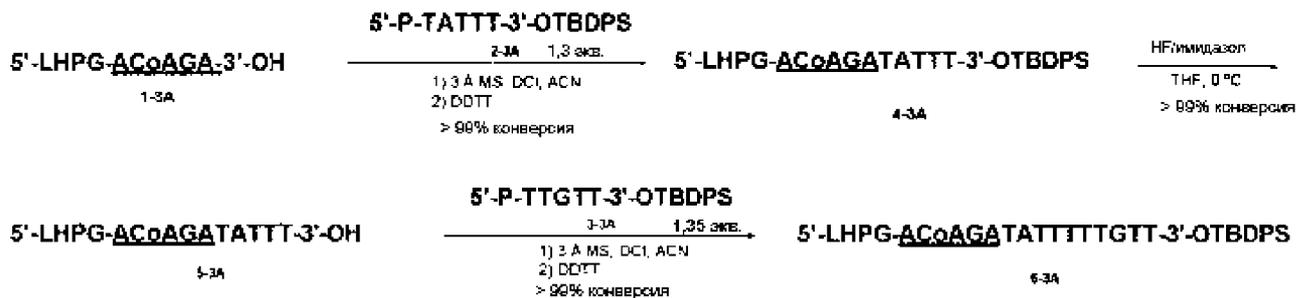


2-3A



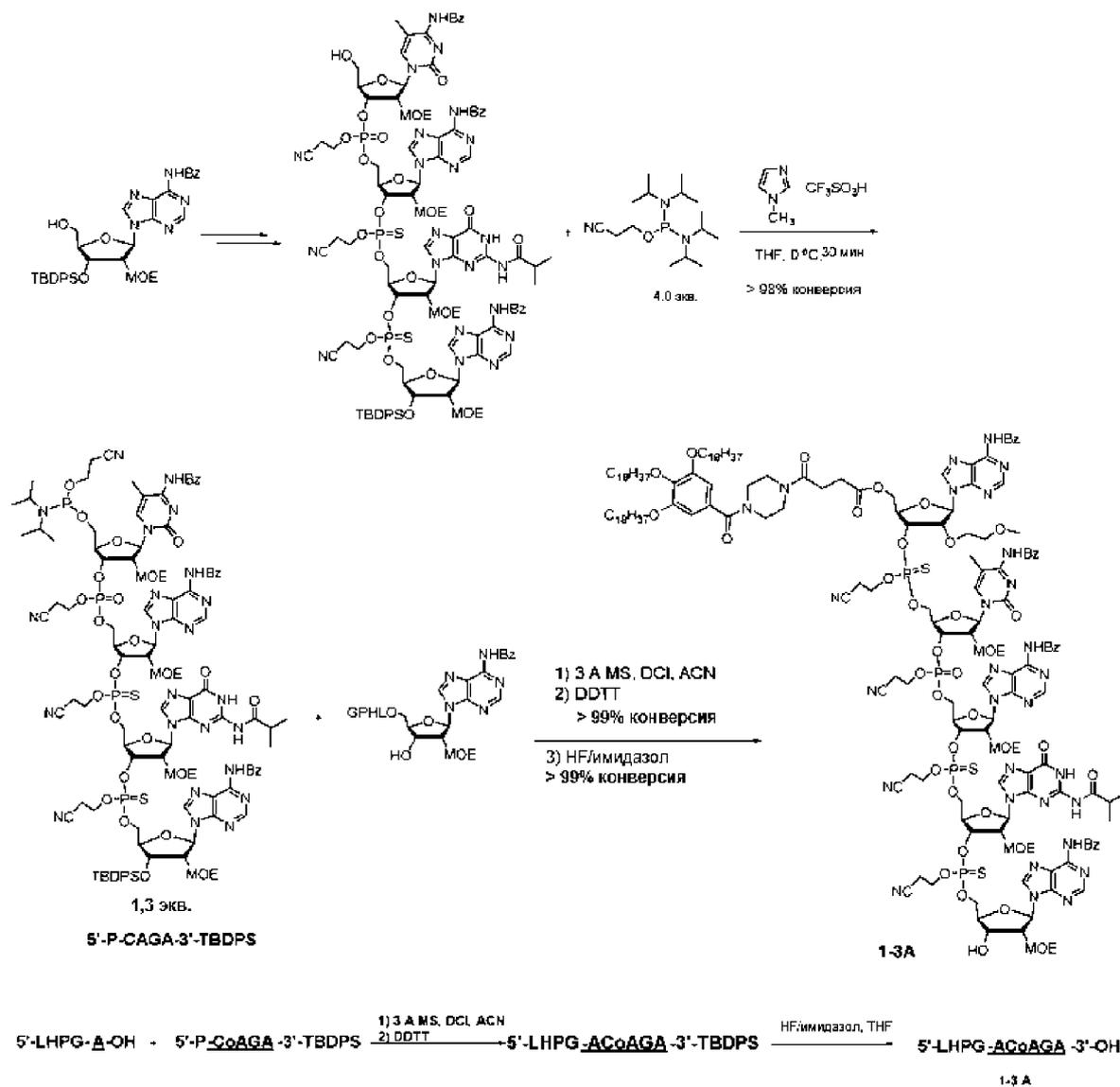
3-3A

**Подчеркнутые буквы: MOE-нуклеотиды, о окислен (фосфодиэфирная связь), все другие атомы фосфора тиглированы (фосфоротиоаты).**

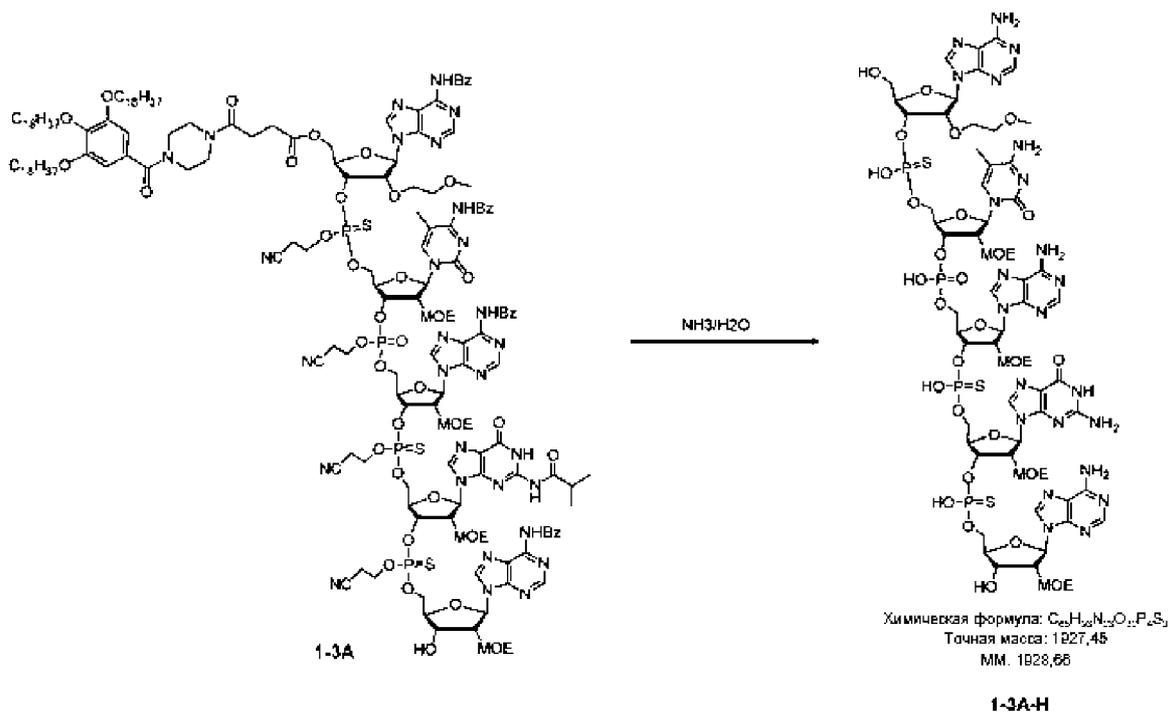


**[0445]** ASO 15-мер был синтезирован на основе метода конвергентного синтеза, показанного на схеме выше, с использованием процедур, аналогичных описанным выше. В конвергентном синтезе используются три фрагмента: 5'-LHPG-ACoAGA-3'-OH (фрагмент 1); 5'-P-TATTT-3'-OTBDPS (фрагмент 2); и 5'-P-TTGTT-3'-OTBDPS (фрагмент 3).

1) Синтез фрагмента 1: 5'-LHPG-ACoAGA-3'-OH (1-3A)



[0446] Фрагмент 1 (соединение **1-3A**) был синтезирован, как показано на схеме выше, с использованием процедур, аналогичных описанным выше. Масс-спектр фрагмента 1 со снятой защитой (соединение **1-3A-H**) показан на ФИГ. 15.



2) *Синтез фрагмента 2: 5'-P-TATTT-3'-OTBDPS (соединение 2-3A)*

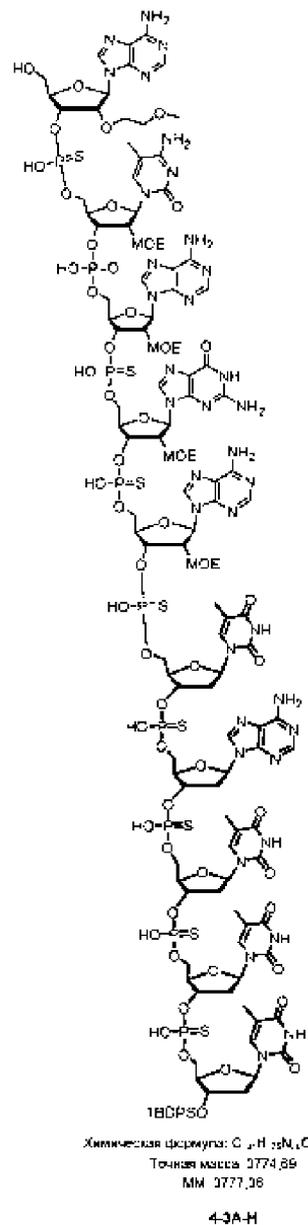
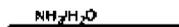
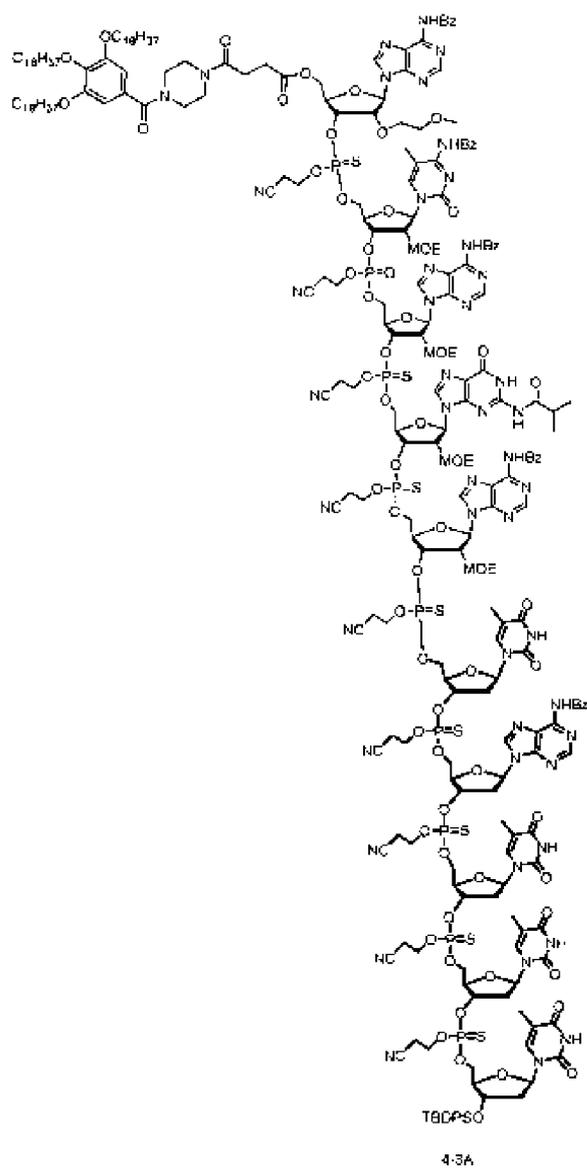
Фрагмент 2 был синтезирован с использованием процедуры, аналогичной описанной выше для синтеза 2-2A.

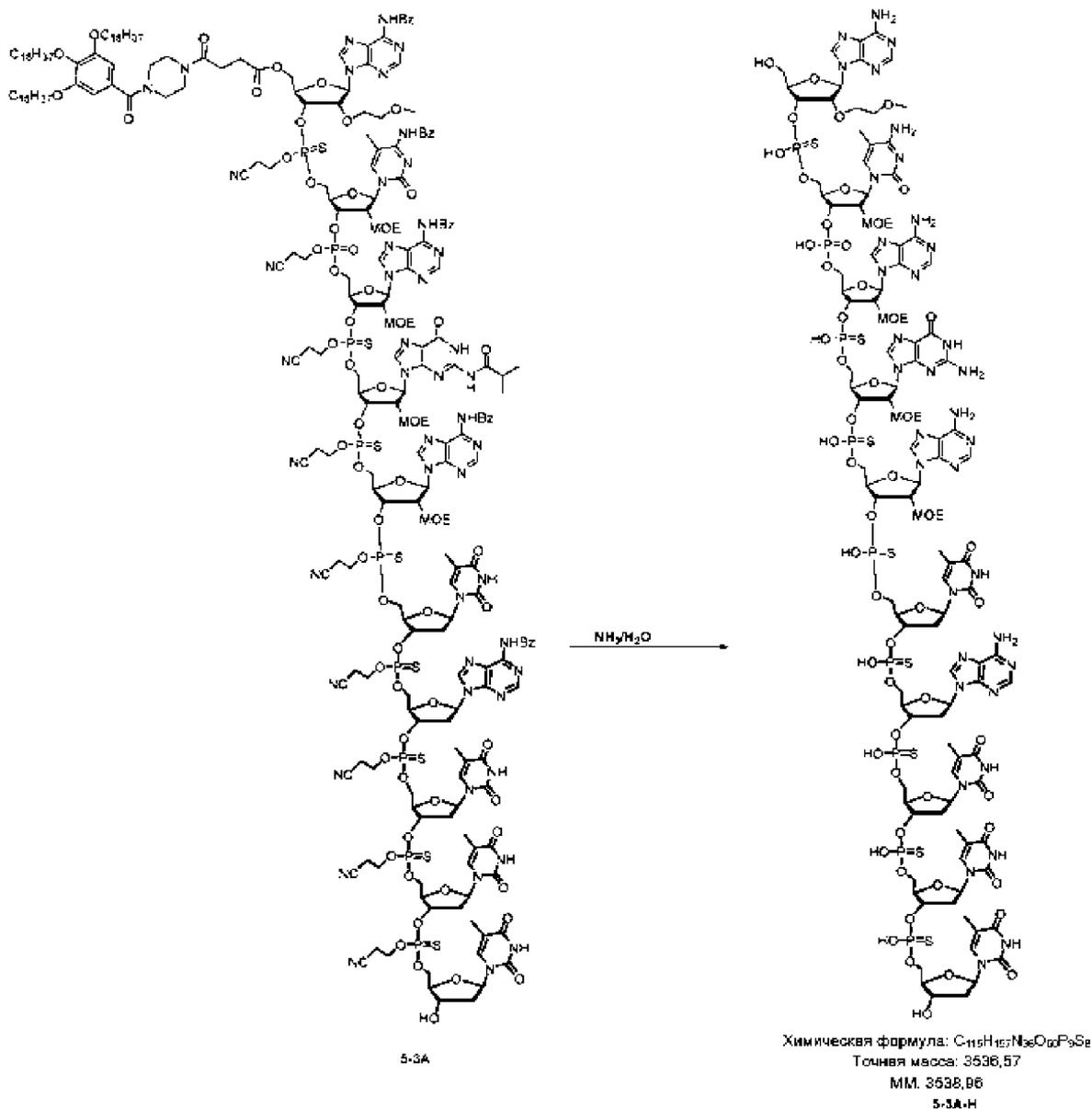
3) *Синтез фрагмента 3: 5'-P-TTGTT-3'-OTBDPS (соединение 3-3A)*

Фрагмент 3 также был синтезирован с использованием процедуры, аналогичной описанной выше для синтеза 2-2A.

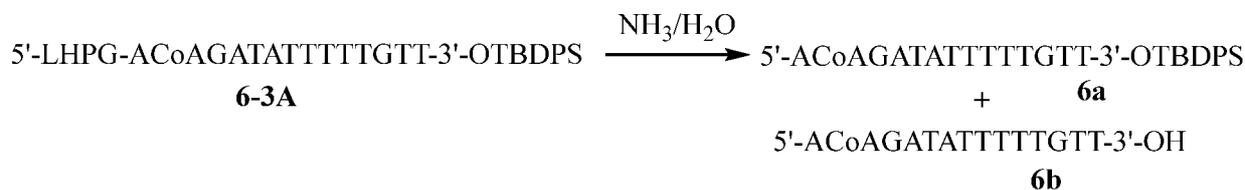
4) *Конвергентный синтез ASO 15-мера:*

ASO 15-мер был синтезирован с использованием способа жидкофазного конвергентного синтеза, описанного в данном документе. Фрагмент 1 и фрагмент 2 были соединены с последующей сульфурризацией с образованием соединения **4-3A**. Десилилирование соединения **4-3A** для удаления группы 3'-TBDPS давало соединение **5-3A**, которое затем было связано с фрагментом 3 с последующей сульфурризацией с получением 15-мерного соединения ASO **6-3A**. Образование **4-3A** и **5-3A** было подтверждено анализом ЖХ-МС соответствующего продукта **4-3A-H** и **5-3A-H** со снятой защитой, который был образован обработкой соединения **4-3A** или **5-3A** с помощью  $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ . Масс-спектр соединений **4-3A-H** и **5-3A-H** показан на ФИГ.16 и ФИГ. 17 соответственно. Реакции аммонолиза соединений **4-3A** и **5-3A** показаны ниже:





5) Снятие защиты и аммонолиз ASO 15-мер **6-3A**



Используя аналогичную процедуру снятия защиты и аммонолиза, как описано выше для синтеза DMT-on ASO 9, обработка ASO 15-мер **6-3A** с  $\text{NH}_4\text{OH}$  привела к смеси **6a** и **6b**, что указывает на полное удаление защитной группы 5'-LHPG. и частичное удаление группы TBDPS на 3'-конце (см. ФИГ. 18)

### Пример 3: Исследование дезаминирования во время снятия защиты 5'OH:

Исследование детритилирования тримера UCC и димера CC

#### 1. Исследование дезаминирования тримера UCC:

[0447] Детритилирование УСС тримера изучали в различных условиях реакции, чтобы определить лучшие условия и реагенты, необходимые для минимизации побочной реакции дезаминирования. В Таблице 1 показано сравнение различных условий реакции и количества нежелательного продукта дезаминирования в этих условиях. Как видно на ФИГ 9, использование **3А молекулярных сит** и **гашение реакции** пиридином привело к дезаминированию <0,5% по сравнению с 7% дезаминированием без сит и 10% дезаминированием без сит и без гашения пиридином.

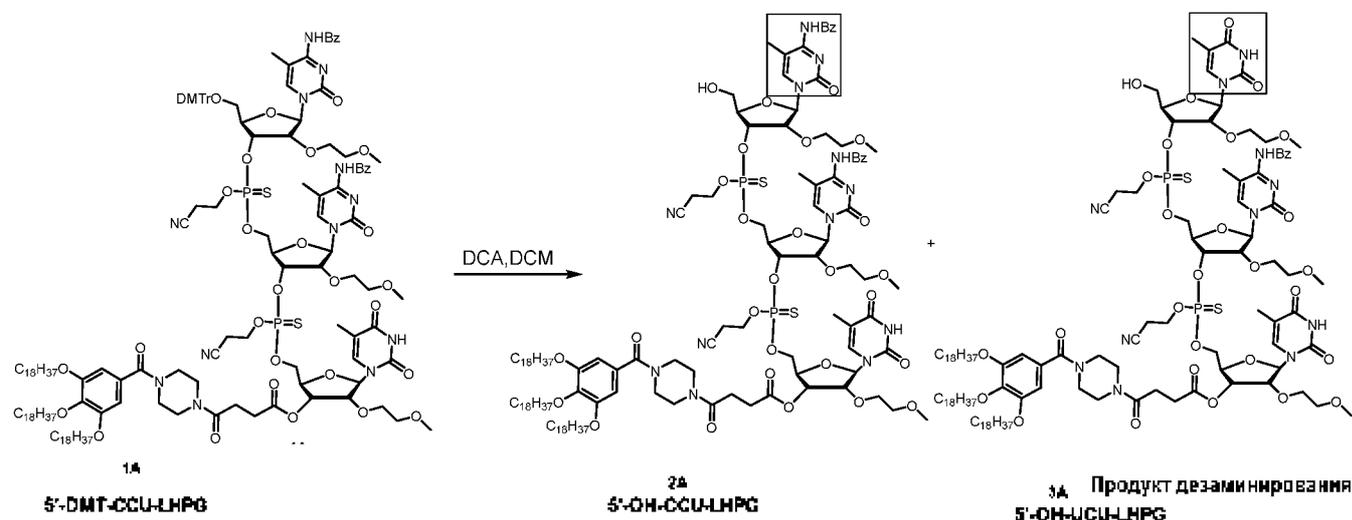


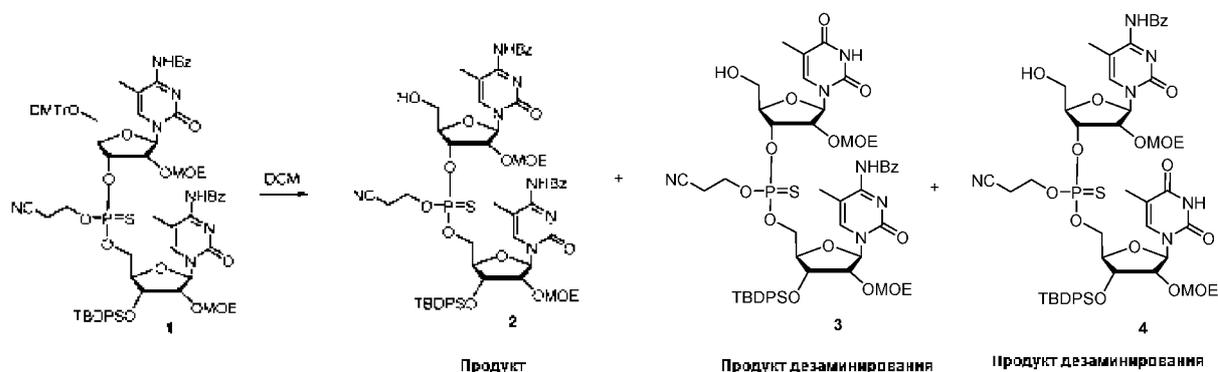
Таблица 1: Сравнение условий реакции и продукта дезаминирования для тримера УСС

	Условия реакции	Продукт дезаминирования
5'-DMT-CCU-LHPG	12 экв. DCA, DCM для ВЭЖХ, реакция при нулевой степени, гашение $\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}$	10% дезаминирование (ФИГ.10, запись 1)
5'-DMT-CCU-LHPG	12 экв. DCA, DCM для ВЭЖХ, реакция при нулевой степени, гашение пиридином	7% дезаминирование
5'-DMT-CCU-LHPG	12 экв. DCA, безводный ДХМ, <b>добавить 5% (об./об. к ДХМ) молекулярное сито 3А</b> , реакция при нулевой степени, гашение пиридином	0,5% дезаминирование (ФИГ.10, запись 2)

## 2. Исследование дезаминирования димера СС:

[0448] Подобно вышеупомянутому исследованию, проведенному для тримера УСС, детритилирование димера СС проводили с различными реагентами и условиями, чтобы минимизировать или избежать реакции дезаминирования. Как видно из таблицы 2 и на ФИГ. 11, продукт дезаминирования не обнаруживался через

14 часов при комнатной температуре даже при добавлении воды, когда использовались сита с DCA, тиолом и 3Å молекулярными ситами. С другой стороны, было получено 4,46% продукта дезаминирования без добавления молекулярных сит и воды и 49% продукта дезаминирования с водой, но без молекулярных сит при перемешивании в течение 14 часов при комнатной температуре.



**Таблица 2: Сравнение условий реакции и продукта дезаминирования для СС-димера**

	ДХМ	ДСА/Тиоло л/Н2О	45 мин 0°С	120 мин 0°	к.т. 14 ч
5'-DMTr-Мое- СС-TBDPS	14 мл	ДСА 8 экв. Тиол 1,5 экв.	Дезаминирование Не обнаружен	Дезаминировани е Не обнаружен	4,46% Дезамини рование
500 мг 5'-DMTr-Мое- СС-TBDPS	7 мл	ДСА 8 экв., Тиол 1,5 экв. Н <sub>2</sub> О 14 мг, (2.4 экв, 1500 ч./млн)	0.47% (254 нм) Дезаминирование	1.31% (254 нм) Дезаминировани е	49% (254 нм) Дезамини рование
500 мг 5'-DMTr-Мое- СС-TBDPS	7 мл	ДСА 8 экв., Тиол 1,5 экв. Н <sub>2</sub> О 14 мг, (2.4 экв, 1500 ч./млн), ДСА 8 экв Молекулярн ые сита 3Å 350 мг	Дезаминирование Не обнаружен	Дезаминировани е Не обнаружен	Дезамини рование Не обнаруже н

### 3. Результаты исследования дезаминирования детритилирования при синтезе фрагментов

[0449] Пятимерный МОЕ DMTO-AC<sub>6</sub>CCU-OH (из DMTO-ACCCU-OLHPG) содержал ~ 10% примесей дезаминирования (**Ia**, **Ib**, и **Ic** вместе взяты, соотношение не определено) (Схема А).

**Схема А. Высокие уровни примесей дезаминирования в DMTO-ACCCU-OLHPG**

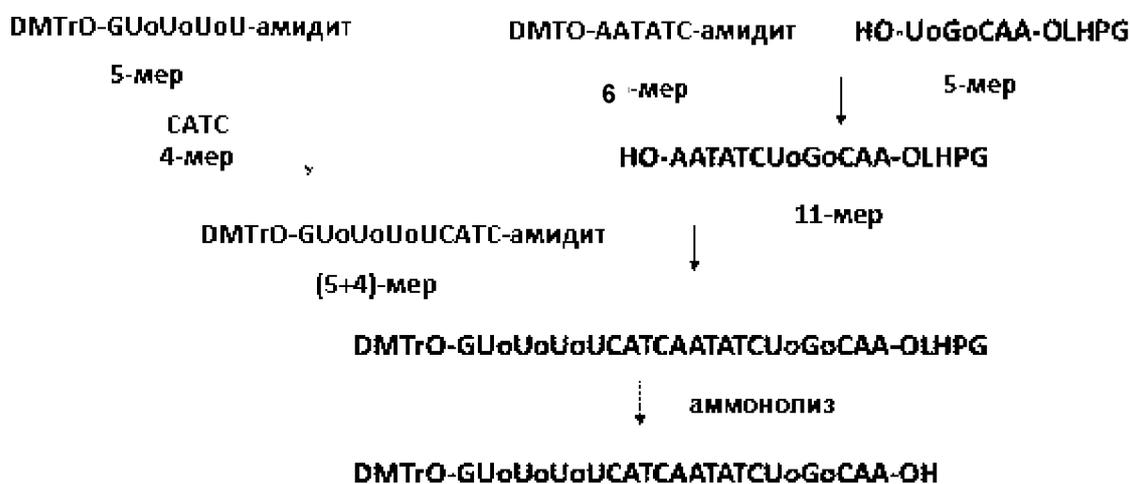


экспт	Этап 3. Обработка реакционной смеси детритилированием перед добавлением кислоты	Продукт (% УФ-области)	Ia+Ib+Ic (% УФ-области)
DMTO-AC <sub>6</sub> CCU	Без сушки 3 Å МС	90	10
DMTO-AC <sub>6</sub> CCU	Сушеный при 3 Å МС в течение 1 ч.	100	< 0.5%

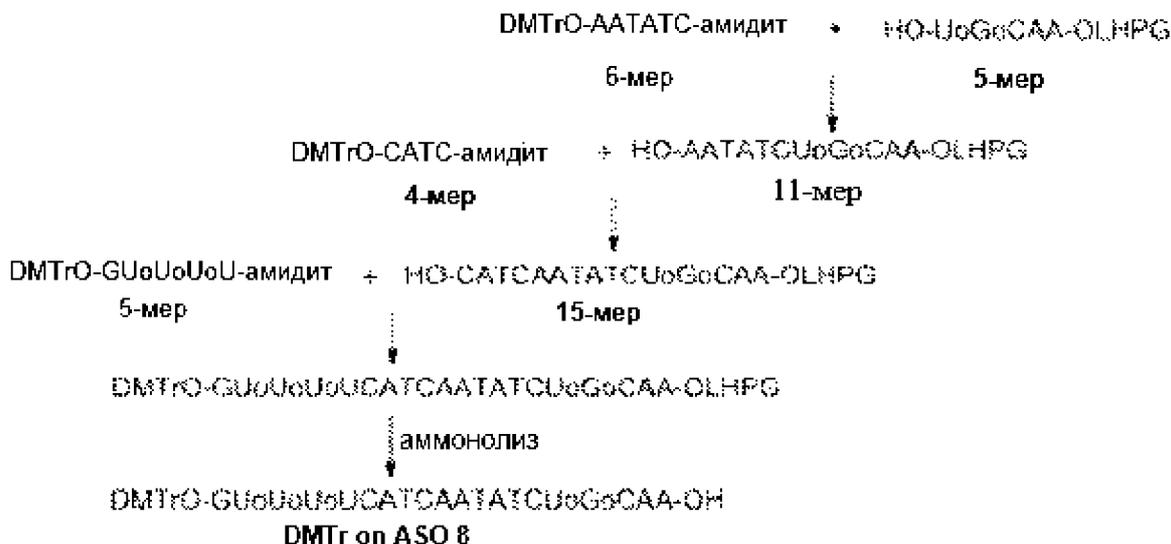
**Пример 4. Синтез ASO 8**

[0451] Полностью защищенный ASO 8, имеющий группу DMT на 5'-конце и группу LHPS на 3'-конце, был получен с использованием аналогичных процедур, описанных в Примере 1 для ASO 9. Олигонуклеотидные фрагменты, используемые для синтеза, показаны на схемах ниже.

1. Синтез соединения ASO 8 методом 5 + 6 +(4 + 5) сочетания



2. Синтез соединения ASO 8 методом 5 + 6 + 4 + 5 сочетания



[0452] DMT-на ASO 8 был детритилирован и очищен с использованием процедур, аналогичных описанным в Примере 1 для ASO 9. ВЭЖХ-МС для ASO 8 показана на ФИГ.19.

[0453] Метод ВЭЖХ-МС для ASO 8:

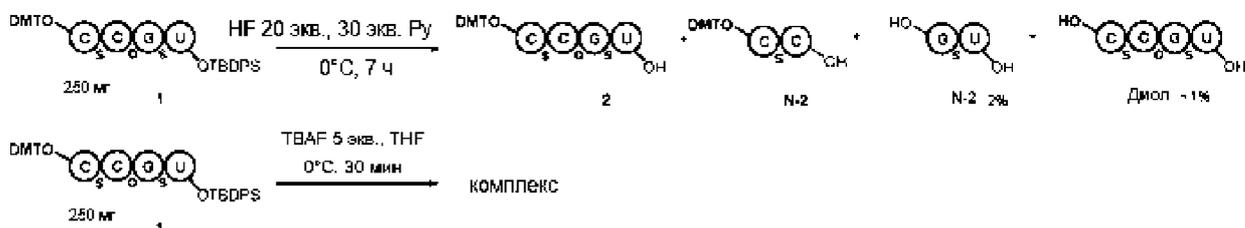
- Колонка: колонка ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 мкм, 2,1 мм × 50 мм.
- Температура колонки: 50°C
- Режим ионизации: ионизация электрораспылением при атмосферном давлении (API-ES)
- Диапазон масс от 1350 до 2300;
- Полярность МС: отрицательная
- Подвижная фаза А: 5 мМ ТВuAA в 10% CH<sub>3</sub>CN, 1 мкМ ЭДТА; Раствор В: 5 мМ ТВuAA в 80% CH<sub>3</sub>CN, 1 мкМ ЭДТА;
- Градиент:

Время	А	В	Поток	Давление
Мин	%	%	мл/мин	бар
0,14,	60,00	40,00	0,51	---
3,70,	20,00	80,00	0,51	---
4,00,	10,00	90,00	0,51	---
4,20,	60,00	40,00	0,51	---
5,00,	60,00	40,00	0,51	---

### Пример 5. Исследование десилилирования

[0454] Новый простой, мягкий и чистый метод снятия защиты 3'-OTBDPS был разработан для минимизации образования примесей. Было обнаружено, что присутствие имидазола значительно ускоряет снятие защиты TBDPS и производит наименьшее количество примесей. Сравнительное исследование, описанное ниже, показывает, что десилилирование в известных условиях привело к образованию различных побочных продуктов, таких как побочные продукты N-2 и диола. Напротив, новый метод десилилирования приводит к значительному сокращению этих побочных продуктов.

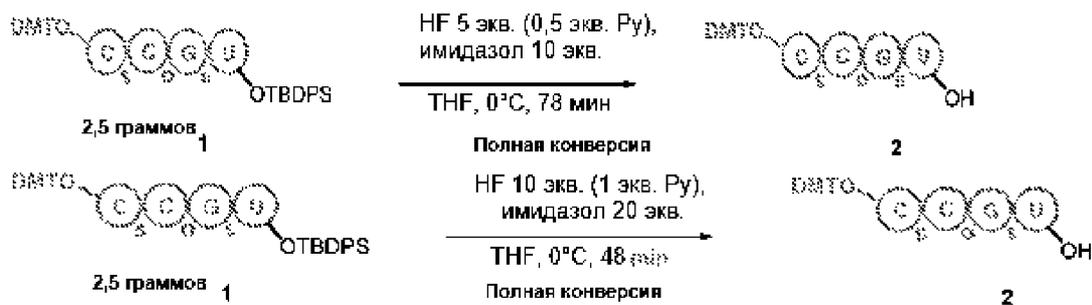
a. Десилилирование тетрамера CCGU с использованием известных условий десилилирования:



[0455] 250 мг тетрамера CCGU обрабатывали 20 экв. HF и 30 экв. пиридина при 0 °С в течение 7 часов. Наблюдались побочные продукты N-2 и диола. Реакции десилилирования другими известными методами, такими как TBAF или CsF, приводят к сложной смеси.

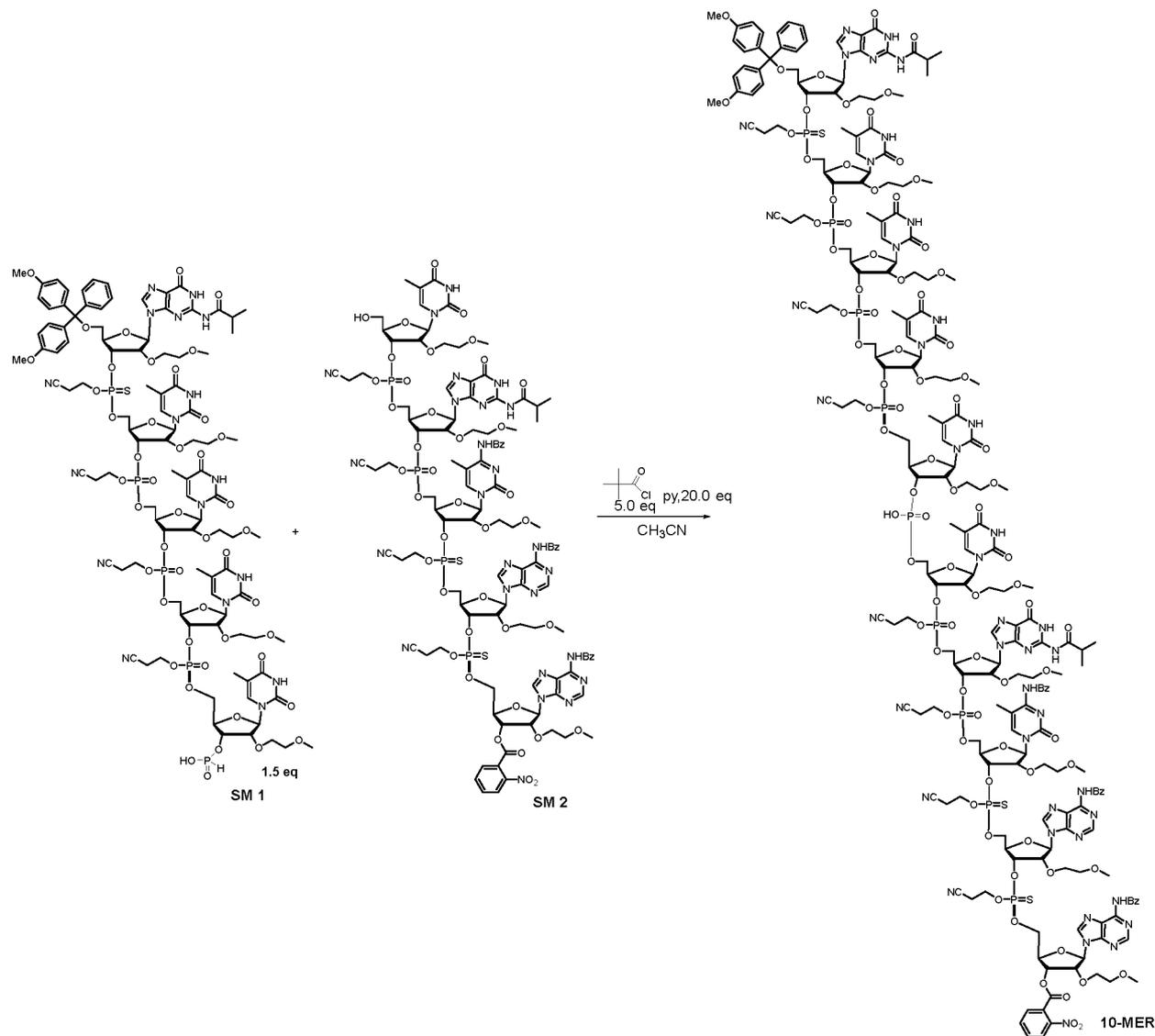
[0456] Присутствие побочных продуктов N-2 и диола может значительно влиять на чистоту конечных олигонуклеотидов-мишеней.

b. Десилилирование тетрамера CCGU в условиях десилилирования HF/имидазола:



[0457] В отличие от реакций десилилирования, проводимых в известных условиях, описанных выше, десилилирование с помощью HF/имидазола приводило к завершению реакции десилилирования за 2 часа с наблюдаемым менее 0,5% диола и побочных продуктов N-2. Кроме того, для достижения полной конверсии исходного материала требовалось только 5 эквивалентов HF по сравнению с 20 эквивалентами HF, необходимыми для известных условий десилилирования.

**Пример 6. Синтез 5'-DMT-GUUUUUGCAA-NO<sub>2</sub>-бензоила методом химии Н-фосфоната**



**[0458] SM 1** (3.78 г) и **SM 2** (2.64 г) растворяли в 20 мл CH<sub>3</sub>CN. При 0 °С к смеси медленно добавляли 2,4 мл пиридина и 0,62 мл пивалоилхлорида. После перемешивания при 0 °С в течение 40 минут к смеси добавляли I<sub>2</sub>/py (0,05 М 40 мл). После перемешивания при 0 °С в течение 30 минут реакцию гасили раствором Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O и получали 5'-DMT-GUUUUUGCAA-NO<sub>2</sub>-бензоил в виде светло-желтого твердого вещества. Структура 5'-DMT-GUUUUUGCAA-NO<sub>2</sub>-бензоил была подтверждена с помощью МС (см. ФИГ. 20).

**Пример 7. Оценка возможности конвергентного жидкофазного синтеза аналогов ASO 9 с различными связями PO/PS**

**[0459]** Метод ВЭЖХ (А).

**Колонка:** Xbridge Shield RP18 5 мкм, 2,1 мм × 50 мм.

**Температура колонки:** 40°С;

**Мобильные фазы:(Подвижные фазы:)**

Раствор А: 10 мМ водный раствор NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>.

Раствор В: 100% ацетонитрил

**Градиент:**

Время	А	В	Поток	Давление
Мин	%	%	мл/мин	бар
0,01,	90,00	10,00	0,80	---
8,00,	20,00	80,00	0,80	---
9,00,	20,00	80,00	0,80	---
9,01,	90,00	10,00	1,20	---
10,00,	90,00	10,00	1,20	---

**[0460]** Метод ВЭЖХ (В).

**Колонка:** Xbridge C18 3,5 мкм, 4,6 мм × 150 мм.

**Температура колонки:** 40°С;

**Мобильные фазы:(Подвижные фазы:)**

Раствор А: 10 мМ водный раствор NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>.

Раствор В: 100% ацетонитрил

**Градиент:**

Время	А	В	Поток	Давление
Мин	%	%	мл/мин	бар
0,00,	50,00	50,00	1,00	---
15,00,	0,00	100,00	1,00	---
15,01,	50,00	50,00	1,00	---
20,00,	50,00	50,00	1,00	---

**[0461]** Метод ВЭЖХ (С).

**Колонка:** Xbridge Shield RP18 5 мкм, 2,1 мм × 50 мм.

**Температура колонки:** 40°С;

**Мобильные фазы:(Подвижные фазы:)**

Раствор А: 10 мМ водный раствор NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>.

Раствор В: 100% ацетонитрил

**Градиент:**

Время	А	В	Поток	Давление
Мин	%	%	мл/мин	бар
-----				
0,01,	100,00	0,00	0,80	---
4,50,	70,00	30,00	0,80	---
5,30,	70,00	30,00	0,80	---
5,31,	100,00	0,00	1,20	---
6,00,	100,00	0,00	1,20	---

**[0462] Метод ВЭЖХ (D).**

**Колонка:** Xbridge Shield RP18 5 мкм, 2,1 мм × 50 мм.

**Температура колонки:** 40°C;

**Диапазон масс** от 100 до 1000;

**Полярность МС:** отрицательная

**Мобильные фазы:(Подвижные фазы:)**

Раствор А: 10 мМ водный раствор NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>.

Раствор В: 100% ацетонитрил

**Градиент:**

Время	А	В	Поток	Давление
Мин	%	%	мл/мин	бар
-----				
0,01,	95,00	5,00	1,00	---
1,00,	5,00	95,00	1,00	---
1,80,	0,00	100,00	1,00	---
1,81,	95,00	5,00	1,00	---
2,20,	95,00	5,00	1,00	---

**[0463] Метод ВЭЖХ (E).**

**Колонка:** Luna C18 3,0 мкм, 2,0 мм × 30 мм.

**Температура колонки:** 40°C;

**Диапазон масс** от 100 до 2000;

**Полярность МС:** положительная

**Мобильные фазы:(Подвижные фазы:)**

Раствор А: 0,037% водный раствор ТФУ (об./об.).

Раствор В: 0,018% раствор ТФУ (об./об.) в ацетонитриле.

**Градиент:**

Время	А	В	Поток	Давление
Мин	%	%	мл/мин	бар
-----				
0,01,	95,00	5,00	1,00	---
1,00,	5,00	95,00	1,00	---
1,80,	0,00	100,00	1,00	---

1,81, 95,00 5,00 1,20 ---

2,00, 95,00 5,00 1,20 ---

**[0464]** Метод ВЭЖХ (F).

**Колонка:** Xbridge Shield RP18 5 мкм, 2,1 мм × 50 мм.

**Температура колонки:** 40°C;

**Диапазон масс** от 100 до 1000;

**Полярность МС:** положительная

**Мобильные фазы:(Подвижные фазы:)**

Раствор А: 10 мМ водный раствор NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>.

Раствор В: 100% ацетонитрил

**Градиент:**

Время	А	В	Поток	Давление
-------	---	---	-------	----------

Мин	%	%	мл/мин	бар
-----	---	---	--------	-----

-----

0,01,	95,00	5,00	1,00	---
-------	-------	------	------	-----

1,00,	5,00	95,00	1,00	---
-------	------	-------	------	-----

1,80,	0,00	100,00	1,00	---
-------	------	--------	------	-----

1,81,	95,00	5,00	1,00	---
-------	-------	------	------	-----

2,20,	95,00	5,00	1,00	---
-------	-------	------	------	-----

**[0465]** Метод ВЭЖХ-МС (G) для соединений амидита **7-1-6a**, **7-3-10a** и **7-4-8a**.

**Колонка:** колонка ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 мкм, 2,1 мм × 50 мм.

**Температура колонки:** 50°C;

**Диапазон масс** от 500 до 2200;

**Полярность МС:** отрицательная

**Мобильные фазы:(Подвижные фазы:)**

Раствор А: 5 мМ ацетат трибутиламина (ТБуАА) в 10% CH<sub>3</sub>CN, 1 мкМ ЭДТА;

Раствор В: 5 мМ ТБуАА в 80% CH<sub>3</sub>CN, 1 мкМ ЭДТА.

**Градиент:**

Время	А	В	Поток	Давление
-------	---	---	-------	----------

Мин	%	%	мл/мин	бар
-----	---	---	--------	-----

-----

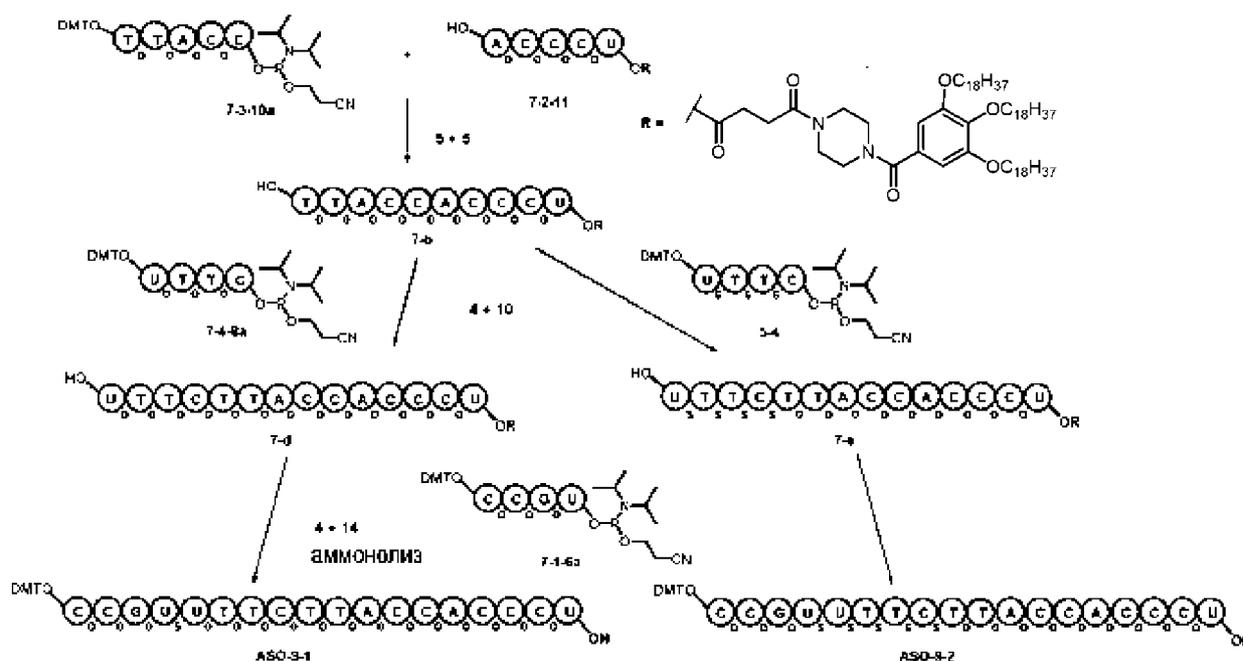
0,20,	92,50	7,50	0,51	---
-------	-------	------	------	-----

9,00,	5,00	95,00	0,51	---
-------	------	-------	------	-----

10,00,	5,00	95,00	0,51	---
--------	------	-------	------	-----

**[0466]** Синтезированы аналоги ASO 9 с различным количеством связей P=O/S.

Синтетическая стратегия доступа к аналогам ASO 9



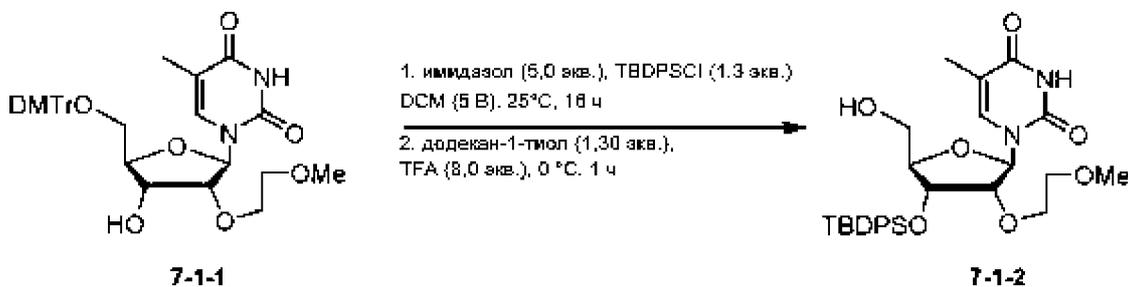
**A. Получение 5' фрагмента**

**1. Получение 5'-DMTr-CCGU-ОН или 5'-ОН-CCGU-TBDPS 4мер (Фрагмент 4)**

*Синтез*

*соединения*

*7-1-2*



[0467] К раствору соединения 7-1-1 (8,50 г, 13,7 ммоль, 1,00 экв.) и имидазола (4,68 г, 68,7 ммоль, 5,00 экв.) в ДХМ (85 мл) добавляли TBDPSCl (4,15 г, 15,1 ммоль, 3,88 мл, 1,10 экв.). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 16 ч. ТСХ (петролейный эфир: этилацетат = 1: 2, продукт:  $R_f = 0,55$ ) показала, что соединение 7-1-1 полностью израсходовалось и образовалось одно новое пятно. Согласно ТСХ, реакция была селективной. Добавляли пропан-2-ол (825 мг, 13,7 ммоль 1,00 экв.), и смесь перемешивали при 25 °С в течение 0,5 часа.

[0468] К вышеуказанному раствору добавляли додекан-1-тиол (7,23 г, 35,7 ммоль, 8,56 мл, 1,30 экв.), охлажденный до 0 °С, а затем добавляли ТФУ (25,0 г, 219 ммоль, 16,2 мл, 8,00 экв.) в реакционную смесь при 0 °С. Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 ч. ТСХ (петролейный эфир: этилацетат = 1:2, продукт:  $R_f = 0,28$ ) показала, что исходный материал был полностью израсходован и образовалось одно новое пятно. Согласно ТСХ, реакция была селективной.

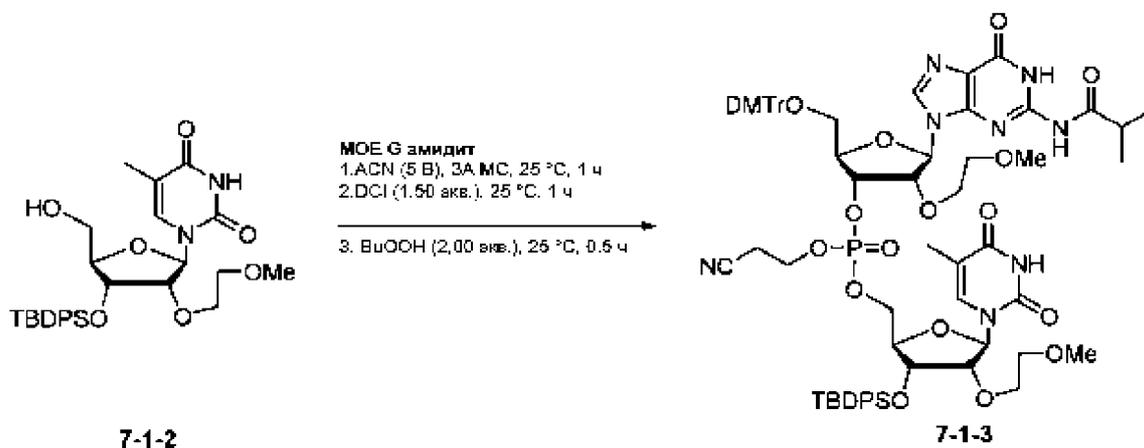
[0469] Реакционную смесь гасили добавлением  $\text{NaHCO}_3$  (500 мл), затем разбавляли ДХМ (100 мл) и экстрагировали  $\text{NaHCO}_3$  (200 мл). Объединенные органические слои промывали 200 мл солевого раствора

(100 мл × 2), сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт растворяли в ДХМ (600 мл) и загружали в делительную воронку на 1000 мл.

**[0470]** Неочищенный продукт растворяли в 100 мл ACN и 50 мл деионизированной воды, смесь экстрагировали гептаном: ТВМЕ = 4: 1 (120 мл × 4). (ТСХ показала, что продукт был чистым в ACN и деионизированной воде). Продукт был в ACN и воде. Смесь экстрагировали ТВМЕ (100 мл), и органический слой сушили и упаривали досуха в виде белого твердого вещества. Соединение **7-2** (14,0 г, 23,4 ммоль, выход 85,1%, чистота 92,7%) получали в виде белой пены.

ВЭЖХ (метод **A**): RT = 3,446 мин; ЖХМС (метод **F**): RT = 1,371 мин; m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 555,3 для соединения **7-1-2**.

### Синтез соединения 7-1-3

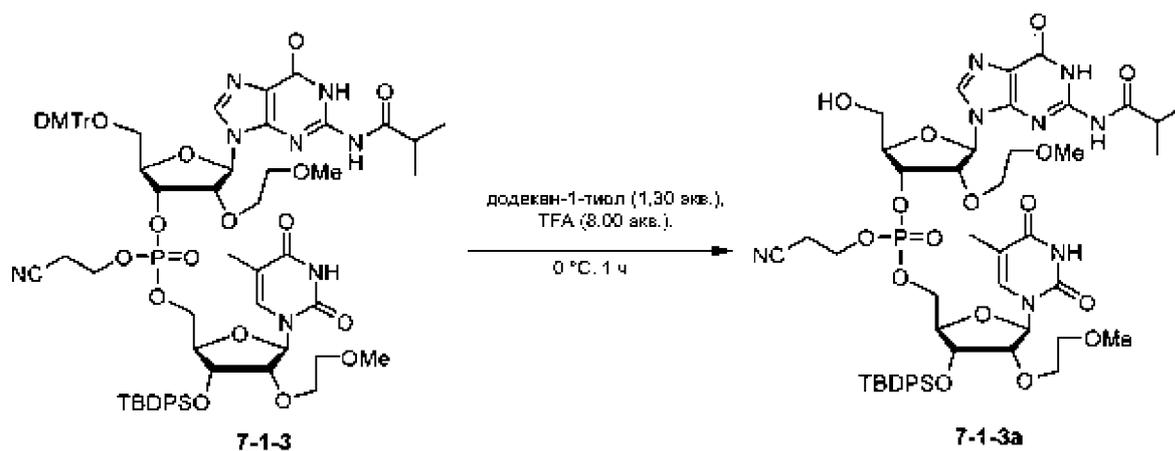


**[0471]** Соединение **7-1-2** (12,0 г, 21,6 ммоль, 1,00 экв.) и **МОЕ G амидит** (21,7 г, 23,8 ммоль, 1,10 экв.) выпаривали совместно с ACN (10 мл × 3) в атмосфере аргона в 250 мл одногорлой круглодонной колбе и молекулярные сита 3Å (3,00 г) добавляли в одногорлую колбу, под давлением аргона ACN (60 мл). Смесь перемешивали при 25 °C в течение 1 ч, а затем к смеси добавляли DCI (3,83 г, 32,4 ммоль, 1,50 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 25 °C в течение 1 ч. ТСХ (дихлорметан: метанол = 15:1, продукт: R<sub>f</sub> = 0,39) показала, что соединение **7-1-2** полностью израсходовалось и образовалось одно новое пятно. Согласно ТСХ, реакция была селективной. ВЭЖХ (продукт: RT = 7,199 мин; исходный материал: RT = 5,194 мин) показала, что соединение **2** полностью израсходовалось

**[0472]** К вышеуказанному раствору добавляли BuOOH (3,90 г, 43,2 ммоль, 4,15 мл, 2,00 экв.). Смесь перемешивали при 25 °C в течение 0,5 ч. ВЭЖХ (**7-1-3**, продукт: RT = 6,869 мин; исходный материал: RT = 7,199 мин) показывает, что реакция завершена. Реакционную смесь выливали в раствор NaHCO<sub>3</sub> и Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (10,0 экв. NaHCO<sub>3</sub> и 5,00 экв. Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> в 400 мл деионизированной воды), а затем разбавляли смесь ДХМ (100 мл), и два слоя разделяли, органический слой промывали NaHCO<sub>3</sub> (200 мл), соевым раствором (200 мл), сушили, фильтровали и упаривали. Соединение **7-1-3** (32,0 г, 18,9 ммоль, выход 87,6%, чистота 82,0%) получали в виде светло-желтой пены.

ВЭЖХ (метод **A**): RT = 6,868 мин; ЖХМС (метод **F**): RT = 1,501, 1,520 мин; m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 1383,5 для соединения **7-1-3**.

### Общая методика получения соединения 7-1-3а



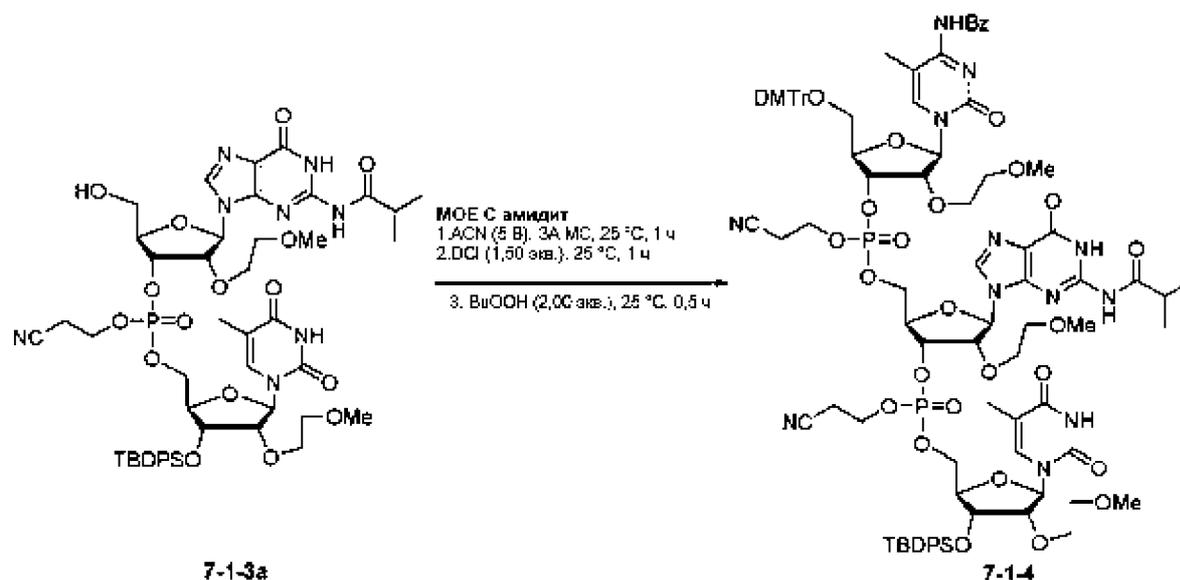
**[0473]** Соединение **7-1-3** (25,0 г, 18,0 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (120 мл) добавляли додекан-1-тиол (4,75 г, 23,4 ммоль, 5,63 мл, 1,30 экв.) при 0 °С, а затем ТФУ (16,4 г, 144 ммоль, 10,7 мл, 8,00 экв.) добавляли к реакционной смеси при 0 °С. Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 ч. ТСХ (дихлорметан: метанол = 10:1, продукт:  $R_f = 0,24$ ) показала, что соединение **7-1-3** полностью израсходовалось и образовалось одно новое пятно. Согласно ТСХ, реакция была селективной.

**[0474]** Реакционную смесь выливали в раствор  $\text{NaHCO}_3$  (10,0 экв.  $\text{NaHCO}_3$  в 300 мл деионизированной воды), а затем разбавляли смесь ДХМ (100 мл) и два слоя разделяли, органический слой промывали  $\text{NaHCO}_3$  (100 мл), соевым раствором (100 мл), сушили, фильтровали и упаривали.

**[0475]** Смесь повторно растворяли в  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (2: 1, 70 мл), и слой  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  промывали гептаном: МТВЕ = 4: 1 (100 мл x 4), а затем разбавляли слой  $\text{CH}_3\text{CN}$  и  $\text{H}_2\text{O}$  с  $\text{EtOAc}$  (100 мл), органический слой промывали соевым раствором (100 мл), сушили, фильтровали и упаривали. Соединение **7-1-3a** (17,0 г, 15,0 ммоль, выход 83,3%, чистота 95,8%) получали в виде светло-желтой пены.

ВЭЖХ (метод **A**):  $RT = 6,778$  мин; ЖХМС (метод **F**):  $RT = 1,322$  мин;  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1081,4$  для соединения **7-1-3a**.

#### Синтез соединения 7-1-4

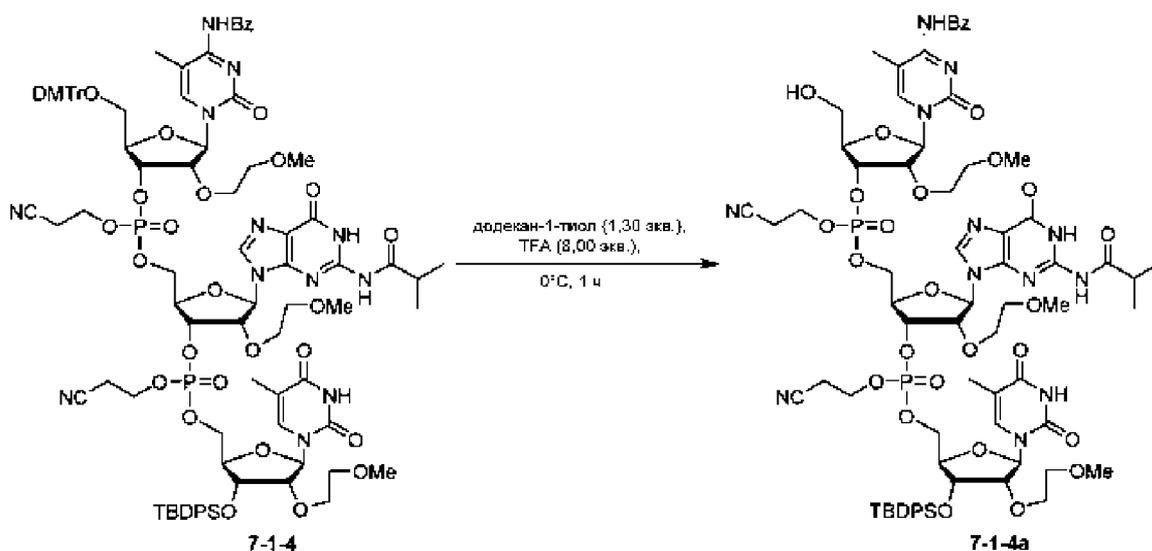


**[0476]** Соединение **7-1-3a** (17,0 г, 15,7 ммоль, 1,00 экв.) и **МОЕ С амидит** (15,9 г, 17,2 ммоль, 1,10 экв.) выпаривали совместно с ACN (50 мл × 3) в атмосфере аргона в 250 мл одногорлой круглодонной колбе и молекулярные сита 3Å (4,00 г) добавляли в одногорлую колбу, под давлением аргона ACN (85 мл). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 1 ч, а затем к смеси добавляли DCI (2,78 г, 23,5 ммоль, 1,50 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 25 °С в течение 1 ч. ВЭЖХ (продукт: RT = 7,932, 8,001 мин; исходный материал: RT = 5,111, 5,169 мин) показала, что исходный материал израсходован полностью.

**[0477]** К вышеуказанному раствору добавляли **ВuOОН** (4,05 г, 31,4 ммоль, 4,31 мл, чистота 70,0%, 2,00 экв.). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 0,5 ч. ВЭЖХ (**7-1-4**, продукт: RT = 7,746, 7,832, 7,916 мин; исходный материал: RT = 7,932, 8,001 мин) показала, что исходный материал израсходован полностью.

**[0478]** Реакционную смесь выливали в раствор **NaHCO<sub>3</sub>** и **Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>** (10,0 экв. **NaHCO<sub>3</sub>** и 5,00 экв. **Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>** в 400 мл деионизированной воды), а затем разбавляли смесь **EtOAc** (100 мл) и два слоя разделяли, органический слой промывали **NaHCO<sub>3</sub>** (200 мл), соевым раствором (200 мл), сушили, фильтровали и упаривали. Соединение **7-1-4** (33,4 г, 12,7 ммоль, выход 81,3%, чистота 73,5%) получали в виде белого твердого вещества. ВЭЖХ (метод **A**): RT = 7,746, 7,832, 7,916 мин; ЖХМС (метод **F**): RT = 1,603 мин; m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 1917,7 для соединения **7-1-4**

#### Получение соединения 7-1-4a



**[0479]** К Соединению **7-1-4** (23,0 г, 11,9 ммоль, 1,00 экв.) в ACN (120 мл) добавляли додекан-1-тиол (3,15 г, 15,5 ммоль, 3,73 мл, 1,30 экв.) при 0 °С, а затем к реакционной смеси добавляли ТФУ (10,9 г, 95,8 ммоль, 7,10 мл, 8,00 экв.) при 0 °С. Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 ч. ТСХ (дихлорметан: метанол = 7: 1, продукт: R<sub>f</sub> = 0,40) показала, что соединение **7-1-4** полностью израсходовалось и образовалось одно новое пятно. Согласно ТСХ, реакция была селективной.

**[0480]** Реакционную смесь выливали в раствор **NaHCO<sub>3</sub>** (10,0 экв. **NaHCO<sub>3</sub>** в 400 мл деионизированной воды), затем разбавляли смесь **EtOAc** (200 мл) и два слоя разделяли, органический слой промывали **NaHCO<sub>3</sub>** (150 мл), соевым раствором (150 мл), сушили фильтровали и упаривали. Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ (50 мл). Неочищенный растворитель медленно добавляли по каплям к растворителю изопропиловый эфир (500 мл). Желаемый продукт выпадал в осадок. Продукт собирали в виде светлого

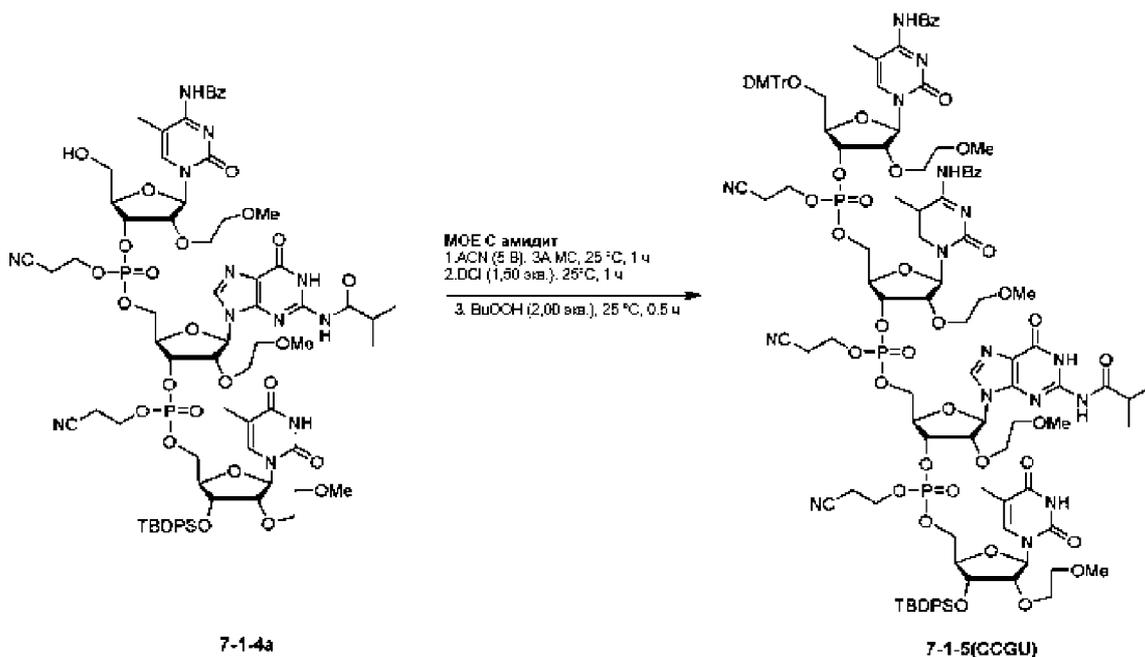
желтого твердого вещества после фильтрации, и твердый осадок промывали изопропиловым эфиром (50 мл × 2). Соединение **7-1-4a** (22,0 г, 11,1 ммоль, выход 93,0%, чистота 81,9%) получали в виде светло-желтого твердого вещества.

Соединение **7-1-4a** (13,0 г, 8,04 ммоль, выход 86,9%, чистота 98,3%) получали в виде белой пены после очистки ВЭЖХ. ВЭЖХ (метод **A**): RT = 6,127, 6,193, 6,277 минуты и ЖХМС (метод **F**): RT = 1,431 мин; m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 1615.5.

### Получение

### CCGU

### Amer



**[0481]** Соединение **7-1-4a** (13,0 г, 8,04 ммоль, 1,00 экв.) и **MOE C амидит** (8,17 г, 8,84 ммоль, 1,10 экв.) выпаривали совместно с ACN (30 мл × 3) в атмосфере аргона в 250 мл одногорлой круглодонной колбе и молекулярное сито 3Å (3,50 г) добавляли в одногорлую колбу, под давлением аргона добавляли ACN (65 мл). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 1 ч, а затем к смеси добавляли DCI (1,42 г, 12,0 ммоль, 1,50 экв.). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 1 ч.

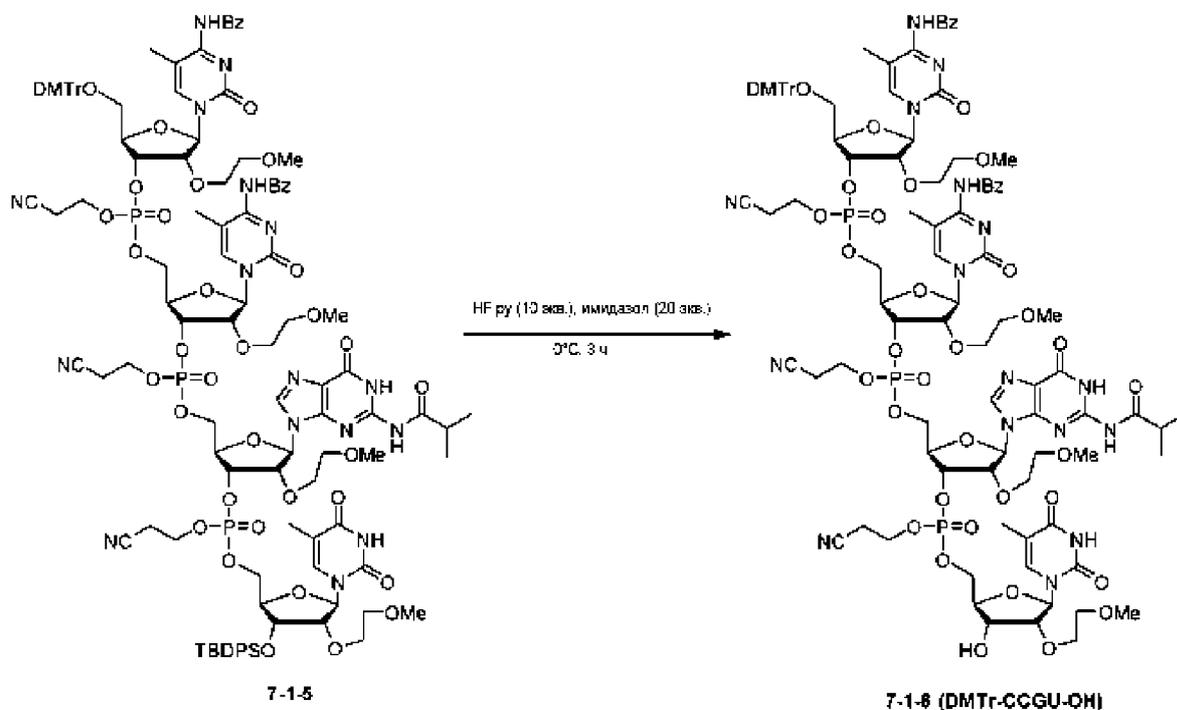
ВЭЖХ (продукт: RT = 8,547 мин; исходный материал: RT = 6,127, 6,193, 6,277 мин) показала, что исходный материал израсходован полностью.

**[0482]** К вышеуказанному раствору добавляли BuOOH (2,07 г, 16,0 ммоль, 2,20 экв.) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25 °С в течение 0,5 ч. ВЭЖХ (7-5, продукт: RT = 8,400 мин; исходный материал: RT = 8,547 мин) показала, что исходный материал израсходован полностью.

**[0483]** Реакционную смесь выливали в раствор NaHCO<sub>3</sub> и Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (10,0 экв. NaHCO<sub>3</sub> и 5,00 экв. Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> в 500 мл деионизированной воды), а затем разбавляли смесь EtOAc (300 мл), и два слоя разделяли, органический слой промывали NaHCO<sub>3</sub> (200 мл), соевым раствором (200 мл), сушили, фильтровали и упаривали. Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ (50 мл). Неочищенный растворитель медленно добавляли по каплям к растворителю изопропиловый эфир (600 мл). Желаемый продукт выпадал в осадок. Продукт собирали в виде светло-желтого твердого вещества после фильтрации, и твердый осадок промывали изопропиловым эфиром (50 мл × 2). Соединение **7-1-5 (CCGU)** (15,0 г, 5,94 ммоль, выход 73,9%, чистота

97,3%) получали в виде твердого вещества желтого цвета после очистки ВЭЖХ. ВЭЖХ (метод **B**): RT = 8,400 мин и ЖХМС (метод **F**): RT = 1,665 мин; m/z:  $[M+2H]^{2+}/2 = 1226,4$ .

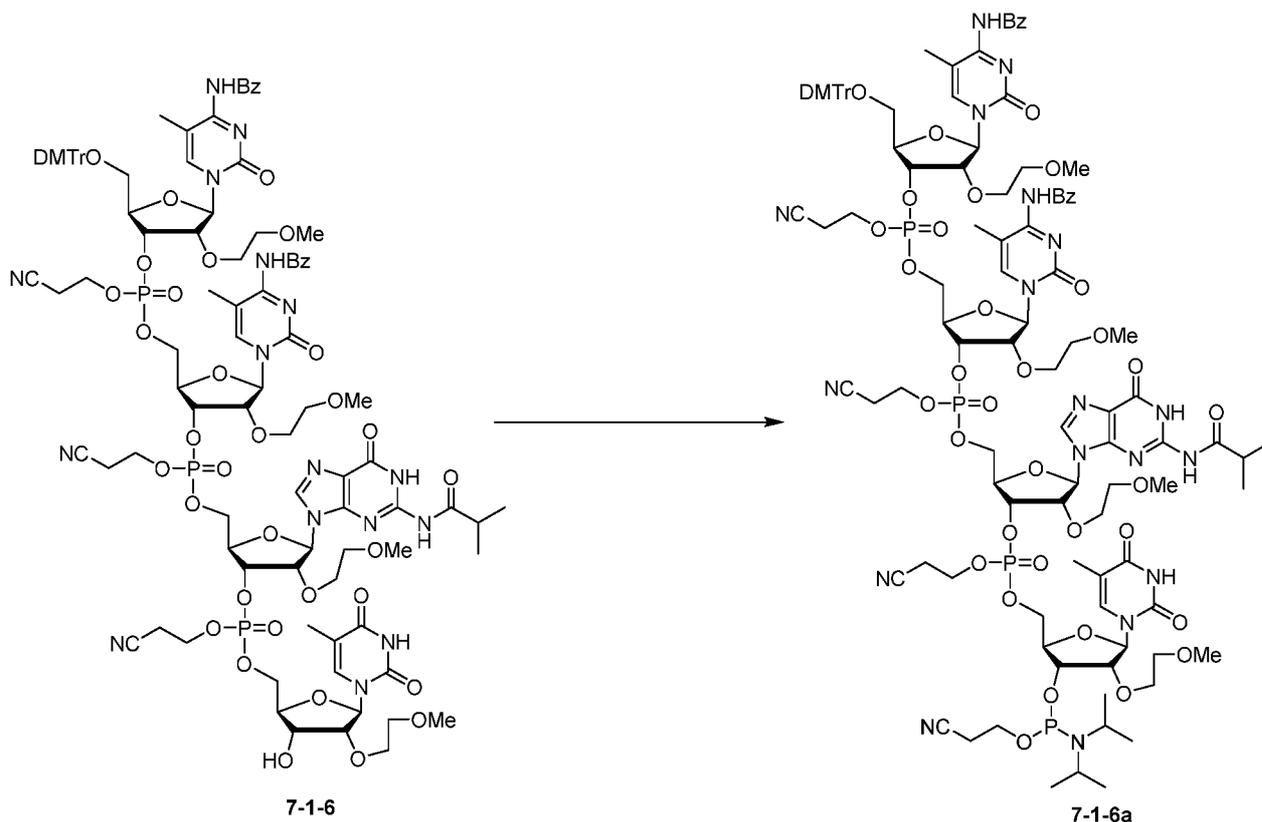
#### Подготовка DMTr-CCGU-OH (7-1-6)



**[0484]** К раствору **7-1-5** (6,00 г, 2,44 ммоль, 1,00 экв.) в ACN (35 мл), а затем в пиридине; гидрофторид (698 мг, 24,4 ммоль, 634 мкл, чистота 70,0%, 10,0 экв.) и имидазол (3,33 г, 48,8 ммоль, 20,0 экв.) в ТГФ (8 мл) добавляли по каплям при 0 °C. Смесь перемешивали при 0 °C в течение 3 ч. ТСХ (дихлорметан: метанол = 10:1, продукт: R<sub>f</sub> = 10:1) показала, что соединение **7-1-5** полностью израсходовалось и образовались два новых пятна. Согласно ТСХ, реакция протекала неоднозначно.

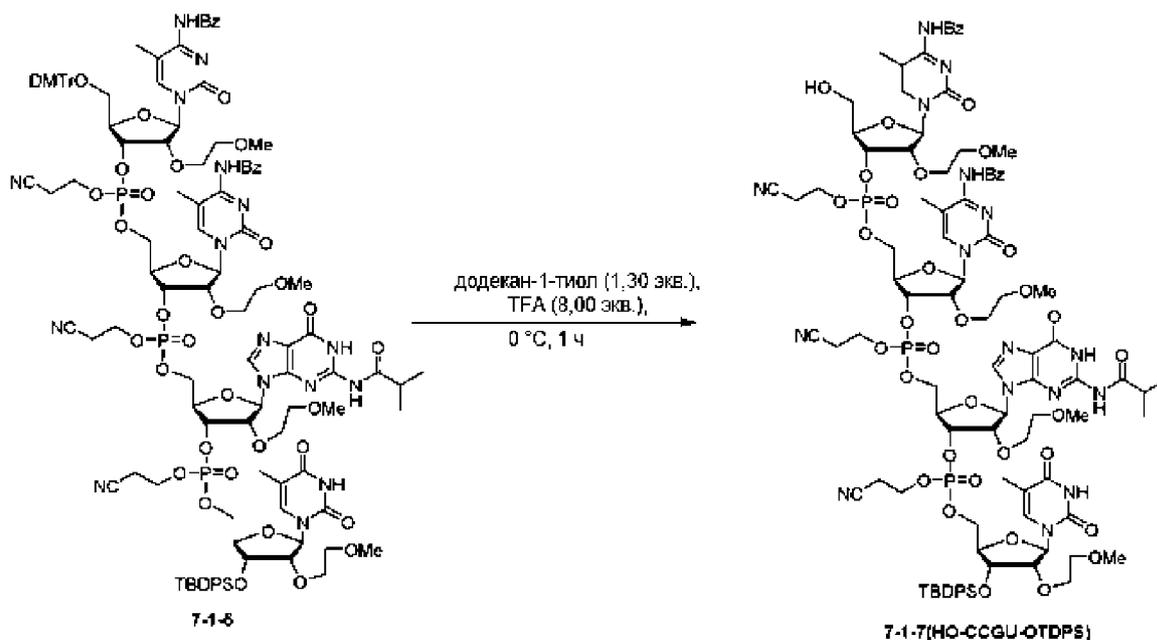
**[0485]** Реакционную смесь разводили EtOAc (20 мл). Органический слой промывали насыщенным водным NaHCO<sub>3</sub> (20 мл × 2), соевым раствором (20 мл) и сушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ (5 мл). Неочищенный растворитель медленно добавляли по каплям к растворителю МТВЕ (50 мл). Желаемый продукт выпадал в осадок. Продукт собирали в виде белого твердого вещества после фильтрации, и твердый осадок промывали изопропиловым эфиром МТВЕ (50 мл × 2). Соединение **7-1-6** (4,90 г, 2,07 ммоль, выход 84,5%, чистота 93,5%) получали в виде белого твердого вещества. ВЭЖХ (метод **B**): RT = 10,986, 11,182, 11,264 мин и ЖХМС (метод **F**): RT = 1,502 мин; m/z:  $[M+2H]^{2+}/2 = 1107,4$ .

#### Подготовка DMTr-CCGU-OH (7-1-6a)



Соединение **7-1-6a** синтезировали из **7-1-6** с использованием процедуры, аналогичной описанной выше для синтеза фосфорамидита. ВЭЖХ-МС (метод **G**): RT = 9,740, 9,843, 9,949 мин; m/z:  $[M-2H]^{-2}/2 = 1205,8$  для соединения **7-1-6a**.

**Подготовка HO-CCGU-OTBDPS (7-1-7)**



**[0486]** К раствору **7-1-5** (6,20 г, 2,52 ммоль, 1,00 экв.) в ACN (30 мл) добавляли додекан-1-тиол (766 мг, 3,79 ммоль, 906 мкл, 1,50 экв.) при 0 °C, и затем по каплям добавляли ТФУ (2,30 г, 20,1 ммоль, 1,49 мл, 8,00 экв.) при 0 °C. Смесь перемешивали при 0 °C в течение 1 ч. ТСХ (ДХМ: MeOH = 10: 1, продукт:  $R_f = 0,35$ ) показала,

что соединение **7-1-5** полностью израсходовалось и образовались два новых пятна. Согласно ТСХ, реакция протекала неоднозначно.

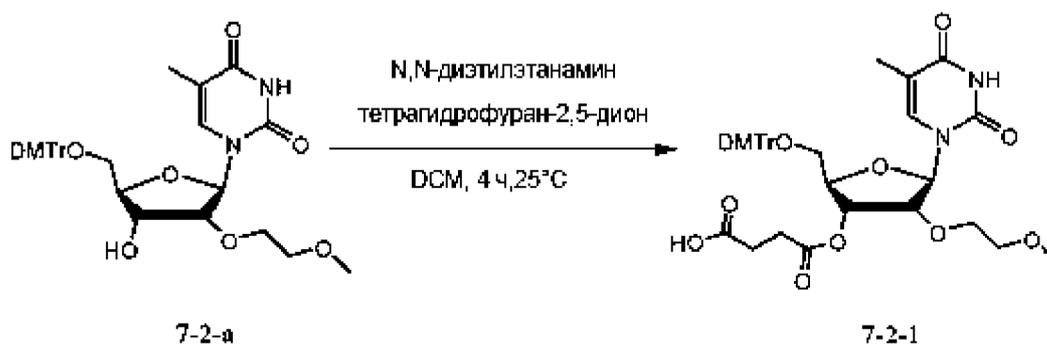
**[0487]** Реакционную смесь выливали в  $\text{NaHCO}_3$  (10,0 экв.  $\text{NaHCO}_3$  в 100 мл деионизированной воды), затем разбавляли  $\text{EtOAc}$  50 мл и экстрагировали 100 мл водного  $\text{NaHCO}_3$ . Объединенные органические слои промывали 200 мл соленого раствора (100 мл  $\times$  2), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ (80 мл). Неочищенный растворитель медленно добавляли по каплям к растворителю МТВЕ (300 мл). Желаемый продукт выпадал в осадок. Продукт собирали в виде белого твердого вещества после фильтрации, и твердый осадок промывали изопропиловым эфиром МТВЕ (50 мл  $\times$  2).

**[0488]** Соединение **7-1-7** (4,86 г, 2,18 ммоль, выход 86,4%, чистота 96,6%) получали в виде белого твердого вещества с помощью очистки ВЭЖХ. ВЭЖХ (метод **В**): RT = 0,664, 10,794, 10,917 мин; ЖХМС (метод **Ф**): RT = 1,431 мин; m/z:  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 1075,9$ .

### **В. Получение 3'фрагмента**

#### **1. Общая процедура получения 5'-ОН-АСССУ-ЛНPG 5mer (Фрагмент 1)**

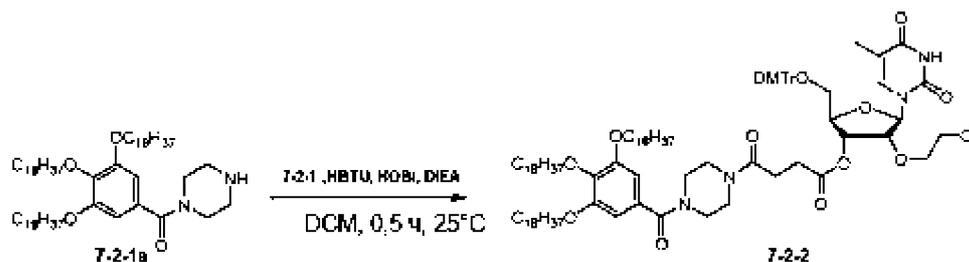
**Общая методика получения соединения 7-2-1.**



**[0489]** Соединение **7-2-а** упаривали совместно с толуолом (60,0 мл  $\times$  3). К раствору соединения **7-2-а** (10,0 г, 16,1 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (100 мл) добавляли N, N-диэтилэтанамин (8,18 г, 80,8 ммоль, 11,2 мл, 5,00 экв.) и тетрагидрофуран-2,5-дион (3,24 г, 32,3 ммоль, 2,00 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 4 часов. ВЭЖХ показала, что соединение **7-2-а** было полностью израсходовано. Реакционную смесь промывали ТЕАВ (0,5 М, 300 мл), сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка. Соединение **7-2-1** (11,0 г, 15,3 ммоль, выход 94,6%) получали в виде коричневого твердого вещества.

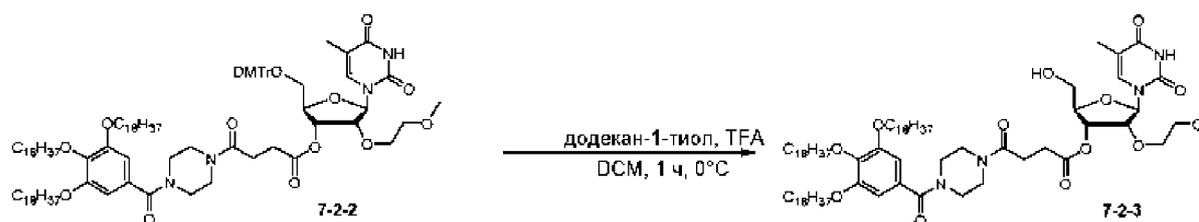
ВЭЖХ (метод **А**): RT = 2,405 мин.

**Общая методика получения соединения 7-2-2**



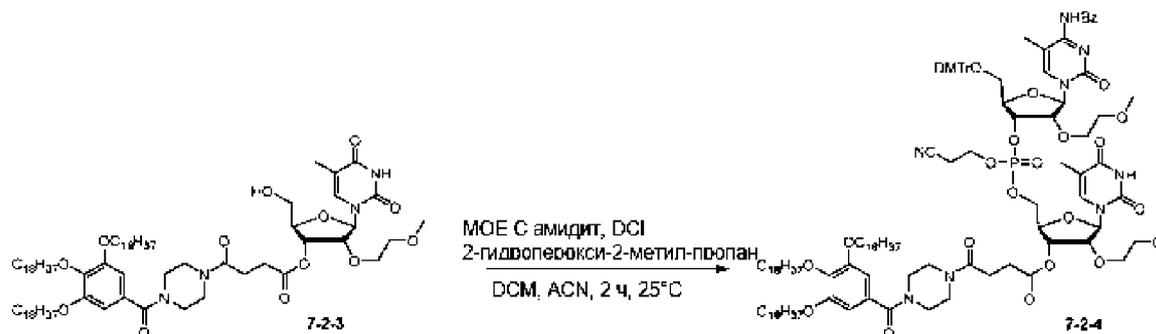
**[0490]** К раствору соединения **7-2-1a** (10,1 г, 10,2 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (300 мл) добавляли соединение **7-2-2** (11,0 г, 14,5 ммоль, 1,43 экв., HCl), НВТУ (13,1 г, 34,6 ммоль, 3,40 экв.), НОВт (4,69 г, 34,6 ммоль, 3,40 экв.) и DIEA (4,48 г, 34,6 ммоль, 6,04 мл, 3,40 экв.). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 0,5 часа. ТСХ (исходный материал,  $R_f = 0,38$ , продукт,  $R_f = 0,42$ ) показала, что соединение **7-2-1a** было полностью израсходовано. Реакционную смесь упаривали при пониженном давлении для удаления растворителя. Неочищенный продукт растирали с АСН (700 мл) при 25 °С в течение 15 минут. Затем фильтровали и промывали АСН (100 мл x 2). Соединение **7-2-2** (16,0 г, 9,43 ммоль, выход 92,4%) получали в виде коричневого твердого вещества.

**Общая методика получения соединения 7-2-3.**



**[0491]** К раствору соединения **7-2-2** (16,0 г, 9,43 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (160 мл) добавляли додекан-1-тиол (5,73 г, 28,3 ммоль, 6,78 мл, 3,00 экв.) и ТФУ (10,7 г, 94,3 ммоль, 6,98 мл, 10,0 экв.). Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 часа. ТСХ (ДХМ: MeOH = 10:1, исходный материал,  $R_f = 0,50$ , продукт,  $R_f = 0,43$ ) показала, что соединение **7-2-2** полностью израсходовалось. Реакционную смесь промывали водн. насыщ.  $\text{NaHCO}_3$  до  $\text{pH} > 7$ , экстрагировали дихлорметаном (300 мл), промывали солевым раствором (200 мл), сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт растирали с АСН (800 мл) при 25 °С в течение 30 минут. Затем фильтровали и промывали АСН (100 мл x 2). Соединение **7-2-3** (11,7 г, 8,39 ммоль, выход 88,9%) получали в виде белого твердого вещества

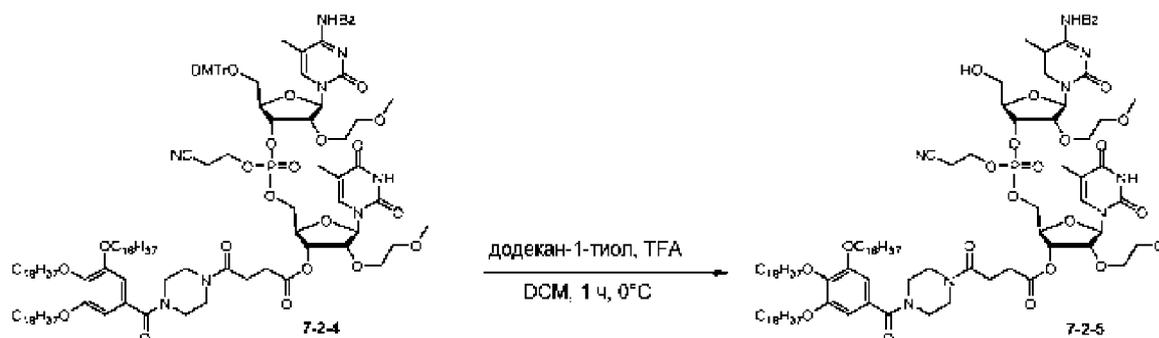
**Общая методика получения соединения 7-2-4**



**[0492]** Соединение **7-2-3** и amidит МОЕ С выпаривали совместно с (АСН 60,0 мл x 3) и (ДХМ 20,0 мл x 3). К раствору соединения **7-2-3** (11,7 г, 8,39 ммоль, 1,00 экв.) и МОЕ С-амидита (15,4 г, 16,7 ммоль, 2,00 экв.) добавляли ДХМ (120 мл) и АСН (20 мл), затем добавляли 3А МС, смесь перемешивали в течение 1 часа, затем добавляли DCl (2,98 г, 20,98 ммоль, 2,50 экв.) в смесь, смесь перемешивали в течение 0,5 часа, затем добавляли 2-гидроперокси-2-метилпропан (3,24 г, 25,1 ммоль,

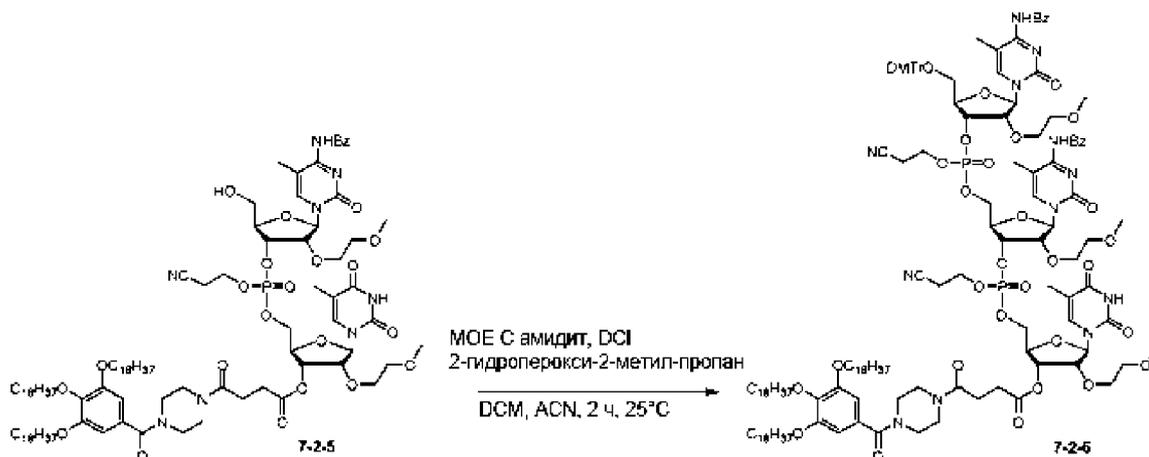
5,04 мл, 5М, 3,00 экв.) в смесь, смесь перемешивали в течение 0,5 ч при 25 °С. ТСХ (ДХМ: MeOH = 20:1, исходный материал,  $R_f = 0,43$ , продукт,  $R_f = 0,48$ ) показала, что соединение **7-2-3** было полностью израсходовано. Реакционную смесь промывали водным  $\text{NaHCO}_3$  и водным  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (200 мл), промывали солевым раствором (200 мл), фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт растирали с ACN (350 мл) при 25 °С в течение 30 минут. Затем фильтровали и промывали ACN (100 мл x 2). Соединение **7-2-4** (17,1 г, 7,33 ммоль, выход 87,2%) получали в виде белого твердого вещества.

**Общая методика получения соединения 7-2-5**



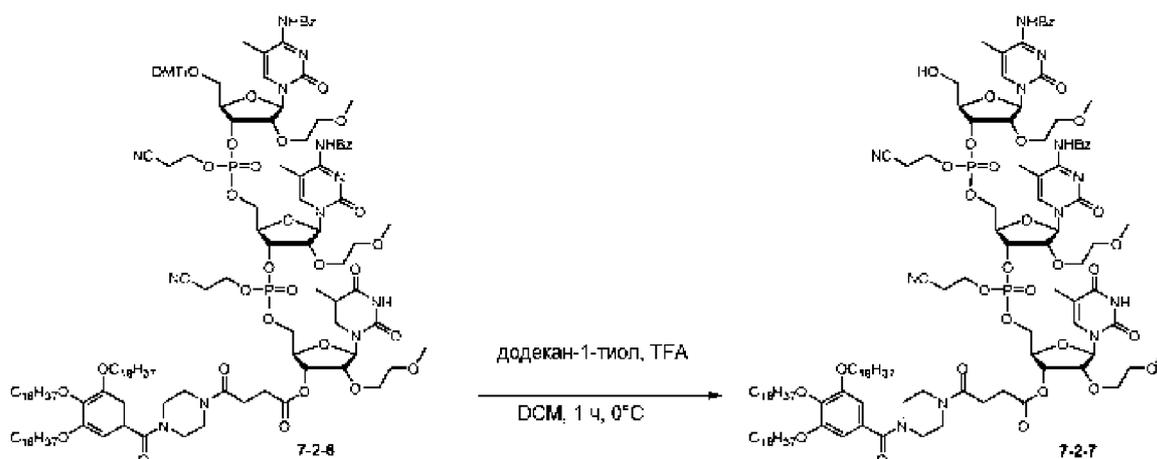
**[0493]** К раствору соединения **7-2-4** (17,1 г, 7,33 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (170 мл) добавляли додекан-1-тиол (4,45 г, 21,9 ммоль, 5,26 мл, 3,00 экв.) и ТФУ (8,35 г, 73,2 ммоль, 5,42 мл, 10,0 экв.). Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 часа. ТСХ (ДХМ: MeOH = 10:1, исходный материал,  $R_f = 0,43$ , продукт,  $R_f = 0,48$ ) показала, что соединение **7-2-4** полностью израсходовалось. Реакционную смесь промывали насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  до  $\text{pH} > 7$ , экстрагировали дихлорметаном (300 мл), промывали солевым раствором (200 мл), сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт растирали с ACN при 0 °С в течение 30 минут. Затем фильтровали и промывали ACN (100 мл x 2). Соединение **7-2-5** (13,7 г, 6,74 ммоль, выход 92,0%) получали в виде белого твердого вещества.

**Общая методика получения соединения 7-2-6.**



**[0494]** Соединение **5** и amidит MOE C выпаривали совместно с (ACN 80,0 мл x 3) и (ДХМ 30,0 мл x 3). К раствору соединения **7-2-5** (13,7 г, 6,74 ммоль, 1,00 экв.) и amidита MOE C (12,4 г, 13,4 ммоль, 2,00 экв.) добавляли ДХМ (80,0 мл) и ACN (20,0 мл), затем добавляли молекулярные сита 3Å, смесь перемешивали в течение 1 часа, затем добавляли DCI (2,39 г, 16,8 ммоль, 2,50 экв.) в смесь, смесь перемешивали в течение 0,5 часа, затем добавляли 2-гидроперокси-2-метилпропан (5 М, 4,05 мл, 3,00 экв.) в смесь, смесь перемешивали в течение 0,5 ч при 25°C. ТСХ (ДХМ: MeOH = 15:1, исходный материал,  $R_f = 0,43$ , продукт,  $R_f = 0,50$ ) показала, что соединение **7-2-5** было полностью израсходовано. Реакционную смесь фильтровали. Фильтрат растирали с ACN при 25 °C в течение 30 минут. Затем фильтровали и промывали ACN (100 мл x 2). Соединение **7-2-6** (17,0 г, 6,15 ммоль, выход 91,1%) получали в виде белого твердого вещества.

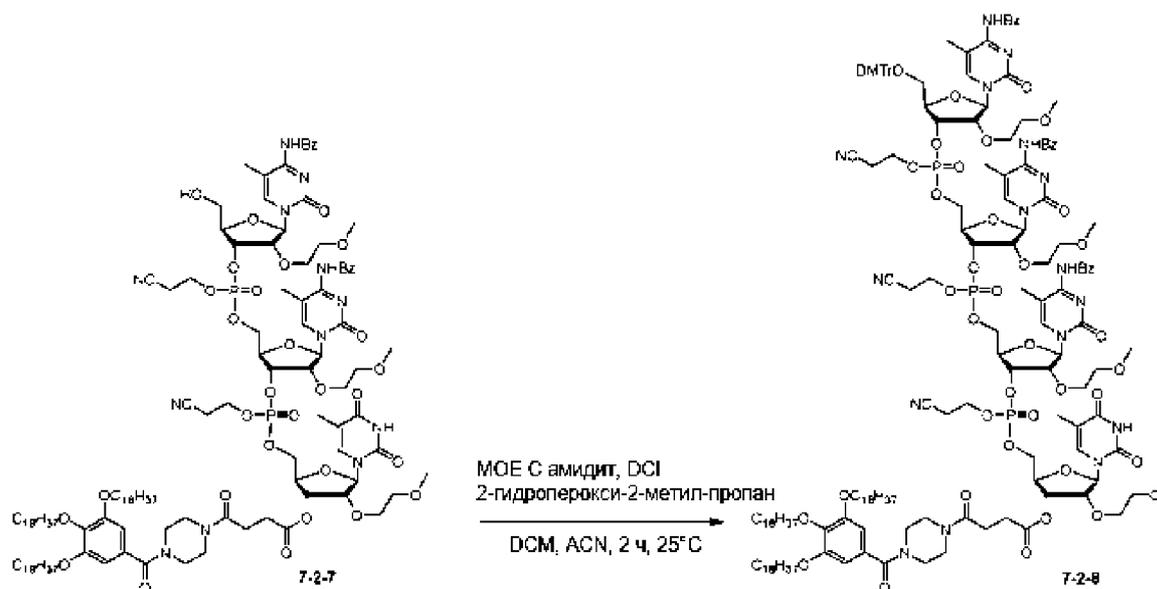
**Общая методика получения соединения 7-2-7.**



**[0495]** К раствору соединения **7-2-6** (17,0 г, 6,15 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (190 мл) добавляли додекан-1-тиол (3,73 г, 18,4 ммоль, 4,42 экв.) и ТФУ (7,01 г, 61,4 ммоль, 4,55 экв.). Смесь перемешивали при 0 °C в течение 1 часа. ТСХ (ДХМ: MeOH = 10:1, исходный материал,  $R_f = 0,43$ , продукт,  $R_f = 0,38$ ) показала, что соединение **7-2-6** было полностью израсходовано. Реакционную

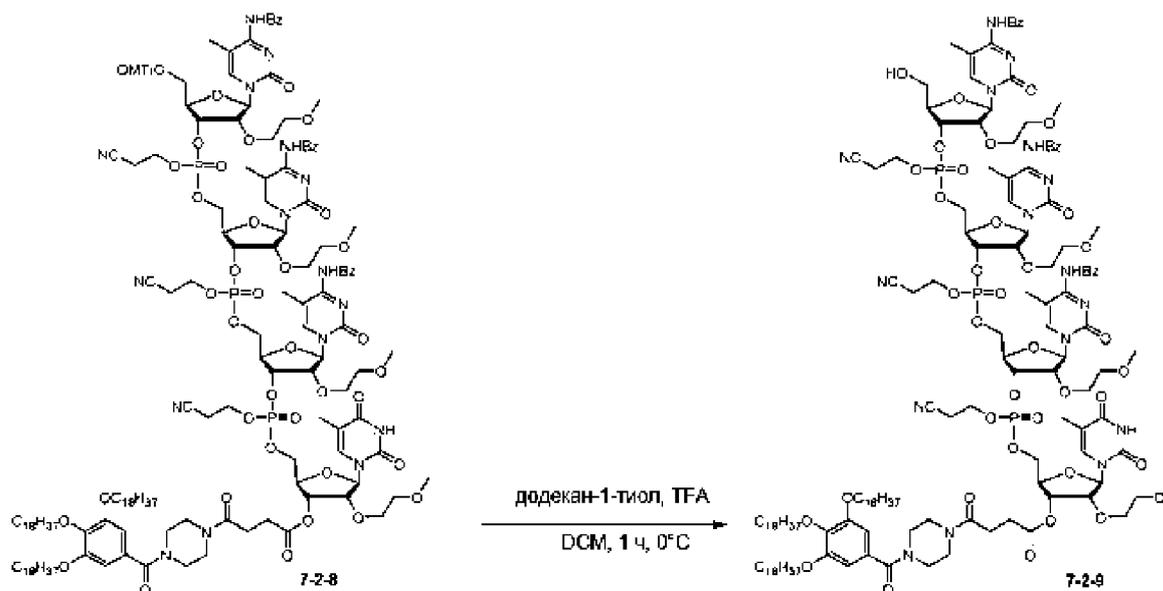
смесь промывали водн. Насыщенный  $\text{NaHCO}_3$  до  $\text{pH} > 7$ , экстрагировали дихлорметаном (300 мл), промывали солевым раствором (200 мл), сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт растирали с  $\text{ACN}$  при  $0^\circ\text{C}$  в течение 30 минут. Затем фильтровали и промывали  $\text{ACN}$  (100 мл x 2). Соединение **7-2-7** (14,7 г, 5,97 ммоль, выход 97,0%) получали в виде белого твердого вещества.

**Общая методика получения соединения 7-2-8.**



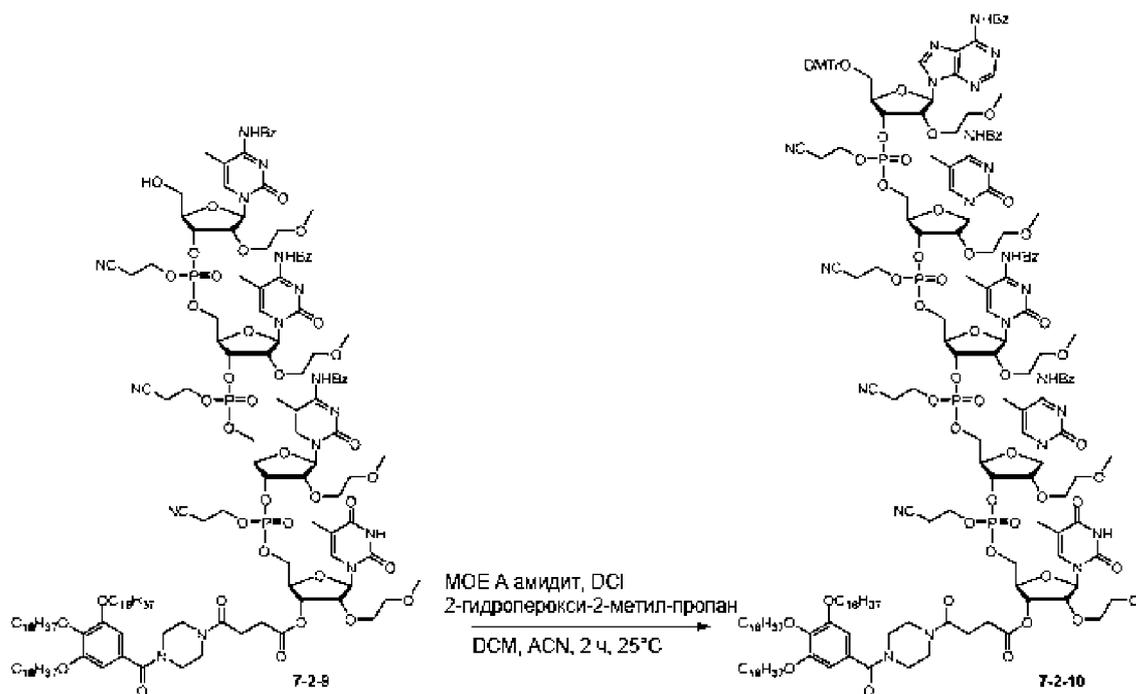
**[0496]** Соединение **7-2-7** и amidite MOE C выпаривали совместно с ( $\text{ACN}$  60,0 мл x 3) и ( $\text{ДХМ}$  20,0 мл x 3). К раствору соединения **7-2-7** (13,0 г, 5,31 ммоль, 1,00 экв.) и amidита MOE C (9,80 г, 10,6 ммоль, 2,00 экв.) добавляли  $\text{ДХМ}$  (60,0 мл) и  $\text{ACN}$  (20,0 мл), затем добавляли молекулярные сита  $3\text{\AA}$  ( $\text{МС}$ ), смесь перемешивали в течение 1 часа, затем добавляли  $\text{DCI}$  (1,89 г, 13,2 ммоль, 2,50 экв.) в смесь, смесь перемешивали в течение 0,5 часа, затем добавляли 2-гидроперокси-2-метил-пропан (5 М, 3,19 мл, 3,00 экв.) в смесь, смесь перемешивали в течение 0,5 ч при  $25^\circ\text{C}$ . ТСХ ( $\text{ДХМ}$ :  $\text{MeOH}$  = 15:1, исходный материал,  $R_f = 0,43$ , продукт,  $R_f = 0,48$ ) показала, что соединение **7-2-7** было полностью израсходовано. Реакционную смесь фильтровали. Фильтрат растирали с  $\text{ACN}$  (800 мл) при  $25^\circ\text{C}$  в течение 30 минут. Затем фильтровали и промывали  $\text{ACN}$  (100 мл x 2). Соединение **7-2-8** (14,4 г, 4,36 ммоль, выход 82,1%) получали в виде белого твердого вещества.

**Общая методика получения соединения 7-2-9**



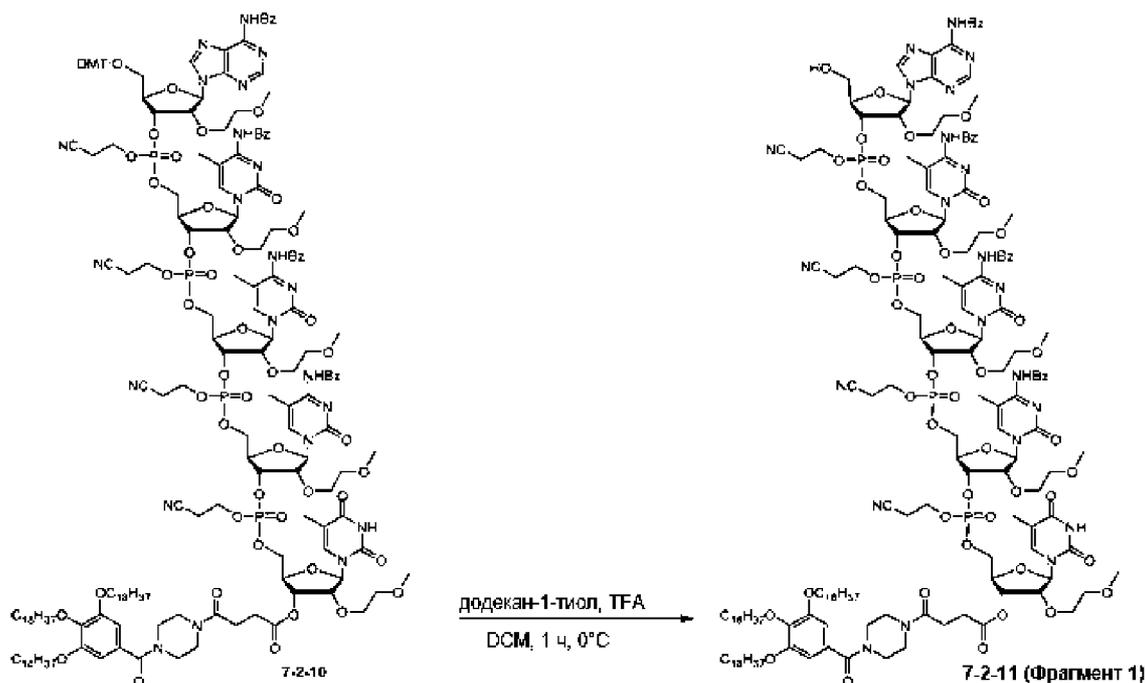
**[0497]** К раствору соединения **7-2-8** (14,47 г, 4,39 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (70,0 мл) добавляли додекан-1-тиол (2,66 г, 13,1 ммоль, 3,15 мл, 3,00 экв.) и ТФУ (5,00 г, 43,8 ммоль, 3,25 мл, 10,0 экв.). Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 часа. ТСХ (ДХМ: MeOH = 10:1, исходный материал,  $R_f = 0,43$ , продукт,  $R_f = 0,38$ ) показала, что соединение **7-2-8** полностью израсходовалось. Реакционную смесь промывали водн. насыщ.  $\text{NaHCO}_3$  до  $\text{pH} > 7$ , экстрагировали дихлорметаном (300 мл), промывали солевым раствором (200 мл), сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт растирали с ACN (800 мл) при 25 °С в течение 30 минут. Затем фильтровали и промывали ACN (100 мл x 2). Соединение **7-2-9** (11,6 г, 3,88 ммоль, выход 88,5%) получали в виде белого твердого вещества.

**Общая методика получения соединения 7-2-10**



**[0498]** Соединение **7-2-9** и amidит MOE A выпаривали совместно с (ACN 60 мл x 3) и (ДХМ 20 мл x 3). К раствору соединения **7-2-9** (11,6 г, 3,87 ммоль, 1,00 экв.) и MOE amidита (7,21 г, 7,74 ммоль, 2,00 экв.) добавляли ДХМ (60,0 мл) и ACN (20,0 мл), затем добавляли 3Å MS, смесь перемешивали в течение 1 часа, затем добавляли DCI (1,37 г, 9,67 ммоль, 2,50 экв.) в смесь, смесь перемешивали в течение 0,5 часа, затем добавляли 2-гидроперокси-2-метилпропан (5 М, 2,32 мл, 3,00 экв.) в смесь, смесь перемешивали в течение 0,5 ч при 25°C. ТСХ (ДХМ: MeOH = 15:1, исходный материал,  $R_f = 0,43$ , продукт,  $R_f = 0,47$ ) показала, что соединение **7-2-9** полностью израсходовалось. Реакционную смесь фильтровали. Фильтрат растирали с ACN (800 мл) при 25 °C в течение 30 минут. Затем фильтровали и промывали ACN (100 мл x 2). Соединение **7-2-10** (14,0 г, 3,64 ммоль, выход 94,1%) получали в виде белого твердого вещества.

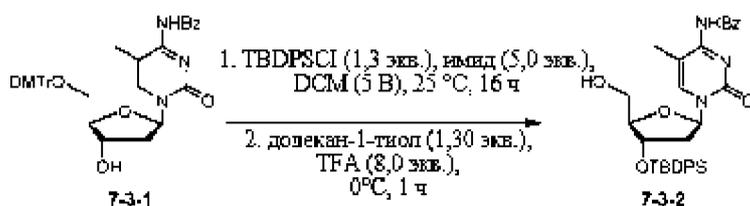
#### **Общий порядок приготовления Фрагмента 1**



[0499] К раствору соединения **7-2-10** (14,0 г, 3,64 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (70,0 мл) добавляли додекан-1-тиол (2,21 г, 10,9 ммоль, 2,62 мл, 3,00 экв.). Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 ч. ТСХ (ДХМ: MeOH = 15:1, исходный материал,  $R_f = 0,43$ , продукт,  $R_f = 0,39$ ) показала, что соединение **7-2-10** было полностью израсходовано. Реакционную смесь промывали водн. насыщ.  $\text{NaHCO}_3$  до  $\text{pH} > 7$ , экстрагировали дихлорметаном (300 мл), промывали солевым раствором (200 мл), сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт растирали с ACN (800 мл) при 25 °С в течение 30 минут. Затем фильтровали и промывали ACN (100 мл x 2). Соединение **7-2-10** (**Фрагмент 1**) (10,0 г, 2,82 ммоль, выход 77,5%) получали в виде белого твердого вещества. **7-2-10** (**Фрагмент 1**) характеризовали с помощью ВЭЖХ и масс-спектрометрии после снятия защиты с группы LHPG с помощью аммонолиза. ВЭЖХ (метод **C**): RT = 2,11 мин и ЖХМС (метод **D**): RT = 0,219 мин; m/z:  $[\text{M}-2\text{H}]^2/2 = 916,6$ .

## 2. Общая процедура получения 5'-Деокси-ТТАСС 5mer или 5'-DMTr-ТТАСС-ОН или 5'-ОН-ТТАСС-TBDPS5mer (**Фрагмент 2**)

### Общая методика получения соединения 7-3-2



[0500] К раствору соединения **7-3-1** (40,0 г, 61,7 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (200 мл) добавляли имидазол (21,0 г, 308 ммоль, 5,00 экв.). Смесь представляла собой светло-желтый гомогенный раствор. Добавляли TBDPSCI

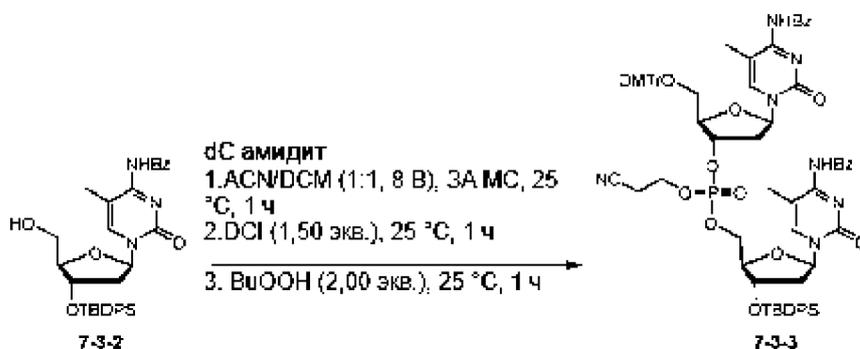
(22.0 г, 80.2 ммоль, 20.6 мл, 1.30 экв.) Смесь перемешивали при 25 °С в течение 16 ч. ТСХ (петролейный эфир: этилацетат = 2: 1, продукт:  $R_f = 0,46$ ) показала, что соединение **7-3-1** полностью израсходовалось и образовалось одно новое пятно. Согласно ТСХ, реакция была селективной.

**[0501]** Добавляли пропан-2-ол (4,73 мл, 1,00 экв.), и смесь перемешивали в течение 0,5 часа. Вышеуказанную смесь охлаждали до 0 °С на бане с ледяной водой. Добавляли додекан-1-тиол (16,2 г, 80,2 ммоль, 19,2 мл, 1,30 экв.) и смесь перемешивали при 0 °С в течение 15 минут. По каплям добавляли ТФУ (56,3 г, 494 ммоль, 36,5 мл, 8,00 экв.) при 0 °С. Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 ч. ТСХ (петролейный эфир: этилацетат = 2:1,  $R_f = 0,24$ ) показала, что исходная смесь полностью израсходована и образовалось одно новое пятно. Согласно ТСХ, реакция была селективной. Реакционную смесь выливают в  $\text{NaHCO}_3$  (10,0 экв.  $\text{NaHCO}_3$  в 500 мл деионизированной воды), затем разбавляют 100 мл ДХМ и экстрагируют водн.  $\text{NaHCO}_3$  (200 мл). Объединенные органические слои промывали 200 мл солевого раствора (100 мл  $\times$  2), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка.

**[0502]** Неочищенный продукт растворяли в 100 мл ДХМ, к смеси растворителей гептан/ТВМЕ (об./об. 9:1, 1200 мл) медленно по каплям добавляли раствор сырого продукта из воронки для проведения процесса осаждения. Этот процесс занял около 30 минут. Чистый продукт собирали в виде белого твердого вещества на воронке Бюхнера, осадок продукта промывали смесью растворителей гептана (100 мл  $\times$  2) и упаривали до высыхания.

Соединение **7-3-2** (34,8 г, 56,1 ммоль, выход 91,0%, чистота 94,2%) получали в виде белого твердого вещества. ВЭЖХ (метод **A**):  $RT = 7,136$  мин и ЖХМС (метод **F**):  $RT = 1,570$  мин;  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 584,2$ .

#### Общая методика получения соединения 7-3-3



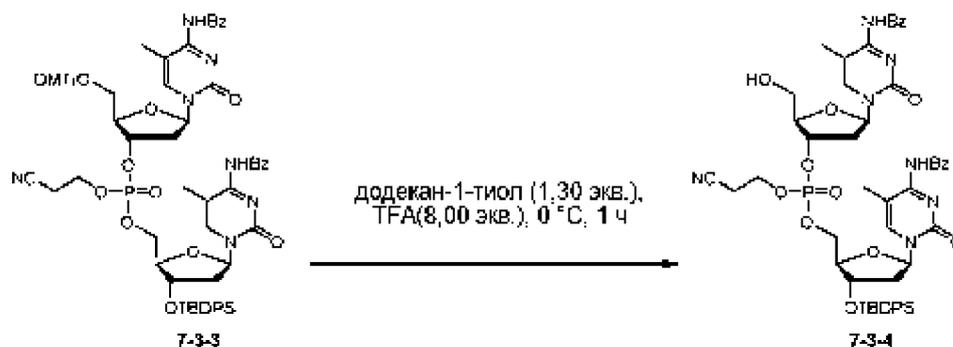
**[0503]** К раствору соединения **7-3-2** (13,0 г, 22,2 ммоль, 1,00 экв.) и **dC-амидита** (20,7 г, 24,5 ммоль, 1,10 экв) совместно упаривали с ACN (100 мл  $\times$  3) в атмосфере Ar в 250 мл одногорлую круглодонную колбу и молекулярное сито 3Å (3,00 г) добавляли в одногорлую колбу, под давлением аргона добавляли ACN/ДХМ = 1:1 (100 мл). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 1 ч, а затем к смеси добавляли DCI (3,94 г, 33,4 ммоль, 1,50 экв.). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 1 ч. ВЭЖХ (продукт:  $RT = 6,207$  мин; исходный материал:  $RT = 7,136$  мин) показала, что исходный материал израсходован полностью.

**[0504]** После завершения реакции сочетания к вышеуказанному раствору добавляли BuOOH (5,73 г, 44,5 ммоль, 6,10 мл, чистота 70,0%, 2,00 экв.) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25 °С в течение 1 ч. ВЭЖХ (**7-3-3**, продукт:  $RT = 9,028$  мин; исходный материал:  $RT = 6,027$  мин) показала, что исходный материал израсходован полностью. Реакционную смесь выливали в раствор  $\text{NaHCO}_3$  и  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (10,0 экв.  $\text{NaHCO}_3$  и 5,00 экв.  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  в 400 мл деионизированной воды), а затем разбавляли смесь EtOAc (200 мл) и два слоя разделяли,

органический слой промывали  $\text{NaHCO}_3$  (200 мл), солевым раствором (100 мл), сушили, фильтровали и упаривали.

Соединение **7-3-3** (33,0 г, 22,0 ммоль, выход 98,7%, чистота 89,7%) получали в виде белой пены. ВЭЖХ (метод **A**): RT = 5,518 мин и ЖХМС (метод **D**): RT = 1,787 мин; m/z:  $[\text{M}-\text{H}]^- = 1344,6$ .

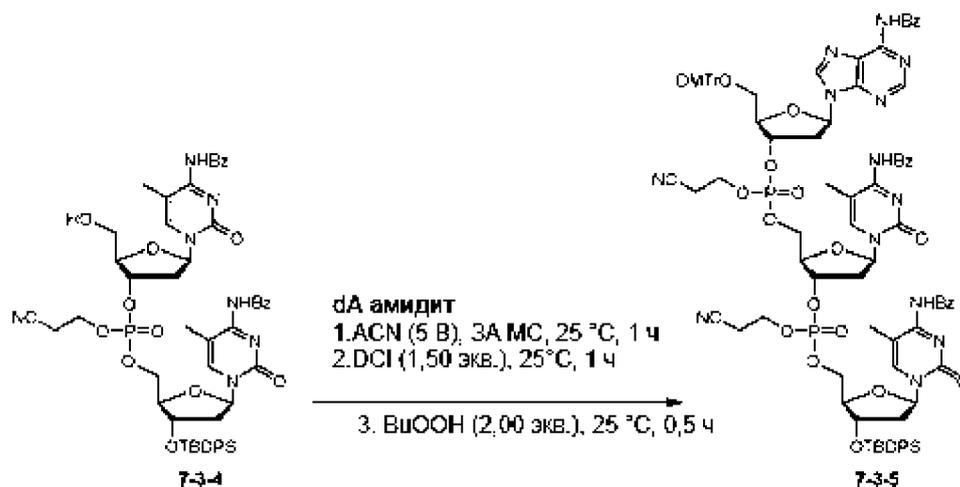
#### Общая методика получения соединения 7-3-4



**[0505]** Соединение **7-3-3** (24,0 г, 17,8 ммоль, 1,00 экв.) в ACN (120 мл) добавляли додекан-1-тиол (4,69 г, 23,1 ммоль, 5,55 мл, 1,30 экв.) при 0 °C, а затем ТФУ (16,2 г, 142 ммоль, 10,5 мл, 8,00 экв.) добавляли по каплям при 0 °C. Смесь перемешивали при 0 °C в течение 1 ч. ТСХ (дихлорметан: метанол = 10: 1, продукт:  $R_f = 0,55$ ) показала, что соединение **7-3-3** полностью израсходовалось и образовались два новых пятна. Согласно ТСХ, реакция протекала неоднозначно. Реакционную смесь выливали в  $\text{NaHCO}_3$  (10,0 экв.  $\text{NaHCO}_3$  в 300 мл деионизированной воды), затем разбавляли 100 мл EtOAc и экстрагировали 100 мл водного  $\text{NaHCO}_3$ . Объединенные органические слои промывали 200 мл солевого раствора (100 мл x 2), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка.

Смесь повторно растворяли в  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (2:1, 100 мл), и слой  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  промывали гептаном: tBuOMe = 4:1 (200 мл x 4), а затем разбавляли слой  $\text{CH}_3\text{CN}$  и  $\text{H}_2\text{O}$  с EtOAc/MTBE (1/3, 120 мл). Органический слой промывали деионизированной водой (100 мл), органический слой промывали солевым раствором (100 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка. Соединение **7-3-4** (16,4 г, 14,3 ммоль, выход 80,4%, чистота 91,2%) получали в виде белого твердого вещества. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (условия pH = 7). Соединение **7-3-4** (14,7 г, 13,4 ммоль, выход 87,4%, чистота 95,2%) получали в виде белой пены. ВЭЖХ (метод **A**): RT = 7,344 мин и ЖХМС (метод **E**): RT = 1,451 мин; m/z:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1044,7$ .

#### Общая методика получения соединения 7-3-5

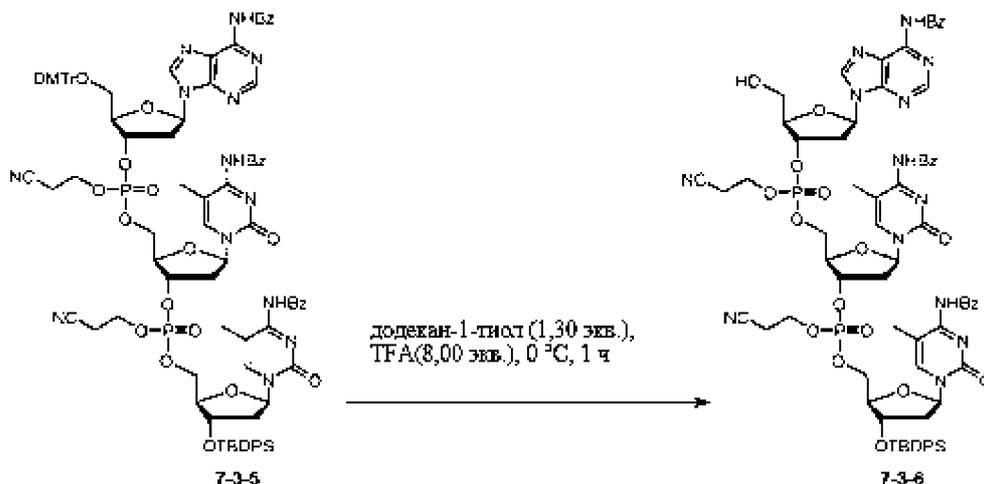


**[0506]** Раствор соединения **7-3-4** (14,7 г, 14,0 ммоль, 1,00 экв.) и **dA амидита** (13,2 г, 15,4 ммоль, 1,10 экв.) упаривали совместно с ACN (100 мл x 3) в атмосфере Ar в 250 мл одногорлую круглодонную колбу и молекулярное сито 3Å (4,00 г) добавляли в одногорлую колбу, под давлением аргона добавляли ACN (75 мл). Смесь перемешивали при 25 °C в течение 1 ч, а затем к смеси добавляли DCI (2,49 г, 21,1 ммоль, 1,50 экв.). Смесь перемешивали при 25 °C в течение 1 ч. ВЭЖХ (продукт: RT = 7,344 мин; исходный материал: RT = 8,501 мин) показала, что исходный материал был израсходован полностью.

**[0507]** После завершения реакции сочетания к вышеуказанному раствору добавляли BuOOH (3,62 г, 28,1 ммоль, 3,86 мл, чистота 70,0%, 2,00 экв.) при 25 °C. Смесь перемешивали при 25 °C в течение 0,5 ч. ВЭЖХ (**7-3-5**, продукт: RT = 8,232 мин; исходный материал: RT = 8,501 мин) показала, что исходный материал израсходован полностью. Реакционную смесь выливали в раствор NaHCO<sub>3</sub> и Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (10,0 экв. NaHCO<sub>3</sub> и 5,00 экв. Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> в 500 мл деионизированной воды), а затем разбавляли смесь EtOAc (200 мл), и два слоя разделяли, органический слой промывали NaHCO<sub>3</sub> (200 мл), солевым раствором (100 мл), сушили, фильтровали и упаривали.

**[0508]** Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ (80 мл). Неочищенный растворитель медленно добавляли по каплям в растворитель МТВЕ (1000 мл). Желаемый продукт выпадал в осадок. Продукт собирали в виде белого твердого вещества после фильтрации, и твердый осадок промывали изопропиловым эфиром МТВЕ (50 мл x 2). Соединение **7-3-5** (30,0 г, 13,4 ммоль, выход 95,7%, чистота 81,6%) получали в виде белого твердого вещества. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (условия pH = 7). Соединение **7-3-5** (24,0 г, 13,0 ммоль, выход 96,9%, чистота 98,8%) получали в виде белого твердого вещества. ВЭЖХ (метод **A**) RT = 8,233 мин; ЖХМС (метод **D**): RT = 1,622 мин; m/z: [M-2H]<sup>2-</sup>/2 = 906,8.

**Общая методика получения соединения 7-3-6.**

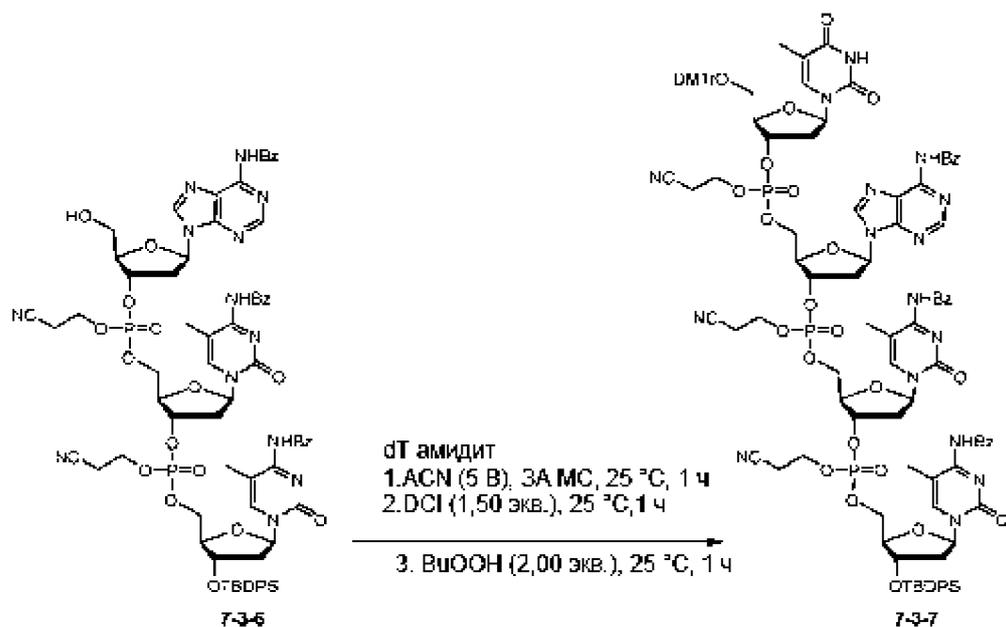


**[0509]** К раствору соединения **7-3-5** (18,3 г, 10,0 ммоль, 1,00 экв.) в АСН (90 мл) добавляли додекан-1-тиол (2,65 г, 13,0 ммоль, 3,14 мл, 1,30 экв.) при 0 °С, а затем по каплям добавляли ТФУ (9,19 г, 80,5 ммоль, 5,97 мл, 8,00 экв.) при 0 °С. Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 ч. ТСХ (DCM: MeOH = 10: 1, продукт: R<sub>f</sub> = 0,43) показала, что соединение **7-3-5** полностью израсходовалось и образовались два пятна. Согласно ТСХ, реакция протекала неоднозначно.

**[0510]** Реакционную смесь выливают в NaHCO<sub>3</sub> (10,0 экв. NaHCO<sub>3</sub> в 300 мл деионизированной воды), затем разбавляют 100 мл EtOAc и экстрагируют водн. NaHCO<sub>3</sub> (100 мл). Объединенные органические слои промывали 200 мл солевого раствора (100 мл × 2), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ (80 мл). Неочищенный растворитель медленно добавляли по каплям в растворитель МТВЕ (1000 мл). Желаемый продукт выпадал в осадок. Продукт собирали в виде белого твердого вещества после фильтрации, и твердый осадок промывали изопропиловым эфиром гептана (50 мл × 2). Соединение **7-3-6** (14,3 г, 9,34 ммоль, выход 92,7%, чистота 98,8%) получали в виде белого твердого вещества.

ВЭЖХ (метод **A**): RT = 7,008 мин.; ЖХМС (метод **E**): RT = 1,444 мин; m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 1514,8.

#### **Общая методика получения соединения 7-3-7**



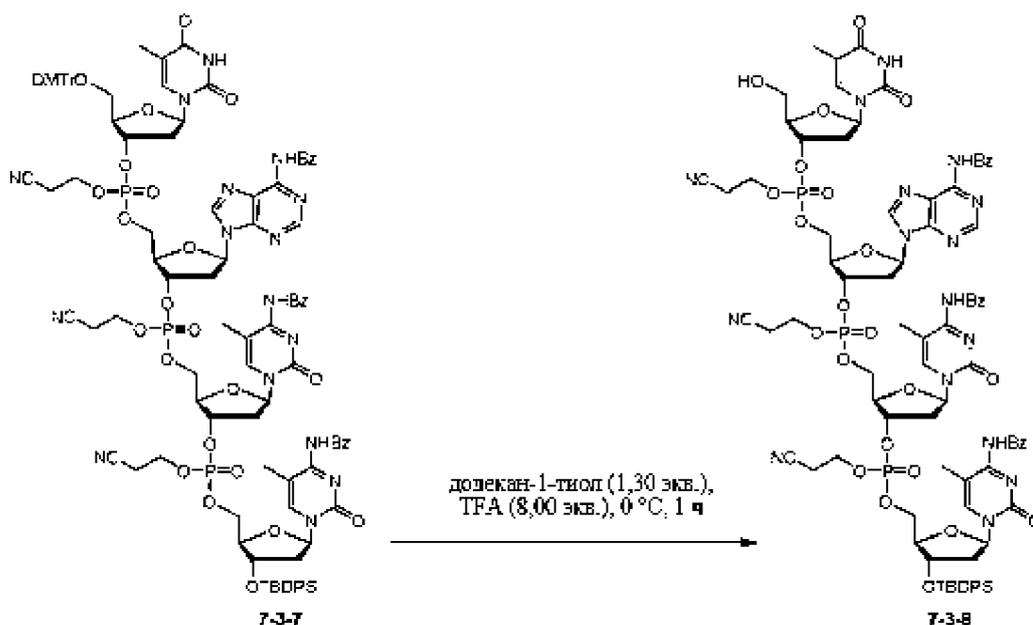
**[0511]** Соединение **7-3-6** (14,3 г, 9,44 ммоль, 1,00 экв.) и **dT-амидит** (7,73 г, 10,3 ммоль, 1,10 экв.) выпаривали совместно с ACN (50 мл x 3) в атмосфере Ar в 250 мл одногорлой круглодонной колбе, добавляли молекулярное сито 3Å (4,00 г) в одногорлую колбу и добавляли ACN под давлением аргона (75 мл). Смесь перемешивали при 25 °C в течение 1 ч, а затем к смеси добавляли DCI (1,67 г, 14,1 ммоль, 1,50 экв.). Смесь перемешивали при 25 °C в течение 1 ч. ВЭЖХ (продукт: RT = 8,061 мин; исходный материал: RT = 7,008 мин) показала, что исходный материал израсходован полностью.

**[0512]** После завершения реакции сочетания к вышеуказанному раствору добавляли BuOOH (2,43 г, 18,8 ммоль, 2,59 мл, чистота 70,0%, 2,00 экв.) при 25 °C. Смесь перемешивали при 25 °C в течение 1 ч. ВЭЖХ (**7-3-7**, продукт: RT = 7,856 мин; исходный материал: RT = 8,061 мин) показала, что исходный материал был израсходован полностью. Реакционную смесь выливали в раствор NaHCO<sub>3</sub> и Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (10,0 экв. NaHCO<sub>3</sub> и 5,00 экв. Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> в 400 мл деионизированной воды), а затем разбавляли смесь EtOAc (200 мл) и два слоя разделяли, органический слой промывали NaHCO<sub>3</sub> (200 мл), соевым раствором (100 мл), сушили, фильтровали и упаривали.

**[0513]** Соединение **7-3-7** (21,9 г, 8,78 ммоль, выход 93,0%, чистота 87,1%) получали в виде белого твердого вещества. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (условия pH = 7). Соединение **7-3-7** (19,0 г, 8,57 ммоль, выход 97,6%, чистота 98,0%) получали в виде белой пены.

ВЭЖХ (метод **A**): RT = 7,848 мин; ЖХМС (метод **D**): RT = 1,569 мин; m/z: [M-2H]<sup>2-</sup>/2 = 1085,5.

**Общая методика получения соединения 7-3-8.**

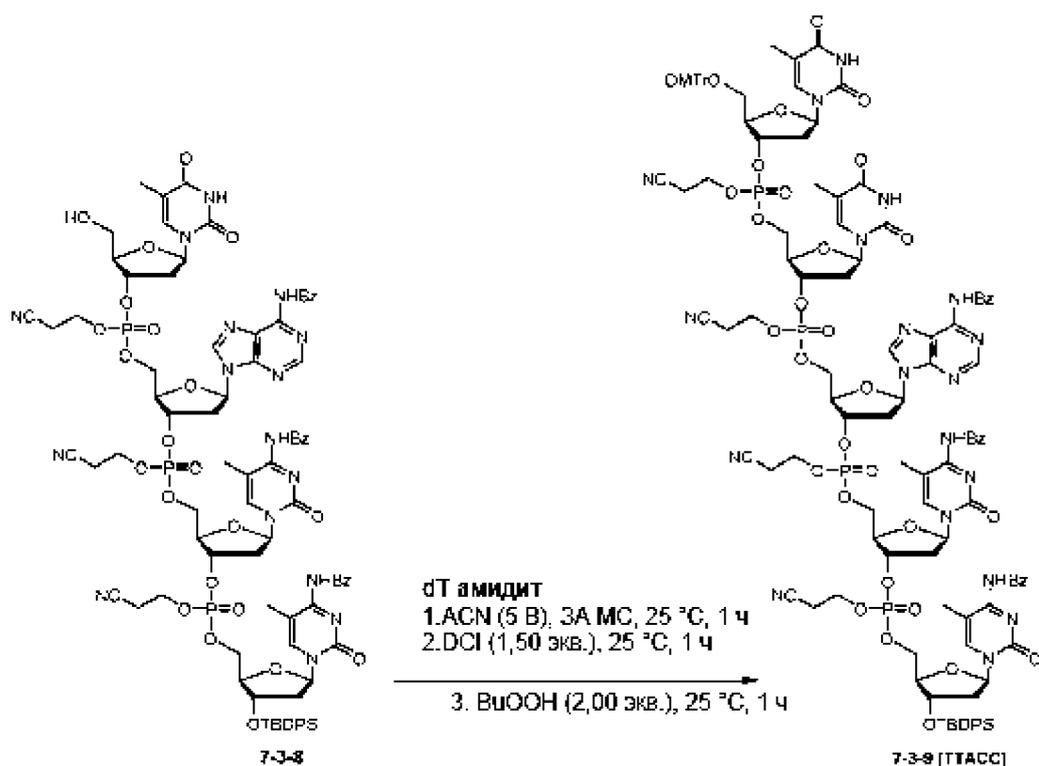


**[0514]** К раствору соединения **7-3-7** (14,0 г, 6,44 ммоль, 1,00 экв.) в АСН (70 мл) добавляли додекан-1-тиол (1,69 г, 8,37 ммоль, 2,01 мл, 1,30 экв.) при 0 °С, а затем по каплям добавляли ТФУ (5,87 г, 51,5 ммоль, 3,81 мл, 8,00 экв.) при 0 °С. Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 ч. ТСХ (метанол: дихлорметан = 10: 1, продукт:  $R_f = 0,41$ ) показала, что соединение **7-3-7** полностью израсходовалось и образовались два новых пятна. Согласно ТСХ, реакция протекала неоднозначно. Реакционную смесь выливали в  $\text{NaHCO}_3$  (10,0 экв.  $\text{NaHCO}_3$  в 300 мл деионизированной (ДИ) воды), а затем разбавляли 100 мл  $\text{EtOAc}$  и экстрагировали водн.  $\text{NaHCO}_3$  (100 мл). Объединенные органические слои промывали 200 мл солевого раствора (100 мл  $\times$  2), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка.

**[0515]** Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ (80 мл). Неочищенный растворитель медленно добавляли по каплям в растворитель МТВЕ (1000 мл). Желаемый продукт выпадал в осадок. Продукт собирали в виде белого твердого вещества после фильтрации, и твердый осадок промывали изопропиловым эфиром МТВЕ (50 мл  $\times$  2). Соединение **7-3-8** (11,5 г, 6,00 ммоль, выход 93,1%, чистота 97,6%) получали в виде белого твердого вещества.

ВЭЖХ (метод **A**):  $RT = 6,705$  мин.

**Общий способ приготовления дезокси-ТТАСС 5mer 7-3-9**



**[0516]** К раствору соединения **7-3-8** (11,5 г, 6,14 ммоль, 1,00 экв.) и **dT-амидита** (5,03 г, 6,76 ммоль, 1,10 экв.) совместно упаривали с ACN (50 мл x 3) в атмосфере Ar в 250 мл. одnogорлую круглодонную колбу и молекулярное сито 3Å (4,00 г) добавляли в одnogорлую колбу, под давлением аргона добавляли ACN (75 мл). Смесь перемешивали при 25 °C в течение 1 ч, а затем к смеси добавляли DCI (1,67 г, 14,1 ммоль, 1,50 экв.). Смесь перемешивали при 25 °C в течение 1 ч. ВЭЖХ (продукт: RT = 7,730 мин; исходный материал: RT = 6,705 мин) показала, что исходный материал израсходован полностью.

**[0517]** После завершения реакции сочетания к вышеуказанному раствору добавляли BuOOH (1,58 г, 12,2 ммоль, 1,68 мл, чистота 70,0%, 2,00 экв.). Смесь перемешивали при 25 °C в течение 1 ч. ВЭЖХ (продукт: RT = 7,517 мин; исходный материал: RT = 7,730 мин) показала, что исходный материал израсходован полностью. Реакционную смесь выливали в раствор NaHCO<sub>3</sub> и Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (10,0 экв. NaHCO<sub>3</sub> и 5,00 экв. Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> в 500 мл деионизированной воды), а затем разбавляли смесь EtOAc (200 мл), и два слоя разделяли, органический слой промывали NaHCO<sub>3</sub> (200 мл), солевым раствором (100 мл), сушили, фильтровали и упаривали.

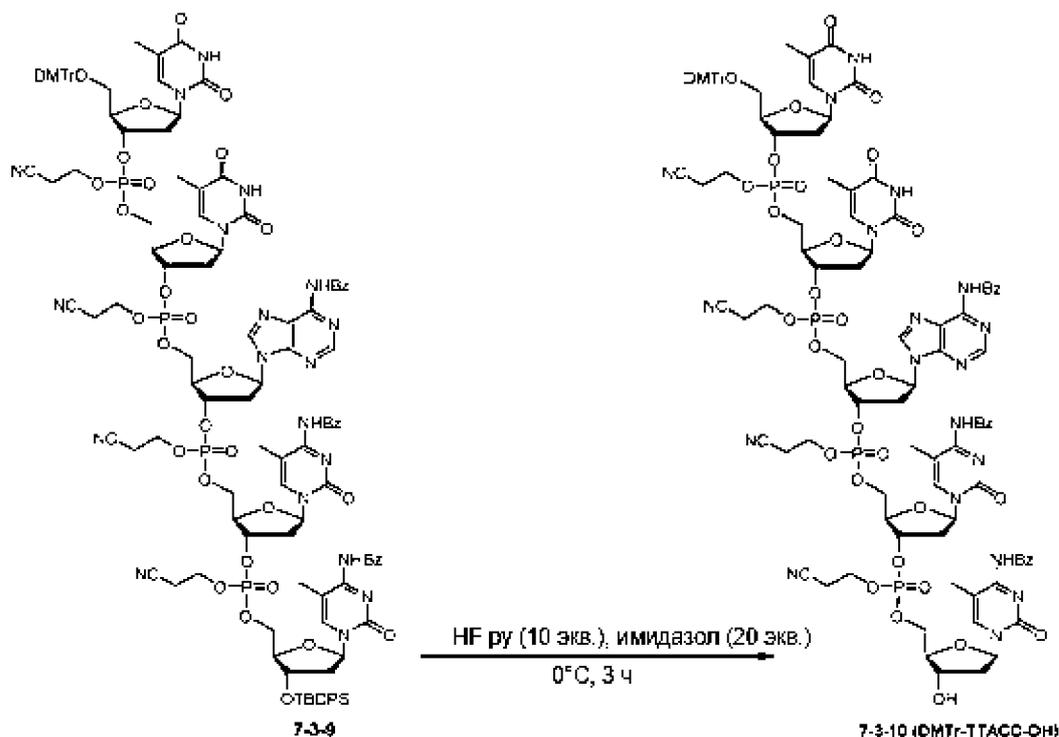
**[0518]** Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ (80 мл). Неочищенный растворитель медленно добавляли по каплям в растворитель МТВЕ (800 мл). Желаемый продукт выпадал в осадок. Продукт собирали в виде белого твердого вещества после фильтрации, и твердый осадок промывали изопропиловым эфиром МТВЕ (50 мл x 2). ЖХМС: продукт: RT = 1,443 мин.

Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (условия pH = 7).

**7-3-9 (дезоксид-ТТАСС 5мер)** (14,3 г, 5,47 ммоль, выход 89,3%, чистота 96,8%) получали в виде светло-желтого твердого вещества.

ВЭЖХ (метод **B**): RT = 11,993, 12,120, 12,240 мин; ЖХМС (метод **D**): RT = 1,443 мин; m/z: [M-2H]<sup>2-</sup>/2 = 1263,7.

**Общая процедура приготовления DMTr-ТТАСС-ОН 7-3-10**



**[0519]** К раствору соединения **7-3-9** (7,20 г, 2,84 ммоль, 1,00 экв.) в ACN (35 мл), а затем в пиридине; гидрофторид (813 мг, 28,4 ммоль, 739 мкл, чистота 70,0%, 10,0 экв.) и имидазол (3,87 г, 56,8 ммоль, 20,0 экв.) в ТГФ (12 мл) добавляли по каплям при 0 °С. Смесь перемешивали при 0 °С в течение 3 ч. ТСХ (дихлорметан: метанол = 10: 1, чистота:  $R_f = 0,30$ ) показала, что соединение **7-3-9** полностью израсходовалось и образовались два новых пятна. Согласно ТСХ, реакция протекала неоднозначно.

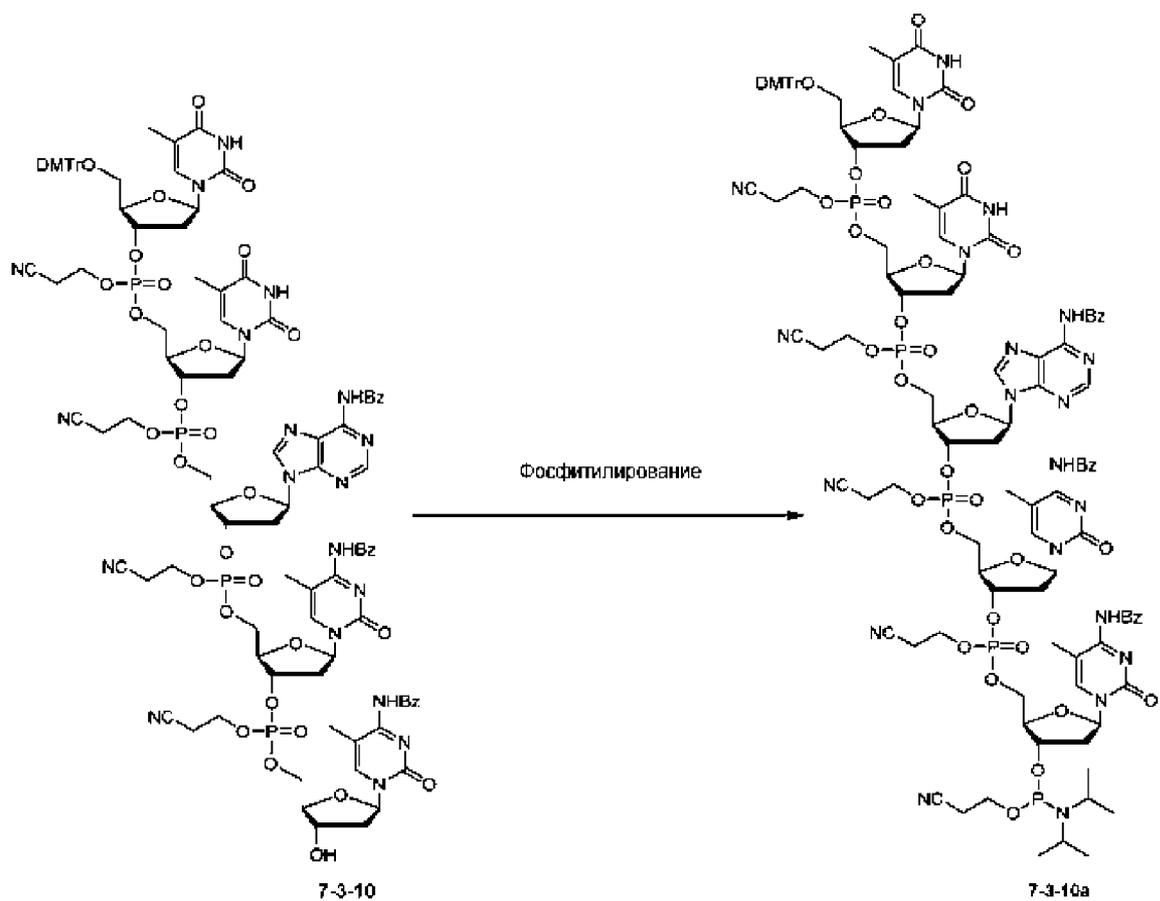
**[0520]** Реакционную смесь растворяли в EtOAc (50 мл). Органический слой промывали насыщ. водн.  $\text{NaHCO}_3$  (100 мл x 2), соевым раствором (100 мл) и сушили безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали в вакууме.

Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ (5 мл). Неочищенный растворитель медленно добавляли по каплям к растворителю МТВЕ (300 мл). Желаемый продукт выпадал в осадок. Продукт собирали в виде белого твердого вещества после фильтрации, и твердый осадок промывали изопропиловым эфиром МТВЕ (50 мл x 2).

Соединение **7-3-10 DMTr-TTACC-OH** (6,00 г, 2,33 ммоль, выход 82,0%, чист 89,1%) получали в виде белого твердого вещества.

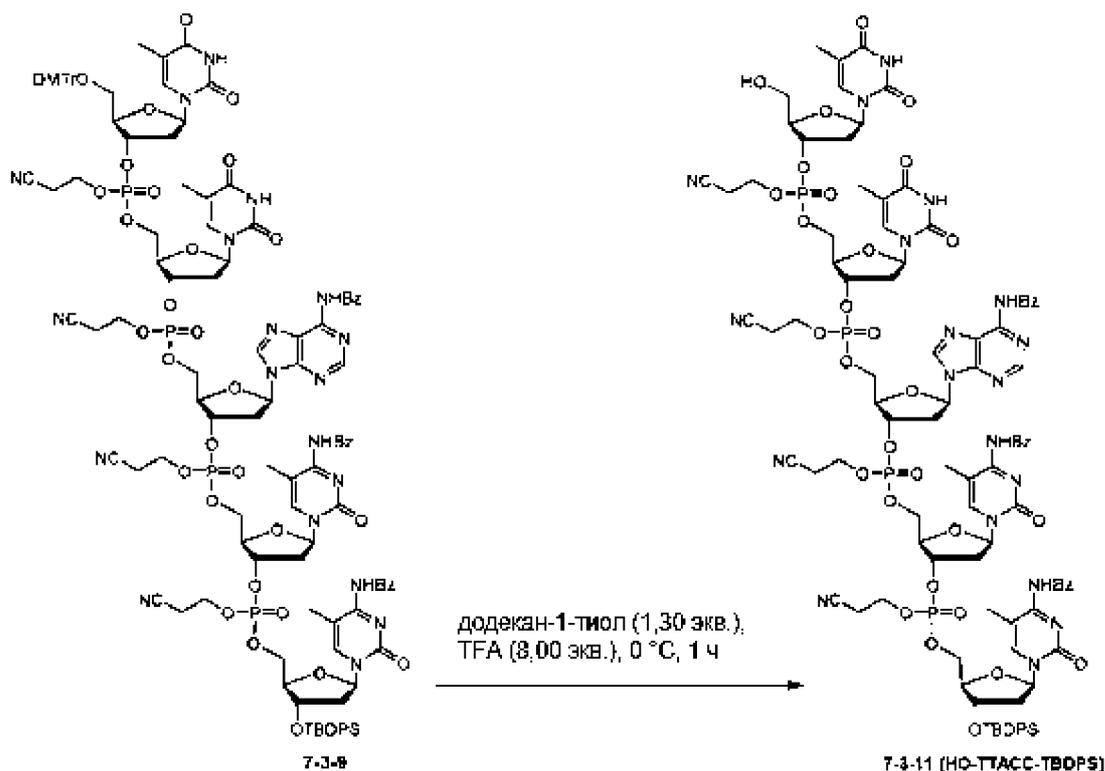
ВЭЖХ (метод **B**): RT = 6,449, 6,591 мин; ЖХМС (метод **F**): RT = 1,312 мин; m/z:  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 1147,4$ .

**Получение соединения 7-3-10а.**



**[0521]** Соединение **7-3-10a** синтезировали из **7-3-10** с использованием процедуры, аналогичной описанной выше для синтеза фосфорамидита. ВЭЖХ-МС (Метод **G**): RT = 8,174, 8,251, 8,420, 8,494 мин; m/z:  $[M-2H]^{2-}/2 = 1245,4$  для соединения **7-3-10a**.

**Подготовка НО-ТТАСС-ОТBDPS 7-3-11**



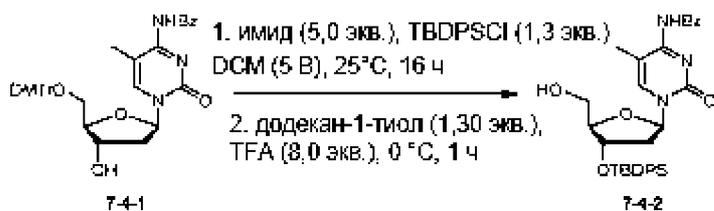
**[0522]** К раствору соединения **7-3-9** (6,60 г, 2,61 ммоль, 1,00 экв.) в АСН (35 мл) добавляли додекан-1-тиол (791 мг, 3,91 ммоль, 936 мкл, 1,50 экв.) при 0 °С, а затем по каплям добавляли ТФУ (2,38 г, 20,8 ммоль, 1,54 мл, 8,00 экв.) при 0 °С. Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 ч. ТСХ (ДХМ: МеОН = 10: 1, продукт: R<sub>f</sub> = 0,35) показала, что соединение **7-3-9** полностью израсходовалось и образовались два новых пятна. Согласно ТСХ, реакция протекала неоднозначно. Реакционную смесь выливали в NaHCO<sub>3</sub> (10,0 экв. NaHCO<sub>3</sub> в 100 мл деионизированной воды), затем разбавляли EtOAc 50 мл и экстрагировали 100 мл водного NaHCO<sub>3</sub>. Объединенные органические слои промывали 200 мл солевого раствора (100 мл × 2), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка.

**[0523]** Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ (80 мл). Неочищенный растворитель медленно добавляли по каплям к растворителю МТВЕ (300 мл). Желаемый продукт выпадал в осадок. Продукт собирали в виде белого твердого вещества после фильтрации, и твердый осадок промывали изопропиловым эфиром МТВЕ (50 мл × 2). Соединение **7-3-11 (НО-ТТАСС-ОТВДПС)** (5,35 г, 2,37 ммоль, выход 90,7%, чистота 98,6%) получали в виде белого твердого вещества.

ВЭЖХ (метод **В**): RT = 9,508, 9,650 мин; **ЖХМС** (метод **Д**): RT = 1,444 мин; m/z: [M-2H]<sup>2-</sup>/2 = 1113,3.

### 3. *Общая процедура получения 5'-УТТС 4mer или 5'-DMTr-УТТС-ОН или 5'-ОН-УТТС-ТВДПС4mer (Фрагмент 3)*

*Общая методика получения соединения 7-4-2.*



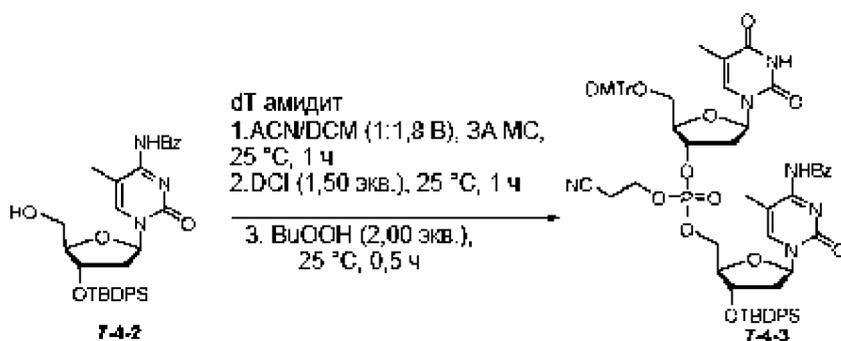
**[0524]** К раствору соединения **7-4-1** (40,0 г, 61,7 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (200 мл) добавляли имидазол (21,0 г, 308 ммоль, 5,00 экв.). Смесь представляла собой светло-желтый гомогенный раствор. Добавляли TBDPSCI (22,0 г, 80,2 ммоль, 20,6 мл, 1,30 экв.) Смесь перемешивали при 25 °С в течение 16 ч. ТСХ (петролейный эфир: этилацетат = 2: 1, продукт:  $R_f = 0,46$ ) показала, что соединение **7-4-1** полностью израсходовалось и образовалось одно новое пятно. Согласно ТСХ, реакция была селективной.

**[0525]** Добавляли пропан-2-ол (4,73 мл, 1,00 экв.), и смесь перемешивали в течение 0,5 часа. Вышеуказанную смесь охлаждали до 0 °С на бане с ледяной водой. Добавляли додекан-1-тиол (16,2 г, 80,2 ммоль, 19,2 мл, 1,30 экв.) и смесь перемешивали при 0 °С в течение 15 минут. По каплям добавляли ТФУ (56,3 г, 494 ммоль, 36,5 мл, 8,00 экв.) при 0 °С. Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 ч. ТСХ (петролейный эфир: этилацетат = 2:1,  $R_f = 0,24$ ) показала, что исходная смесь полностью израсходована и образовалось одно новое пятно. Согласно ТСХ, реакция была селективной. Реакционную смесь выливали в  $\text{NaHCO}_3$  (10,0 экв.  $\text{NaHCO}_3$  в 500 мл деионизированной воды), затем разбавляли 100 мл ДХМ и экстрагировали 200 мл водного  $\text{NaHCO}_3$ . Объединенные органические слои промывали 200 мл солевого раствора (100 мл  $\times$  2), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка.

**[0526]** Неочищенный продукт растворяли в 100 мл ДХМ, к смеси растворителей гептан/ТВМЕ (об./об. 9:1, 1200 мл) медленно по каплям добавляли раствор сырого продукта из воронки для проведения процесса осаждения. Этот процесс занял около 0,5 часа. Чистый продукт собирали в виде белого твердого вещества на воронке Бюхнера, осадок продукта промывали смесью растворителей гептана (100 мл  $\times$  2) и упаривали до высыхания. Соединение **7-4-2** (34,8 г, 56,1 ммоль, выход 91,0%, чистота 94,2%) получали в виде белого твердого вещества.

ВЭЖХ (метод **A**):  $R_T = 7,136$  мин и ЖХМС (метод **F**):  $R_T = 1,570$  мин;  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 584,2$ .

#### Общая методика получения соединения 7-4-3



**[0527]** Соединение **7-4-2** (15,0 г, 25,7 ммоль, 1,00 экв.) и **dT-амидит** (21,0 г, 28,2 ммоль, 1,10 экв.) выпаривали совместно с ACN/ДХМ (1/1, 100 мл  $\times$  3) в атмосфере  $\text{Ar}$  в одnogорлую круглодонную колбу на 250 мл и молекулярное сито  $3\text{\AA}$  (6,50 г) добавляли в одnogорлую колбу под давлением аргона, добавляли ACN (60 мл) и ДХМ (60 мл). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 1 ч, а затем к смеси добавляли DCl (4,55 г,

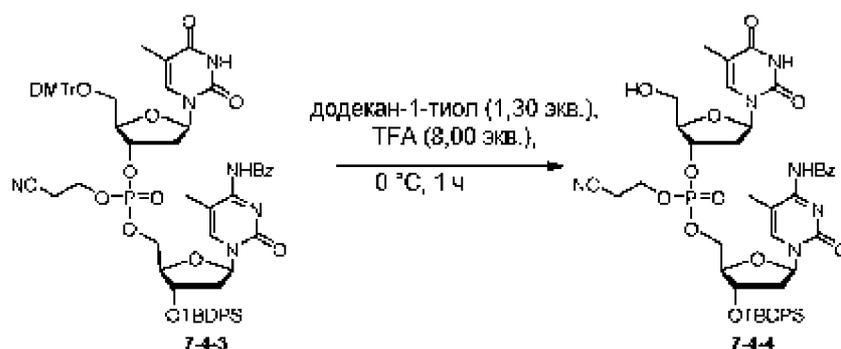
38,5 ммоль, 1,50 экв.). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 1 ч. ВЭЖХ (продукт: RT = 8,233 мин) показала, что соединение **7-4-2** полностью израсходовалось.

**[0528]** После завершения реакции сочетания к вышеуказанному раствору добавляли BuOOH (6,62 г, 51,3 ммоль, 7,04 мл, чистота 70,0%, 2,00 экв.) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25 °С в течение 0,5 ч. ВЭЖХ (продукт: RT = 7,764, 7,826 мин) показала, что реакция завершена. Реакционную смесь выливали в раствор NaHCO<sub>3</sub> и Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (10,0 экв. NaHCO<sub>3</sub> и 5,00 экв. Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> в 400 мл деионизированной воды), а затем разбавляли смесь ДХМ (200 мл), и два слоя разделяли, органический слой промывали NaHCO<sub>3</sub> (200 мл), соевым раствором (100 мл), сушили, фильтровали и упаривали.

**[0529]** Соединение **7-4-3** (36,0 г, 24,9 ммоль, выход 97,1%, чистота 86,2%) получали в виде белого твердого вещества. ВЭЖХ: продукт: RT = 7,764, 7,826 мин.; ЖХМС: соединение **7-4-3**, RT = 1,602 мин. Неочищенное соединение **3** использовали на следующей стадии.

**[0530]** Соединение **7-4-3** (10,0 г, 6,93 ммоль, чистота 86,2%) очищали обращенно-фазовой MPLC (pH = 7, условие MeCN/вода). Соединение **7-4-3** (8,00 г, 6,19 ммоль, выход 89,2%, чистота 96,1%) получали в виде белой пены. ВЭЖХ (метод **A**): RT = 7,792, 7,845 мин и ЖХМС (метод **F**): RT = 1,602 мин; m/z: [M + H]<sup>+</sup> = 1243,4.

#### Общая методика получения соединения **7-4-4**

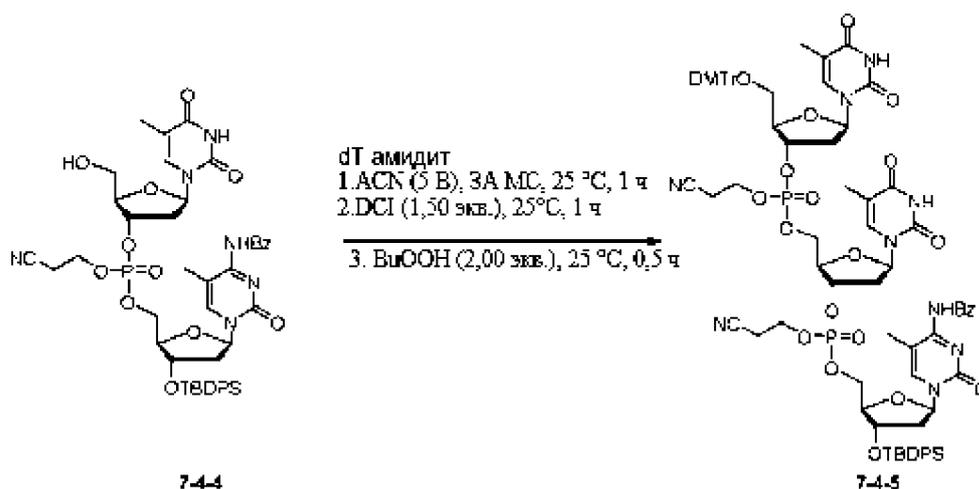


**[0531]** К раствору соединения **7-4-3** (26,0 г, 20,9 ммоль, 1,00 экв.) в ACN (120 мл) добавляли додекан-1-тиол (5,50 г, 27,18 ммоль, 6,51 мл, 1,30 экв.), охлажденный до 0 °С, а затем по каплям добавляли TFA (19,0 г, 167 ммоль, 12,3 мл, 8,00 экв.) при 0 °С. Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 ч. ТСХ (дихлорметан: метанол = 10: 1, продукт: R<sub>f</sub> = 0,46) показала, что соединение **7-4-3** полностью израсходовалось и образовалось одно новое пятно. Согласно ТСХ, реакция была селективной. Реакционную смесь выливали в раствор NaHCO<sub>3</sub> (10,0 экв. NaHCO<sub>3</sub> в 400 мл деионизированной воды), затем разбавляли смесь EtOAc (300 мл) и два слоя разделяли, органический слой промывали NaHCO<sub>3</sub> (200 мл), рассолом. (200 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка.

**[0532]** Смесь повторно растворяли в CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (2: 1, 100 мл), и слой CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O промывали гептаном: tBuOMe = 4: 1 (200 мл × 4), а затем разбавляли слой CH<sub>3</sub>CN и H<sub>2</sub>O с EtOAc/MTBE (1/3, 120 мл). Органический слой промывали деионизированной водой (100 мл), органический слой промывали соевым раствором (100 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка.

Соединение **7-4-4** (17,0 г, 16,7 ммоль, выход 80,0%, чистота 92,6%) получали в виде белой пены. ВЭЖХ (метод **A**): RT = 5,977 мин и ЖХМС (метод **E**): RT = 1,241 мин; m/z: [M + H]<sup>+</sup> = 941,5.

#### Общая методика получения соединения **7-4-5**.



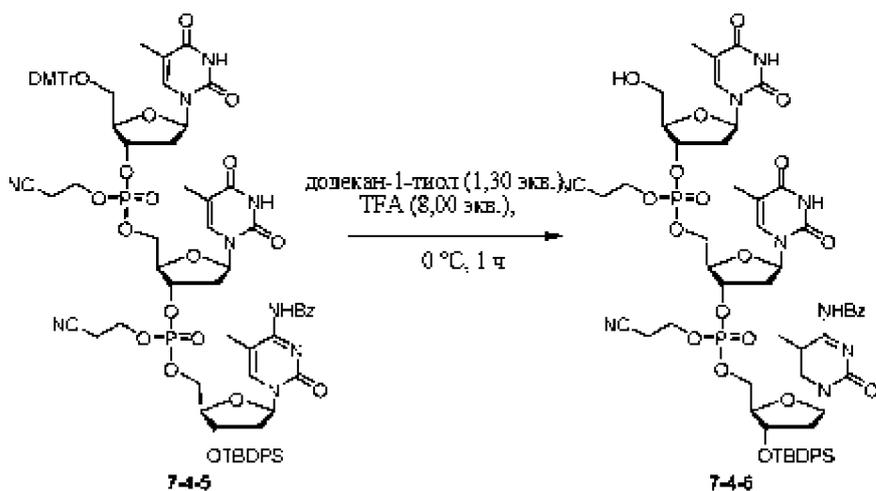
**[0533]** Соединение **7-4-4** (17,0 г, 18,0 ммоль, 1,00 экв.) и **dT-амидит** (14,8 г, 19,8 ммоль, 1,10 экв.) выпаривали совместно с ACN (100 мл × 3) в атмосфере аргона в 250 мл одnogорлой круглодонной колбе и молекулярное сито 3Å (4,50 г) добавляли в одnogорлую колбу, под давлением аргона добавляли ACN (85 мл). Смесь перемешивали при 25 °C в течение 1 ч, а затем к смеси добавляли DCI (3,20 г, 27,1 ммоль, 1,50 экв.). Смесь перемешивали при 25 °C в течение 1 ч. ВЭЖХ (продукт: RT = 7,451 мин; исходный материал: RT = 5,977 мин) показала, что исходный материал израсходован полностью.

**[0534]** После завершения реакции сочетания к вышеуказанному раствору добавляли BuOOH (4,65 г, 36,1 ммоль, 4,95 экв., чистота 70,0%, 2,00 экв.). Смесь перемешивали при 25 °C в течение 0,5 ч. ВЭЖХ (продукт: RT = 7,810 мин; исходный материал: RT = 7,451 мин) показала, что исходный материал был израсходован полностью. Реакционную смесь выливали в раствор NaHCO<sub>3</sub> и Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (10,0 экв. NaHCO<sub>3</sub> и 5,00 экв. Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> в 400 мл деионизированной воды), а затем разбавляли смесь EtOAc (200 мл) и два слоя разделяли, органический слой промывали NaHCO<sub>3</sub> (200 мл), соевым раствором (100 мл), сушили, фильтровали и упаривали. Соединение **7-4-5** (34,0 г, 17,2 ммоль, выход 95,2%, чистота 81,0%) получали в виде белой пены.

**[0535]** Соединение **7-4-5** (24,0 г, 15,0 ммоль, чистота 81,0%) очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (условия pH = 7; MeCN/вода). Соединение **7-4-5** (17,8 г, 11,1 ммоль, выход 89,7%, чистота 98,2%) получали в виде белой пены.

ВЭЖХ (метод **A**): RT = 7,179 мин и ЖХМС (метод **D**): RT = 1,530 мин; m/z: [M-H]<sup>-</sup> = 1599,6.

**Общая методика получения соединения 7-4-6**

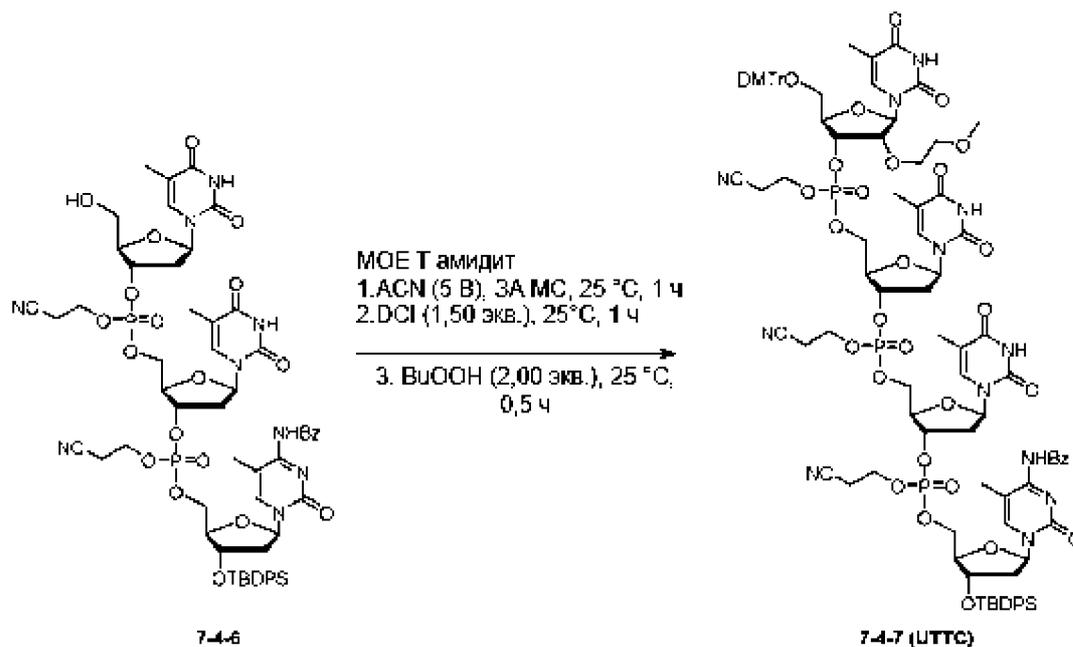


**[0536]** К раствору соединения **7-4-5** (12,6 г, 7,87 ммоль, 1,00 экв.) в АСН (65 мл) добавляли додекан-1-тиол (2,07 г, 10,2 ммоль, 2,45 мл, 1,30 экв.) при 0 °С, а затем по каплям добавляли ТФУ (7,18 г, 62,9 ммоль, 4,66 мл, 8,00 экв.) при 0 °С. Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 ч. ТСХ (дихлорметан: метанол = 10: 1, продукт:  $R_f = 0,36$ ) показала, что соединение **7-4-5** полностью израсходовалось и образовалось одно новое пятно. Согласно ТСХ, реакция была селективной. Реакционную смесь выливают в  $\text{NaHCO}_3$  (10,0 экв.  $\text{NaHCO}_3$  в 200 мл деионизированной воды), затем разбавляют 100 мл  $\text{EtOAc}$  и экстрагируют 100 мл водного  $\text{NaHCO}_3$ . Объединенные органические слои промывали 200 мл солевого раствора (100 мл  $\times$  2), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка.

**[0537]** Неочищенный продукт растворяли в 100 мл ДХМ, к смеси растворителей гептан/ТВМЕ (об./об. 9:1, 500 мл) медленно по каплям добавляли раствор сырого продукта из воронки для проведения процесса осаждения. Этот процесс занял около 0,5 часа. Чистый продукт собирали в виде белого твердого вещества на воронке Бюхнера, осадок продукта промывали смесью растворителей гептана (100 мл  $\times$  2) и упаривали до высыхания.

Соединение **7-4-6** (11,0 г, 7,75 ммоль, выход 98,4%, чистота 91,4%) получали в виде белого твердого вещества. ВЭЖХ (метод **A**):  $RT = 5,661$  мин и ЖХМС (метод **F**):  $RT = 1,365$  мин;  $m/z$ :  $[M + H]^+ = 1298,4$ .

**Общий порядок приготовления УТТС 4мер 7-4-7**



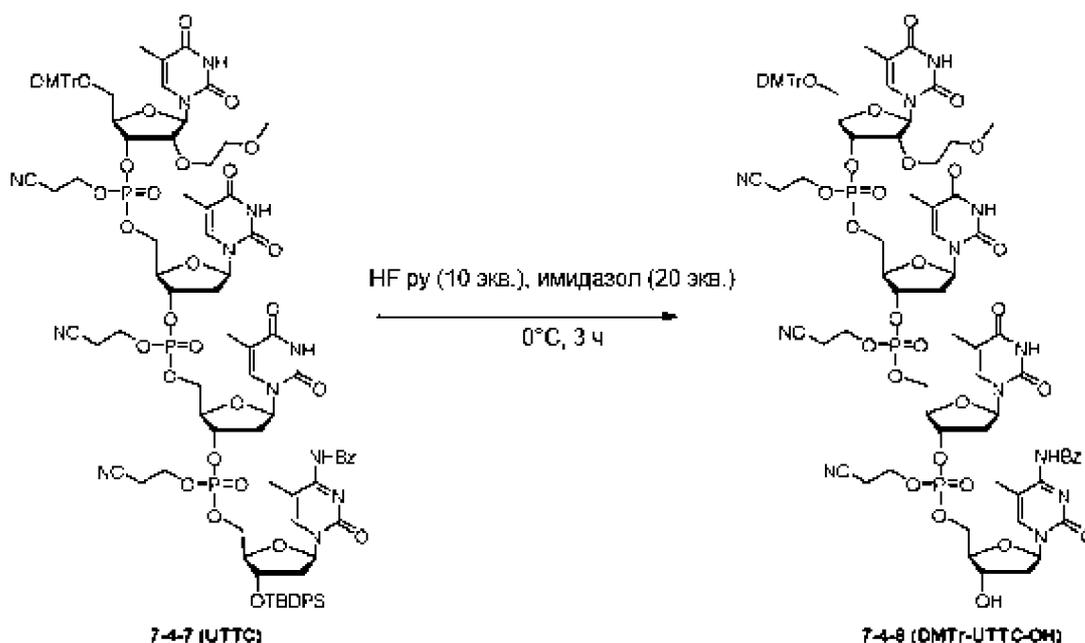
**[0538]** Соединение **7-4-6** (11,0 г, 8,47 ммоль, 1,00 экв.) и **Т-амидит МОЕ** (7,63 г, 9,32 ммоль, 1,10 экв.) выпаривали совместно с ACN (100 мл × 3) в атмосфере аргона в 250 мл одногорлую круглодонную колбу и молекулярное сито 3А (3,00 г) добавляли в одногорлую колбу, под давлением аргона добавляли ACN (55 мл). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 1 ч, а затем к смеси добавляли DCI (1,50 г, 12,7 ммоль, 1,50 экв.). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 1 ч. ВЭЖХ (продукт: RT = 7,056, 7,180 мин; исходный материал: RT = 5,661 мин) показала, что исходный материал израсходован полностью.

**[0539]** После завершения реакции сочетания к вышеуказанному раствору добавляли ВУООН (2,18 г, 16,9 ммоль, 2,32 мл, чистота 70,0%, 2,00 экв.). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 0,5 ч. ВЭЖХ (продукт: RT = 6,897, 6,961 мин; исходный материал: RT = 7,056, 7,180 мин) показала, что исходный материал израсходован полностью. Реакционную смесь выливали в раствор NaHCO<sub>3</sub> и Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (10,0 экв. NaHCO<sub>3</sub> и 5,00 экв. Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> в 500 мл деионизированной воды), а затем разбавляли смесь EtOAc (200 мл), и два слоя разделяли, органический слой промывали NaHCO<sub>3</sub> (200 мл), соевым раствором (200 мл), сушили, фильтровали и упаривали.

**[0540]** Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ (50 мл). Неочищенный растворитель медленно добавляли по каплям в растворитель МТВЕ (600 мл). Желаемый продукт выпадал в осадок. Продукт собирали в виде белого твердого вещества после фильтрации, и твердый осадок промывали изопропиловым эфиром МТВЕ (50 мл × 2). Неочищенное твердое вещество очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (условия pH = 7; MeCN/вода). Соединение **7-4-7 (UTTC 4mer)** (14,5 г, 7,06 ммоль, выход 83,3%, чистота 98,9%) получали в виде белого твердого вещества.

ВЭЖХ (метод **В**): RT = 10,638, 10,822 мин и ЖХМС (метод **Д**): RT = 1,396 мин; m/z: [M-H]<sup>-</sup> = 1014,3.

**Общий порядок приготовления 7-4-8 (DMTr-UTTC-OH)**



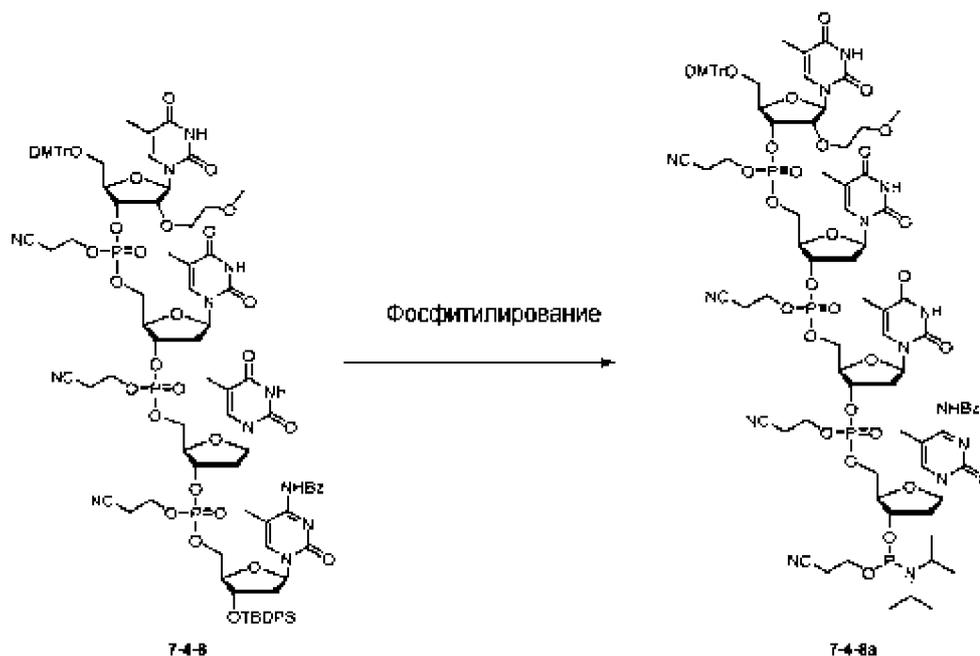
**[0541]** К раствору **7-4-7** (6,60 г, 3,25 ммоль, 1,00 экв.) в АСН (35 мл), а затем в пиридине; гидрофторид (928 мг, 32,4 ммоль, 844 мкл, чистота 70,0%, 10,0 экв.) и имидазол (4,42 г, 64,9 ммоль, 20,0 экв.) в ТГФ (8 мл) добавляли по каплям при 0 °С. Смесь перемешивали при 0 °С в течение 3 ч. ТСХ (дихлорметан: метанол = 10: 1, продукт:  $R_f=0,33$ ) показала, что соединение **7-4-7** полностью израсходовалось и образовались два новых пятна. Согласно ТСХ, реакция протекала неоднозначно.

**[0542]** Реакционную смесь разводили EtOAc (20 мл). Органический слой промывали насыщенным водным  $\text{NaHCO}_3$  (50 мл  $\times$  2), соевым раствором (20 мл) и сушили безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали в вакууме. Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ (5 мл). Неочищенный растворитель медленно добавляли по каплям к растворителю МТВЕ (300 мл). Желаемый продукт выпадал в осадок. Продукт собирали в виде белого твердого вещества после фильтрации, и твердый осадок промывали изопропиловым эфиром МТВЕ (50 мл  $\times$  2).

Соединение **7-4-8 (DMTr-UTTC-OH)** (5,57 г, 2,90 ммоль, выход 89,3%, чистота 93,4%) получали в виде белого твердого вещества.

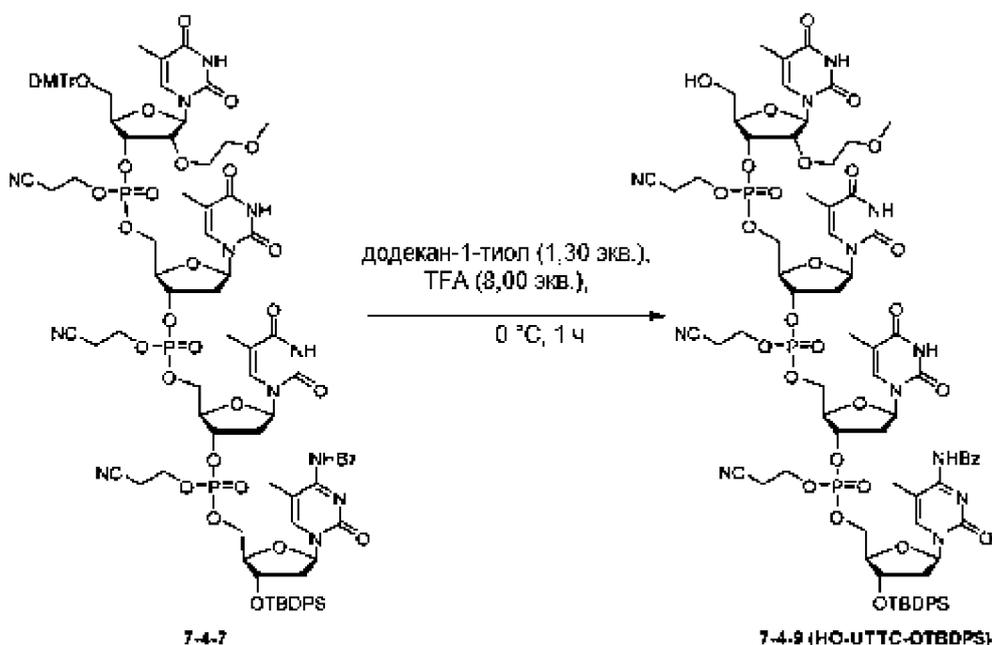
ВЭЖХ (метод **B**): RT = 4,461, 4,761 мин и ЖХМС (метод **D**): RT = 1,237 мин; m/z:  $[\text{M-H}]^- = 1791,5$ .

**Общий порядок приготовления 7-4-8a (Fragment 3)**



**[0543]** Соединение **7-4-8a** синтезировали из соединения **7-4-8** с использованием процедуры, аналогичной описанной выше для синтеза фосфорамидита. ВЭЖХ-МС (метод **G**): RT = 7,335, 7,446, 7,583, 7,637 мин; m/z: [M-H]<sup>-</sup> = 1991,6 для соединения **7-4-8a**.

**Общий порядок приготовления 7-4-9 (HO-UTTC-OTBDPS)**



**[0544]** К раствору **7-4-7** (6,00 г, 2,95 ммоль, 1,00 экв.) в ACN (30 мл) добавляли додекан-1-тиол (896 мг, 4,43 ммоль, 1,06 мл, 1,50 экв.), а затем ТФУ (2,69 г, 23,6 ммоль, 1,75 мл, 8,00 экв.) добавляли по каплям при 0 °C. Смесь перемешивали при 0 °C в течение 1 ч. ТСХ (ДХМ: MeOH = 10:1, продукт: R<sub>f</sub> = 0,35) показала, что **7-4-**

7 было полностью израсходовано и образовались два новых пятна. Согласно ТСХ, реакция протекала неоднозначно.

**[0545]** Реакционную смесь выливали в  $\text{NaHCO}_3$  (10,0 экв.  $\text{NaHCO}_3$  в 100 мл деионизированной воды), затем разбавляли  $\text{EtOAc}$  50 мл и экстрагировали 100 мл водного  $\text{NaHCO}_3$ . Объединенные органические слои промывали 200 мл солевого раствора (100 мл  $\times$  2), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка.

**[0546]** Неочищенный продукт повторно растворяли в ДХМ (80 мл). Неочищенный растворитель медленно добавляли по каплям к растворителю МТВЕ (300 мл). Желаемый продукт выпадал в осадок. Продукт собирали в виде белого твердого вещества после фильтрации, и твердый осадок промывали изопропиловым эфиром МТВЕ (50 мл  $\times$  2).

Соединение **7-4-9 (HO-UTTC-OTBDPS)** (4,97 г, 2,86 ммоль, выход 96,6% и чистота 99,3%) получали в виде белого твердого вещества.

**ВЭЖХ** (метод **B**): RT = 6,895 мин; **ЖХМС**(метод**F**): RT = 1,323 мин; m / z:  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 1729,6$ .

### **C. Конвергентный синтез целевого олигонуклеотида ASO 9-1**

**[0547]** Метод ВЭЖХ-МС синтеза **ASO 9-1 & 9-2** и их промежуточных соединений **7a-e**

**Колонка:** колонка с олигонуклеотидом VEN C18 ACQUITY UPLC, 130Å, 1,7 мкм, 2,1 мм  $\times$  150 мм;

**Температура колонки:** 35°C;

**Диапазон масс** от 200 до 2300;

**Полярность МС:** отрицательная

**Мобильные фазы:(Подвижные фазы:)**

Раствор А: 5 mM ацетат трибутиламина (ТБуАА) в 10%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 1 мкМ ЭДТА;

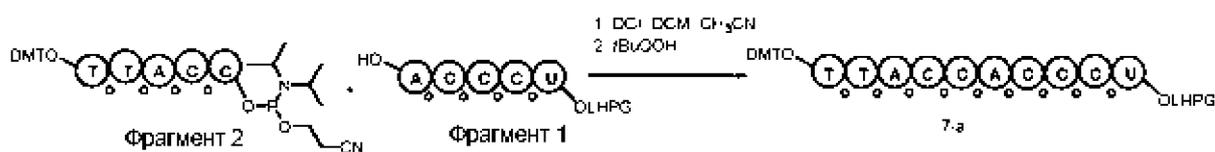
Раствор В: 5 mM ТБуАА в 80%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 1 мкМ ЭДТА.

**Градиент:**

Время	А	В	Поток	Давление
Мин	%	%	мл/мин	бар
0,50,	75,00	25,00	0,51	---
5,00,	50,00	50,00	0,51	---
18,00,	20,00	80,00	0,51	---
19,00,	75,00	25,00	0,51	---
20,00,	75,00	25,00	0,51	---

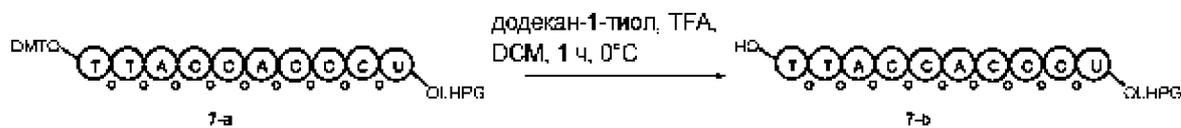
**[0548]** ASO 9-1 был синтезирован с использованием процедуры конвергентного синтеза, аналогичной описанному выше способу синтеза ASO 9.

### **Общая методика получения соединения 7-a**



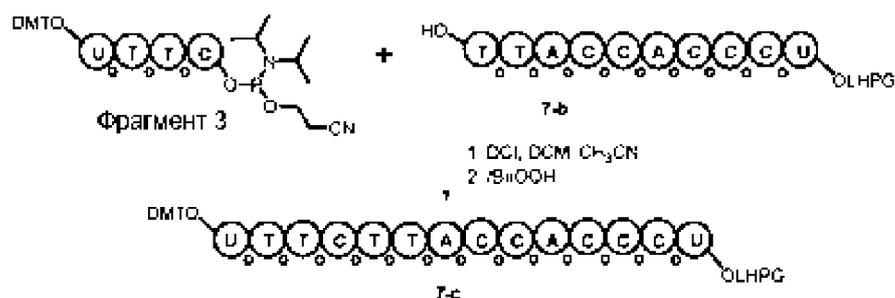
[0549] Фрагменты 1 и 2 были соединены для синтеза **7-а** с использованием процедуры, аналогичной описанной выше. **7-а** был охарактеризован с помощью ВЭЖХ и масс-спектрометрии после снятия защиты группы LHPG с помощью аммонолиза; ВЭЖХ-МС: RT = 7,247 мин и m/z = 1831,5 (см. ФИГ. 21).

**Общая методика получения соединения 7-б**



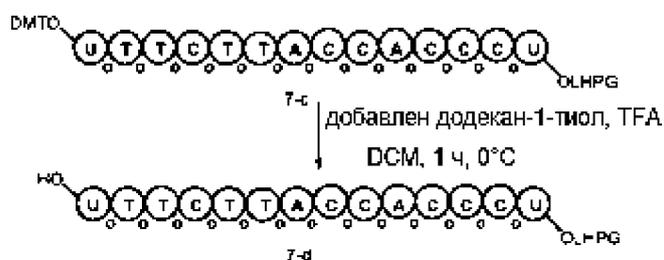
[0550] Соединение **7-б** было синтезировано из **7-а** с использованием описанного выше метода детритилирования. **7-б** был охарактеризован с помощью ВЭЖХ и масс-спектрометрии после снятия защиты группы LHPG с использованием аммонолизной ВЭЖХ-МС: RT = 6,250 мин и m/z = 1680,4 (см. ФИГ.22)

**Общая методика получения соединения 7-с**



[0551] Фрагмент 3 и **7-б** были соединены для синтеза **7-с** с использованием процедуры, аналогичной описанной выше. **7-с** был охарактеризован с помощью ВЭЖХ и масс-спектрометрии после снятия защиты с группы LHPG с использованием аммонолизной ВЭЖХ-МС: RT = 7,627 мин и m/z = 1650,6 (см. ФИГ. 23).

**Общая методика получения соединения 7-д**



[0552] Соединение **7-д** было синтезировано из **7-с** с использованием описанного выше метода детритилирования. **7-д** охарактеризовали с помощью ВЭЖХ и масс-спектрометрии после снятия защиты с группы LHPG с помощью аммонолиза; ВЭЖХ-МС: RT = 7,801 мин и m/z = 1549,9 (см. ФИГ. 24).



ASO-9-2 синтезировали путем связывания фрагмента 7-е и фрагмента 4 с использованием процедуры, аналогичной описанной для синтеза ASO 9 и ASO-9-1. **ASO-9-2** был подтвержден с помощью ВЭЖХ-МС: RT = 9,917 мин и m/z: = 2189,4 (см. Фиг. 27).

**Пример 8. Синтез стереоспецифических олигонуклеотидов с использованием PSI Chemistry.**

[0556] Для метода преп.-ВЭЖХ, описанного ниже, растворители подвижной фазы описаны в формате [А-В], в котором А относится к подвижной фазе А, а В относится к подвижной фазе В. Например, подвижная фаза [TEAB(10 мМ)-ACN ] означает, что 10 мМ TEAB использовали в качестве подвижной фазы А, а ацетонитрил для ВЭЖХ использовали в качестве подвижной фазы В.

[0557] Следующие ниже аналитические методы были использованы для синтеза соединений и олигонуклеотидов, описанных в Примере 8.

[0558] Метод ВЭЖХ:

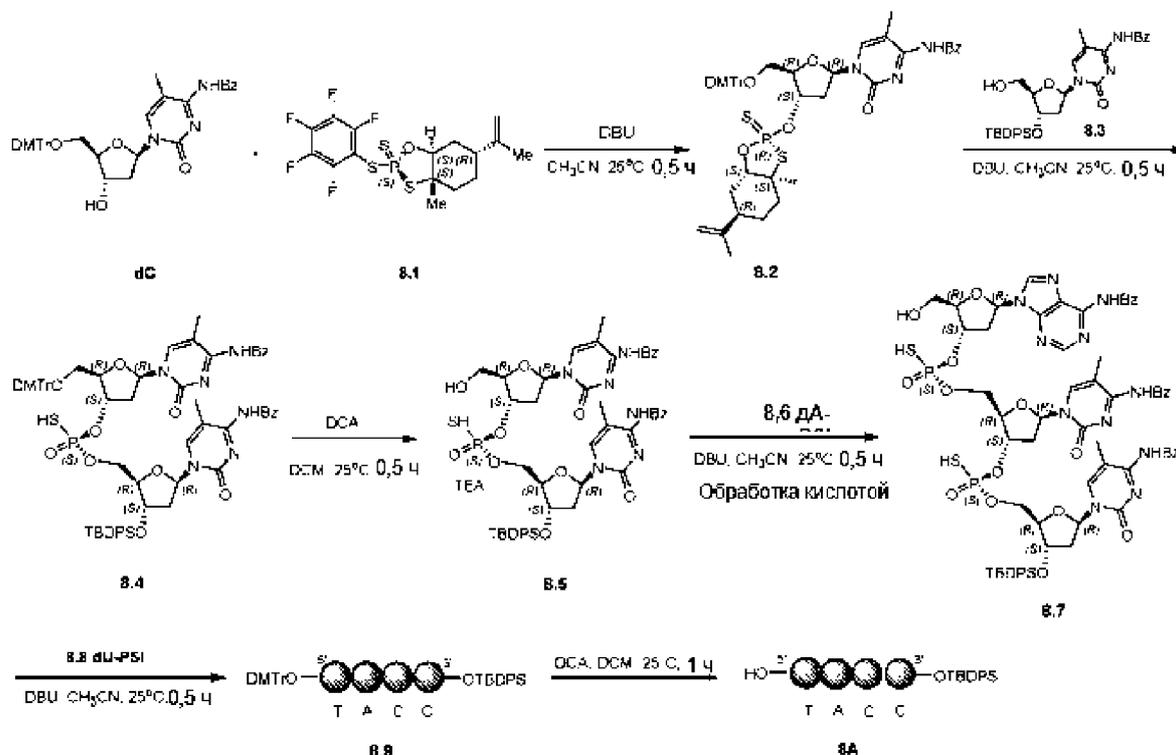
<b>Название метода:</b>	10-80HPLC-CD-10мин					
<b>Прибор:</b>	Shimadzu LC-20AD					
<b>Колонка:</b>	XBridge Shield RP18 2.1*50мм, 5мкм					
<b>Температура колонки:</b>	40 °С					
<b>Подвижная фаза А(МРА)</b>	H <sub>2</sub> O+10 мМ NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>					
<b>Подвижная фаза В(МРВ)</b>	Ацетонитрил для ВЭЖХ					
<b>Скорость потока:</b>	0,8 мл/мин(0,01-9 мин), 1,2мл/мин(9,01 -10 мин)					
<b>Коэффициент градиента</b>	Время (мин)	0,01.	8.	9.	9,01.	10.
	МРА(%)	90.	20.	20.	90.	90.
	МРВ(%)	10.	80.	80.	10.	10.
<b>Обнаружение:</b>	Диодная матрица (DAD) 220 нм, 215 нм, 254 нм					

[0559] ЖХ-МС метод

<b>Название метода:</b>	5-95CD-MS2000_2мин					
<b>Прибор:</b>	Shimadzu LC-20AD&MS 2020					
<b>Колонка:</b>	XBridge Shield RP18 2.1*50мм, 5мкм					
<b>Температура колонки:</b>	40 °С					
<b>Подвижная фаза А (МРА)</b>	H <sub>2</sub> O+10мМ NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>					
<b>Подвижная фаза В (МРВ)</b>	Ацетонитрил					
<b>Скорость потока:</b>	1,0 мл/мин					
<b>Коэффициент градиента</b>	Время (мин)	0,01	1,00	1,80	1,81	2,2
	МРА(%)	95	5	0	95	95
	МРВ(%)	5	95	100	5	5
<b>Обнаружение:</b>	220 нм, 254 нм					
<b>Остановить время:</b>	2,2 мин					

Режим МС:	Положительный
Диапазон МС:	100-2000

### 1.1 Линейный синтез фрагмента dTAdCdC



#### Получение соединения 8,2

**[0560]** Соединение **dC** (10 г, 15,44 ммоль, 1 экв.) было азеотропным с ACN (10 мл × 2). К раствору соединения **dC** (10 г, 15,44 ммоль, 1 экв.) и реагента PSI, соединение **8.1**, (8,96 г, 20,07 ммоль, 1,3 экв.) в ACN (60 мл) добавляли DBU (3,06 г, 20,07 ммоль, 3,03 мл, 1,3 экв.) при 0 °C в атмосфере N<sub>2</sub>. Смесь перемешивали при 25 °C в течение 0,5 часа. ТСХ (петролейный эфир/этилацетат = 2:1, R<sub>f</sub> = 0,54) показала, что Соединение **dC** полностью израсходовалось. Смесь фильтровали через короткий слой силикагеля, затем силикагель промывали EA (60 мл × 2). Органическую фазу промывали насыщенным KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> (30 мл), насыщ. NaHCO<sub>3</sub> (30 мл), соевым раствором (30 мл × 2), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и растворитель удаляли в вакууме. Неочищенный продукт очищали хроматографией (SiO<sub>2</sub>, петролейный эфир/этилацетат = от 50/1 до 1/1). Соединение **8.2** (7,3 г, 8,00 ммоль, выход 51,83%, чистота 98%) получали в виде белого твердого вещества. ПРС (в процессе контроля): ТСХ (петролейный эфир/этилацетат = 2:1, продукт (R<sub>f</sub>) = 0,54). ВЭЖХ показывает RT = 8,666.

#### Получение соединения 8,4

**[0561]** Соединение **8.3** (4 г, 6,85 ммоль, 1 экв.) было азеотропным с ACN (10 мл × 2). Соединение **8.3** (3,5 г, 6,00 ммоль, 1 экв.) в ACN (24 мл) добавляли к молекулярному сити 3A (1 г, 1,00 экв.) при 25 °C. Смесь перемешивали при 25 °C в течение 0,5 часа. Затем добавляли Соединение **8.2** (5,90 г, 6,60 ммоль, 1,1 экв.) и DBU (2,74 г, 17,99 ммоль, 2,71 мл, 3 экв.) при 25 °C. Смесь перемешивали при 25 °C в течение 0,5 часа. ЖХМС (продукт: RT = 1,469 мин) показывает, что Соединение **8.2** полностью израсходовано. Смесь разбавляли этилацетатом (10 мл), 20% лимонной кислотой (10 мл). Органическую фазу промывали H<sub>2</sub>O (10 мл), насыщ.

NaHCO<sub>3</sub> (10 мл), соевым раствором (10 мл), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и растворитель удаляли в вакууме. Неочищенный продукт использовали без очистки. Соединение **8.4** [(m/z-H<sup>+</sup>) = 1307,6, 9,48 г, сырое] получали в виде желтого твердого вещества.

**[0562]** Стереоселективность соединения **8.4** проверяли на сверхтекучем хроматографе (SFC) (описанном ниже). Соединение **8.4** продемонстрировало единственный пик при RT = 2,30 мин (см. ФИГ. 28). Других пиков не обнаружено. Стереоселективность > 99,5%.

#### Метод SFC:

Инструмент: CAS-TJ-ANA-SFC-1 (Waters SFC-MC)

Колонка: chiralcel OD-3, 4,6\*100 мм, 3 мкм

Подвижная фаза: А для SFC CO<sub>2</sub> и В для EtOH (0,05% IPAм)

Градиент: В составляет 40% за 10 минут

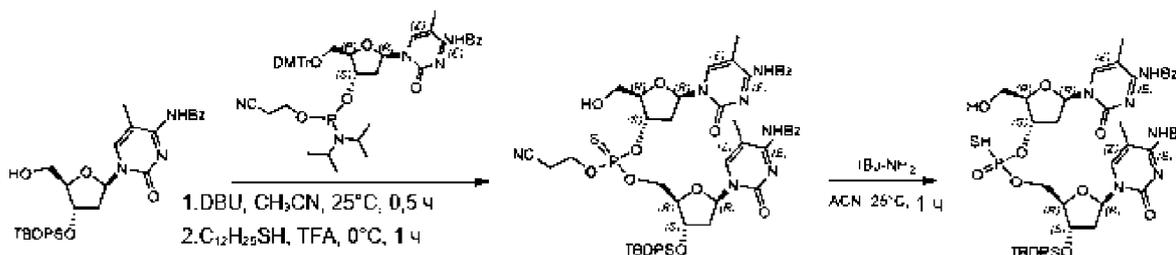
Скорость потока: 4,0 мл/мин

Температура колонки: 35°C

Длина волны: 220 нм

Противодавление в системе: 100 бар

**[0563]** Для сравнения, рацемический образец был синтезирован химическим методом амида в качестве стандарта с 2 временами удерживания: 2,79 мин и 4,33 мин (см. ФИГ. 29).



#### Получение соединения 8.5

**[0564]** К раствору соединения **8.4** (7,85 г, 5,99 ммоль, 1 экв.) в ДХМ (55 мл) добавляли 2,2-дихлоруксусную кислоту (5,18 г, 40,18 ммоль, 3,3 мл, 6,70 экв.) при 25 °С в атмосфере N<sub>2</sub>. Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. ЖХМС (продукт: RT = 1,352 мин) показывает, что Соединение **8.4** полностью израсходовано. Смесь разбавляли ТЕАВ (10 мл), ДХМ (10 мл). Органическую фазу промывали H<sub>2</sub>O (10 мл), насыщ. NaHCO<sub>3</sub> (10 мл), соевым раствором (10 мл × 2), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и растворитель удаляли в вакууме. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) (колонка: YMC-Triart Prep C18 250\*50 мм\*10 мкм; подвижная фаза: [ТЕАВ (10 мМ) -ACN]; В%: 45% -65%, 22 мин). Соединение **8.5** (3,8 г, 3,70 ммоль, выход 61,68%, чистота 98%) получали в виде белого твердого вещества. МС (m-H<sup>+</sup>)/z = 1005,4,

#### Получение соединения 8,7

**[0565]** Соединение **8.5** (3,5 г, 3,48 ммоль, 1 экв.) было азеотропным с ACN (10 мл × 2). Соединение **8.5** (3,5 г, 3,48 ммоль, 1 экв.) в ACN (25 мл). добавляли молекулярное сито 3Å (0,5 г, 3,48 ммоль, 1,00 экв.) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. Затем добавляли Соединение **8.6** (4,71 г, 5,21 ммоль, 1,5 экв.) и DBU (1,59 г, 10,43 ммоль, 1,57 мл, 3 экв.) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. ЖХМС (продукт: RT = 1,314 мин, (m-H<sup>+</sup>)/z = 1740,4) показывает, что Соединение **8.5** полностью израсходовано. Смесь разбавляли ДХМ (10 мл), 20% лимонной кислотой (10 мл × 2). Органическую фазу

промывали H<sub>2</sub>O (10 мл), NaHCO<sub>3</sub> (10 мл), соевым раствором (10 мл), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и растворитель удаляли в вакууме. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (прибор: Shimadzu 20AP; колонка: YMC-Actus Triart C18 150\*30 мм\*5 мкм; подвижная фаза: [TEAB (10 мМ) -ACN]; В%: 20%-60%, 12 мин). Соединение **8.7** (2,7 г, выход 53,79%, чистота 97%) получали в виде желтого твердого вещества.

#### Получение соединения 8,9

**[0566]** Соединение **8.7** (1 г, 694,20 мкмоль, 1 экв.) было азеотропным с ACN (5 мл × 2), Соединение **8.7** (1 г, 694,20 мкмоль, 1 экв.) в ACN (7 мл) добавляли молекулярное сито 3Å (0,5 г, 208,26 мкмоль, 1,00 экв.) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. Затем добавляли Соединение **8.8** (1,10 г, 1,39 ммоль, 2 экв.) и DBU (317,06 мг, 2,08 ммоль, 313,92 мкл, 3 экв.) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. ЖХМС (продукт: RT = 1,254 мин) показывает, что Соединение **8.7** полностью израсходовано. Смесь разбавляли ДХМ (30 мл), pH = 3, лимонной кислоты (20 мл). Органическую фазу промывали H<sub>2</sub>O (20 мл), TEAB (20 мл), соевым раствором (20 мл), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и растворитель удаляли в вакууме. Неочищенный продукт использовали без очистки. Соединение **8.9** получали в виде желтого твердого вещества (МС (m-2H<sup>+</sup>)/z = 807,3, 2,1 г, чистота ЖХМС 75,49%).

#### Получение соединения 8A

**[0567]** К раствору Соединения **8.9** (1,43 г, 693,12 мкмоль, 1 экв.) в ДХМ (12 мл) добавляли 2,2-дихлоруксусную кислоту (1,13 г, 8,77 ммоль, 720,00 мкл, 12,65 экв.) при 25°C в атмосфере N<sub>2</sub>. Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. ЖХМС (продукт: RT = 1,168 мин) показала, что исходный материал израсходован полностью. Смесь разбавляли TEAB (15 мл), ДХМ (25 мл). Органическую фазу промывали H<sub>2</sub>O (20 мл), соевым раствором (20 мл), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и растворитель удаляли в вакууме. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) (колонка: YMC-Actus Triart C18 150\*30 мм\*5 мкм; подвижная фаза: [TEAB (10 мМ)-ACN]; В%: 10%-40%, 10 мин. Соединение **8A** [(m-2H<sup>+</sup>)/z= 879,6, 522 мг, выход 41,0% для двух стадий, чистота 97,6%) получали в виде белого твердого вещества и охарактеризовали с помощью ВЭЖХ и МС (см. Фиг. 30)

#### 1.1.1 Условия связывания при синтезе тетрамера ТАСС:

**[0568]** На основании IPC после реакции связывания конверсия стадий связывания завершилась. Обобщенные условия стадии связывания на разных стадиях и чистота по ВЭЖХ были следующими:

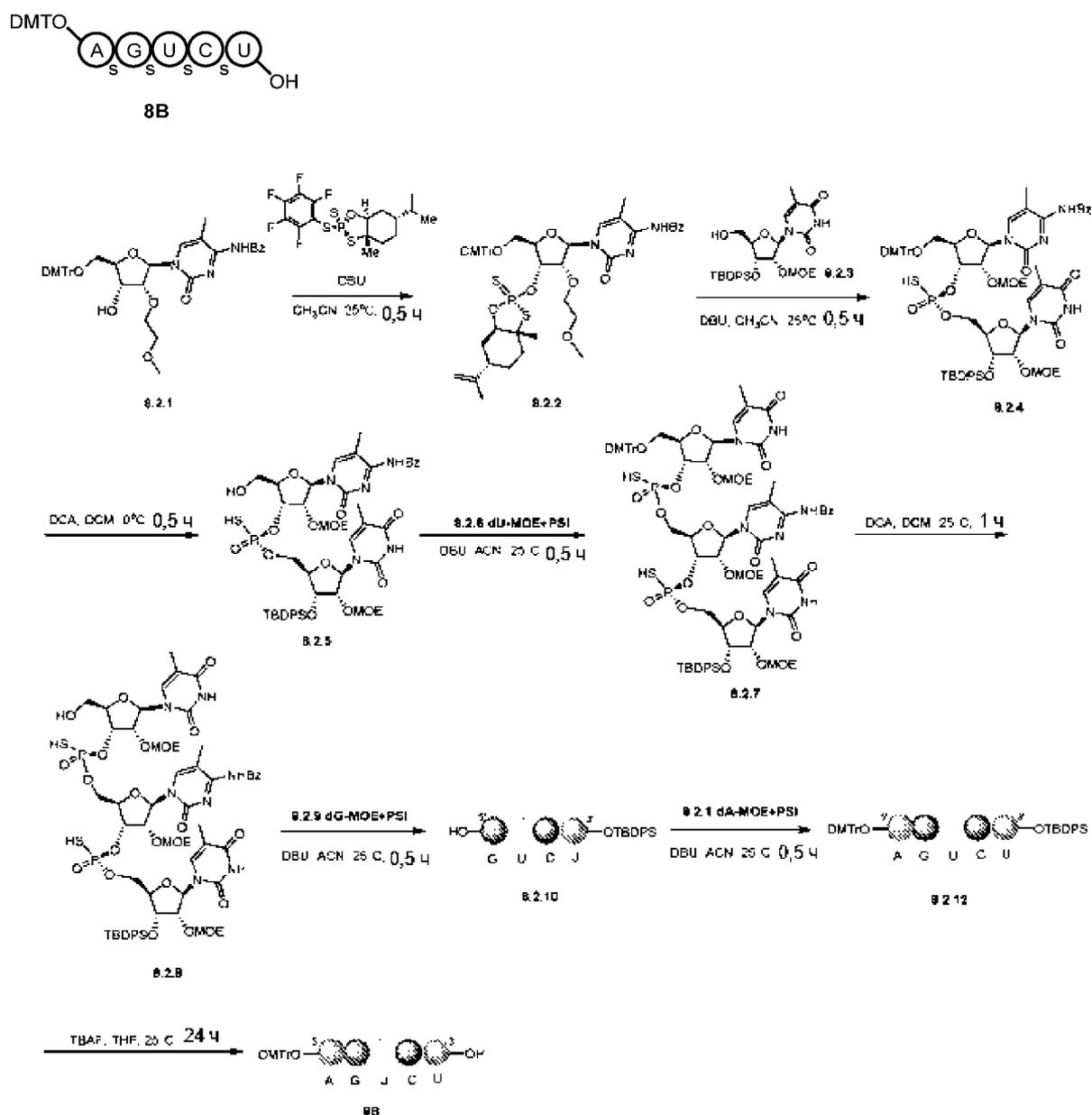
Стадия сочетания	Эквивалент PSI-амидита	Эквивалент DBU	Время реакции (ч)	Температура реакции (°C)	Выход (%)	Чистота (%)
Димер	1,1	3,0	0,5	25	61,68	98
Тример	1,5	3,0	0,5	25	53,79	97
Тетрамер	1,5	3,0	0,5	25	41,00	98

**[0569]** В заключение, тетрамерный олигонуклеотид был синтезирован методом жидкофазного линейного удлинения с использованием PSI-реагента. Детритилирование с помощью DCA вызывает удаление аденозина. Де-тритилирование тримеров достигали путем кислотной обработки с использованием 20%

лимонной кислоты. Эффективность связывания снижается по мере того, как олигонуклеотид становится длиннее. Дополнительные эквиваленты PSI-амидита и DBU необходимы на более поздней стадии связывания. Присутствие бензильной и изобутирильной защитных групп не нарушается в условиях сочетания, особенно при обработке DBU.

## 1.2 Линейное удлинение МОЕ-фрагмента DMTO-AGUCU-OH с использованием химии PSI

**[0570]** О синтезе МОЕ-oligo с использованием реагента PSI не сообщается. Химия PSI была применена к реакции сочетания 2' МОЕ-нуклеозида, и был разработан способ жидкофазного синтеза для удлинения 2' МОЕ-олиго **8B**.



### Синтез соединения 8.2.2

**[0571]** К раствору Соединения **8.2.1** (5,00 г, 6,93 ммоль, 1 экв.) и реагента PSI (4,02 г, 9,01 ммоль, 1,3 экв.) в ACN (35 мл) добавляли DBU (1,37 г, 9,01 ммоль, 1,36 мл, 1,3 экв.) при 0°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. ТСХ (петролейный эфир/этилацетат = 0:1, R<sub>f</sub> = 0.82) показала, что **8.2.1** стартовый материал был полностью израсходован. Смесь фильтровали через короткий слой силикагеля, затем силикагель промывали EA (80 мл × 2). Фильтр промывали насыщенным K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (100 мл), насыщенным NaHCO<sub>3</sub> (100

мл), соевым раствором (100 мл), сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали. Остаток очищали хроматографией ( $\text{SiO}_2$ , петролейный эфир/этилацетат = от 30/1 до 0/1). Соединение **8.2.2** [(m-H<sup>+</sup>)/z = 966,4, 5,5 г, 5,51 ммоль, выход 79,55%, чистота 97%] получали в виде белого твердого вещества.

#### **Синтез соединения 8.2.4**

[0572] Соединение **8.2.2** (5,00 г, 9,01 ммоль, 1 экв.) было азеотропным с ACN (40 мл x 2). Соединение **8.2.3** (9,60 г, 9,92 ммоль, 1,1 экв.) совместно упаривали с ACN (40 мл x 2). К раствору Соединения **8.2.2** (5 г, 9,01 ммоль, 1 экв.) и Соединения **8.2.3** (9,60 г, 9,92 ммоль, 1,1 экв.) в ACN (35 мл) добавляли DBU (4,12 г, 27,04 ммоль, 4,08 мл, 3 экв.) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. ЖХМС показала, что Соединение **8.2.2** было полностью израсходовано. Смесь разбавляли EA (150 мл), 20% лимонной кислотой (80 мл). Органическую фазу промывали насыщ.  $\text{NaHCO}_3$  (150 мл),  $\text{H}_2\text{O}$  (150 мл), соевым раствором (150 мл x 2), сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и растворитель удаляли в вакууме. Неочищенный продукт использовали на следующей стадии без очистки. Соединение **8.2.4** [(m-H<sup>+</sup>)/z = 1353,6, 12,21 г, сырое] получали в виде желтого твердого вещества.

#### **Синтез соединения 8.2.5**

[0573] К раствору Соединения **8.2.4** (12,21 г, 9,01 ммоль, 1 экв.) в ДХМ (85 мл) добавляли 2,2-дихлоруксусную кислоту (8,01 г, 62,10 ммоль, 5,1 мл, 6,89 экв) при 25 °C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. ЖХМС показала, что соединение **8.2.4** было полностью израсходовано. В смесь медленно добавляли TEAB (150 мл), экстрагировали DCM (150 мл). Затем органическую фазу промывали нас.  $\text{NaHCO}_3$  (150 мл),  $\text{H}_2\text{O}$  (150 мл), рассол (150 мл), сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и растворитель удаляли в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью Prep-HPLC: колонка: Agela DuraShell C18 250 \* 50 мм \* 10 мкм, подвижная фаза: [TEAB (10 мМ) -ACN]; В%: 30% -53%, 22 мин. Соединение **8.2.5** [(m-H<sup>+</sup>)/z= 1050,5, 6,9 г, 6,36 ммоль, выход 70,57%, чистота 97%] получали в виде белого твердого вещества.

#### **Синтез соединения 8.2.7**

[0574] Соединение **8.2.5** (4,50 г, 4,28 ммоль, 1 экв.) было азеотропным с ACN (40 мл x 2), Соединение **8.2.6** (5,55 г, 6,42 ммоль, 1,5 экв.) совместно упаривали с ACN (40 мл x 2). К раствору Соединения **8.2.5** (4,5 г, 4,28 ммоль, 1 экв.) в ACN (30 мл) добавляли молекулярное сито 3А (2,40 г, 4,28 ммоль, 1,00 экв) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. Затем добавляли соединение **8.2.6** (5,55 г, 6,42 ммоль, 1,5 экв) при 25 °C. Медленно добавляли DBU (1,95 г, 12,83 ммоль, 1,93 мл, 3 экв) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. ЖХМС показала, что соединение **8.2.5** было полностью израсходовано. Смесь разбавляли ДХМ (200 мл), рН ~ 3 лимонной кислотой (150 мл). Органическую фазу промывали  $\text{NaHCO}_3$  (200 мл),  $\text{H}_2\text{O}$  (200 мл), соевым раствором (200 мл), сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и растворитель удаляли в вакууме. Неочищенный продукт использовали на следующей стадии без очистки. Соединение **8.2.7** (9,3 г, неочищенное) получали в виде желтого твердого вещества.

#### **Синтез соединения 8.2.8**

[0575] К раствору Соединения **8.2.7** (7,48 г, 4,28 ммоль, 1 экв) в ДХМ (60 мл) добавляли 2,2-дихлоруксусную кислоту (7,85 г, 60,88 ммоль, 5 мл, 14,23 экв) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. ЖХМС показала, что соединение **8.2.7** было полностью израсходовано. Смесь разбавляли ДХМ (150 мл), гасили TEAB (150 мл). Органическую фазу промывали  $\text{NaHCO}_3$  (150 мл),  $\text{H}_2\text{O}$  (150 мл), соевым раствором (150 мл), сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и растворитель удаляли в вакууме. Неочищенный продукт растирали с ТВМЕ (250 мл), затем фильтровали, твердое вещество промывали TEAB. Неочищенный продукт очищали с помощью преп.-ВЭЖХ: колонка YMC-Triart Prep C18 250 50 мм\*10 мкм, подвижная фаза:

[TEAB(10 mM)-ACN]; В%: 25% -48%, 22 мин. Соединение **8.2.8** [(m-H<sup>+</sup>)/z= 1444,5, 3,3 г, 2,21 ммоль, выход 51,74%, чистота 97%] получали в виде белого твердого вещества.

#### **Синтез соединения 8.2.10**

[0576] Соединение **2.18** (3,3 г, 2,28 ммоль, 1 экв) было азеотропным с ACN (20 мл x 2), Соединение **8.2.9** (3,29 г, 3,42 ммоль, 1,5 экв) упаривали совместно с ACN (20 мл x 2). К раствору Соединения **8.2.8** (3,3 г, 2,28 ммоль, 1 экв) в ACN (20 мл) добавляли молекулярное сито 3A (1,6 г, 2,28 ммоль, 1 экв) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. Затем добавляли соединение **8.2.9** (3,29 г, 3,42 ммоль, 1,5 экв) и DBU (1,74 г, 11,41 ммоль, 1,72 мл, 5 экв) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. ЖХМС показала, что соединение **8.2.8** было полностью израсходовано. Смесь разбавляли ДХМ (50 мл), 20% лимонной кислотой (50 мл). Органическую фазу промывали TEAB (50 мл), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и растворитель удаляли в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью преп.-ВЭЖХ: колонка: Agela DuraShell C18 250\*50 мм\*10 мкм, подвижная фаза: [TEAB (10 mM) -ACN]; В%: 15%-45%, 22 мин. Соединение **8.2.10** [(m-2H<sup>+</sup>)/z= 967,1, 3,1 г, 1,54 ммоль, выход 67,38%, чистота 96%) получали в виде белого твердого вещества.

#### **Синтез соединения 8.2.12**

[0577] Соединение **8.2.10** (2,1 г, 1,08 ммоль, 1 экв) было азеотропным с ACN (20 мл x 2), Соединение **8.2.11** (2,12 г, 2,17 ммоль, 2 экв) упаривали совместно с ACN (20 мл x 2). К раствору Соединения **8.2.10** (2,1 г, 1,08 ммоль, 1 экв) в ACN (14 мл) добавляли молекулярное сито 3Å (1,2 г, 1,08 ммоль, 1,00 экв) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. Затем добавляли Соединение **8.2.11** (2,12 г, 2,17 ммоль, 2 экв) и DBU (495,42 мг, 3,25 ммоль, 490,51 мкл, 3 экв) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. ЖХМС показала, что Соединение **8.2.10** было полностью израсходовано. Смесь фильтровали с 3A MC, осадок на фильтре промывали ACN (5 мл). Неочищенный продукт очищали с помощью преп.-ВЭЖХ: колонка: Agela DuraShell C18 250\*50 мм\*10 мкм, подвижная фаза: [TEAB (10 mM) -ACN]; В%: 18%-50%, 22 мин. Соединение **8.2.12** [(m-2H<sup>+</sup>)/z = 1371,8, 1,92 г, 678,28 мкмоль, выход 62,53%, чистота 97%] получали в виде белого твердого вещества и охарактеризовали с помощью ВЭЖХ и ЖХМС (см. ФИГ. 31).

#### **Синтез соединения 8B**

[0578] К раствору Соединения **8.2.12** (0,18 г, 65,56 мкмоль, 1 экв) в ТГФ (2 мл) добавляли TBAF (1 M, 196,67 мкл, 3 экв) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 24 часа. ЖХМС показала, что соединение **8.2.12** было полностью израсходовано. Смесь промывали TEAB (10 мл), разбавляли ДХМ (10 мл), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, затем фильтровали и упаривали. Неочищенный продукт очищали с помощью преп.-ВЭЖХ(колонка: YMC-Actus Triart C18 150\*30 мм\*5 мкм, подвижная фаза: [TEAB (10 mM) -ACN]; В%: 30%-60%, 12 мин). Соединение **8B** [(m-3H<sup>+</sup>)/z = 834,8, 0,124 г, 47,48 мкмоль, выход 72,42%, чистота 96%) получали в виде белого твердого вещества и охарактеризовали с помощью ВЭЖХ и ЖХМС (см. ФИГ. 32).

#### 1.2.1 Условия сочетания для фрагмента МОЕ

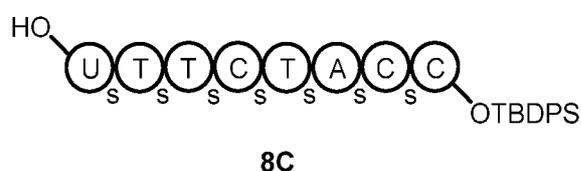
[0579] На основании ИРС после реакции связывания конверсия стадий связывания завершилась. Обобщенные условия стадий сочетания на разных стадиях и чистоты по ВЭЖХ были перечислены следующим образом:

Стадия сочетания	Эквивалент PSI-амидита	Эквивалент DBU	Время реакции (ч)	Температура реакции (°C)	Выход (%)	Чистота (%)

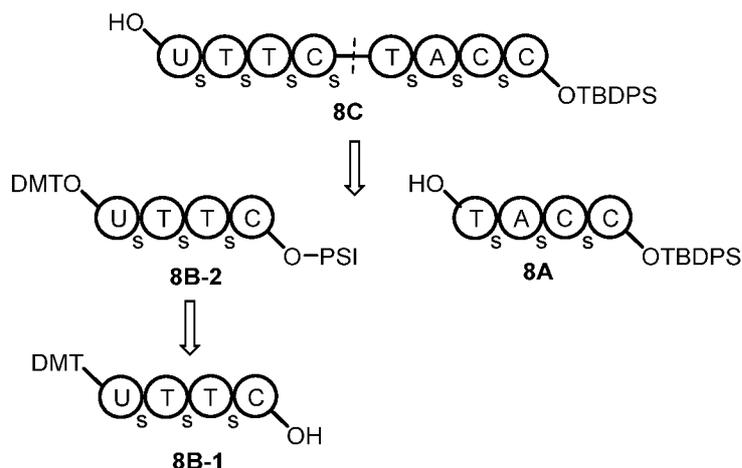
Димер	1,1	3,0	0,5	25	70,57	97
Тример	1,5	3,0	0,5	25	51,74	97
Тетрамер	1,5	5,0	0,5	25	67,38	96
Пентамер	2,0	3,0	0,5	25	62,53	97

**[0580]** В заключение, пентамерный олигонуклеотид был синтезирован с использованием жидкофазного линейного удлинения 2'-МОЕ амидита с реагентом PSI. Детритилирование с помощью DCA вызывает удаление аденозина. Де-тритилирование тримеров достигали путем кислотной обработки с использованием 20% лимонной кислоты. Подобно удлинению дезокси-олигонуклеотида, эффективность связывания снижается по мере того, как олигонуклеотид становится длиннее. Дополнительные эквиваленты PSI-амидита и DBU необходимы на более поздней стадии связывания.

### 1.3 Конвергентный синтез фрагментов.

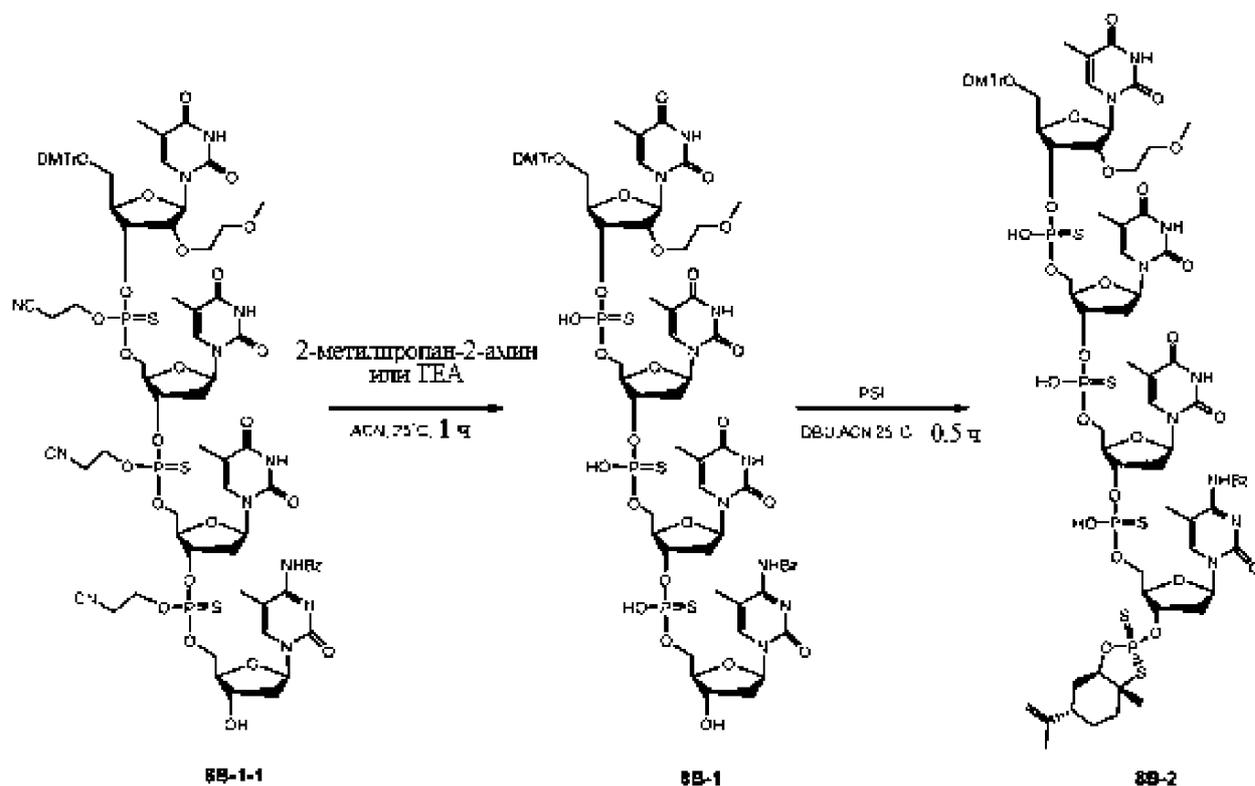


**[0581]** Фрагмент 8C синтезировали путем объединения фрагментов 8A и 8B-2. Фрагмент 8B-2 был синтезирован из 8B-1, и синтез фрагмента 8A был описан выше.



#### *Синтез UdTdTdC фрагмента 8B-2*

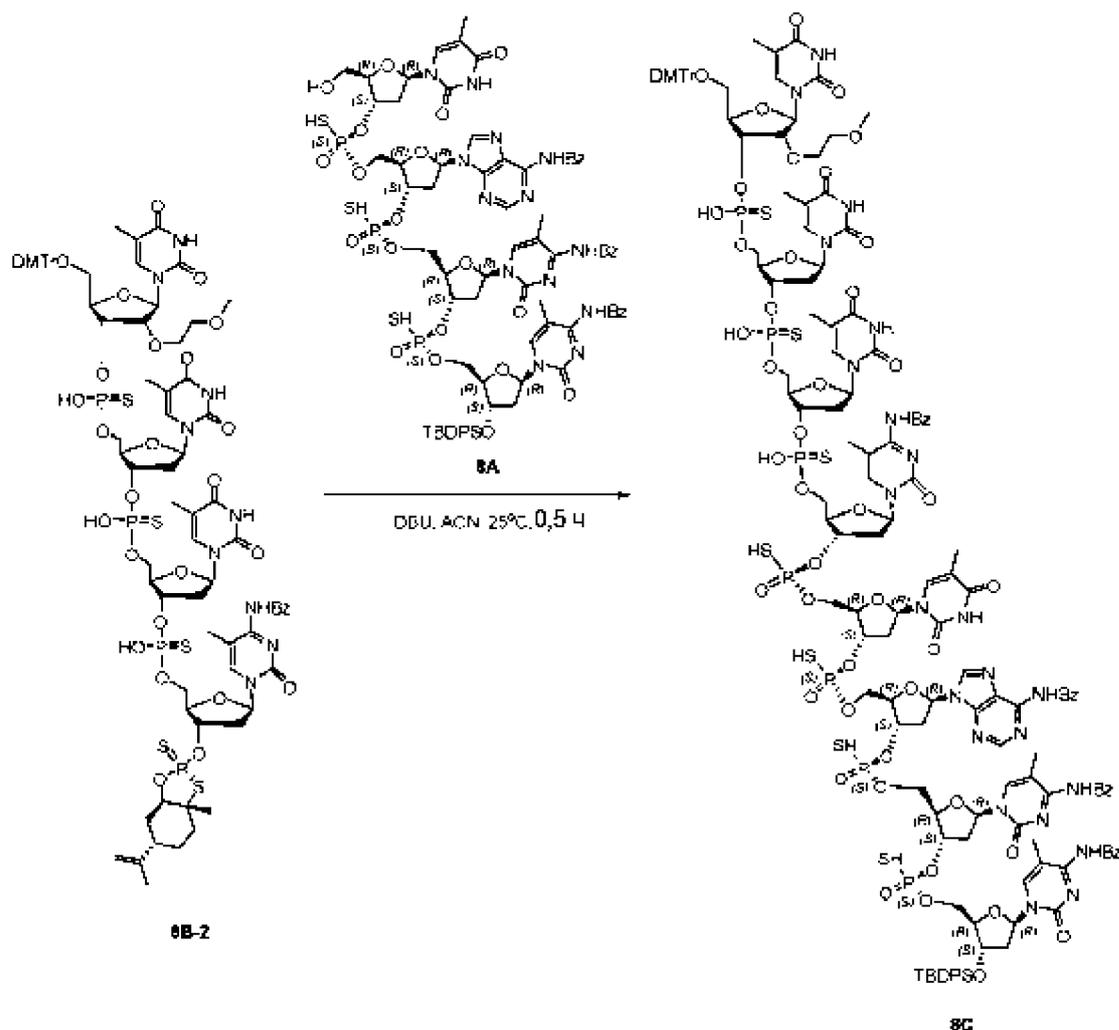
**[0582]** Образование фрагмента UdTdTdC обеспечивалось расщеплением цианоэтильной группы с обработкой амином фрагмента тетрамера, полученного в результате химии амидита во время синтеза ASO 9, а затем связанного с реагентом PSI (10 экв.) в ACN при 0°C. Продукт **8B-2** чрезвычайно чувствителен к воде. Если изделие подвергалось воздействию воздуха, продукт будет гидролизован влагой.



[0583] Скринировали два типа амина для расщепления цианоэтильной группы: 2-метилпропан-2-амин и TEA. Результаты приведены в таблице ниже:

Серия №.	Шкала	Условие снятия защиты	Результат	
			Перед обработкой	После обработки
1	3,3 г	2-Метилпропан-2-амин	Продукт: гидролизированный =14:1	Продукт: гидролизированный =1,1:1
2	200 мг	TEA	Без гидролизованного продукта	Продукт: гидролизированный =2:1
3	500 мг	TEA	Без гидролизованного продукта	Продукт: гидролизированный =4,8:1
4	550 мг	TEA	Без гидролизованного продукта	Продукт: гидролизированный =5,4:1

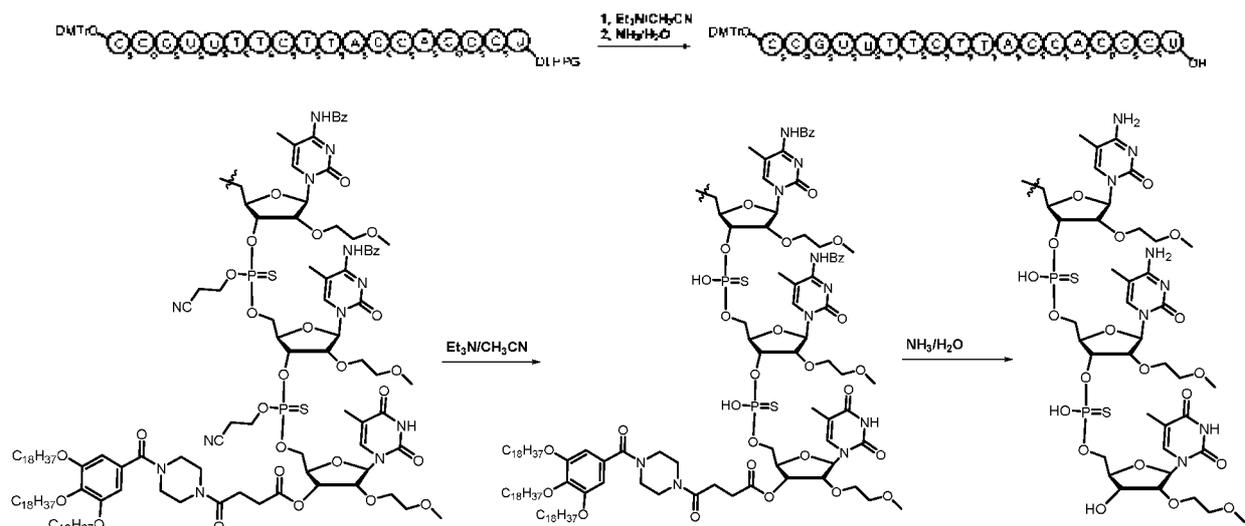
*Конвергентный синтез ASO 8C*



**[0584]** Соединение **8A** (0,05 г, 28,40 мкмоль, 1 экв.) было азеотропным с ACN (2 мл\*2). Соединение **8B-2** (164,32 мг, 85,19 мкмоль, 3 экв.) было азеотропным с ACN (2 мл\*2). К соединению **8B-2** в ACN (0,1 мл) добавляли молекулярное сито 3Å (0,015 г, 1,00 экв.) при 25°C. Смесь перемешивали при 25 °C в течение 0,5 часа. Предварительно смешали Соединение **8A** (0,05 г, 28,40 мкмоль, 1 экв.) с DBU (30,26 мг, 198,78 мкмоль, 29,96 мкл, 7 экв.) в ACN (0,2 мл), чтобы получить смесь, затем добавили вышеуказанную смесь по каплям к Соединению **8B-2** (164,32 мг, 85,19 мкмоль, 3 экв.) в ACN (0,1 мл) при 25 °C в атмосфере Ar. Смесь перемешивали при 25 °C в течение 0,5 часа. ЖХМС и ВЭЖХ показали, что исходный материал израсходован более чем на 90%. Реакционную смесь фильтровали. Смесь очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия, колонка: Phenomenex Gemini-NX 80\*30 мм\*3 мкм; подвижная фаза: [вода (10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN]; V%: 25%-55%, 7 мин. Соединение **8C** [(m-4H<sup>+</sup>)/z = 879,4, 40,0 мг, 9,77 мкмоль, выход 34,4%, чистота 86%] получали в виде белого твердого вещества и охарактеризовали с помощью ВЭЖХ и ЖХМС (см. ФИГ. 33).

**[0585]** В заключение, химия PSI была успешно применена в жидкофазном синтезе дезокситетрамера и 2'-МОЕ пентамера, а также в конвергентном жидкофазном синтезе стереоконтролируемых ASO. Конвергентная реакция сочетания очень чувствительна к влаге. Предварительная азеотропная обработка H<sub>2</sub>O с ACN необходима для обеспечения высокой скорости превращения реакции. Кроме того, концентрация DBU имеет решающее значение для выхода конверсии с 0,64 М (10% по объему DBU в ACN), что рекомендуется для высокой конверсии.

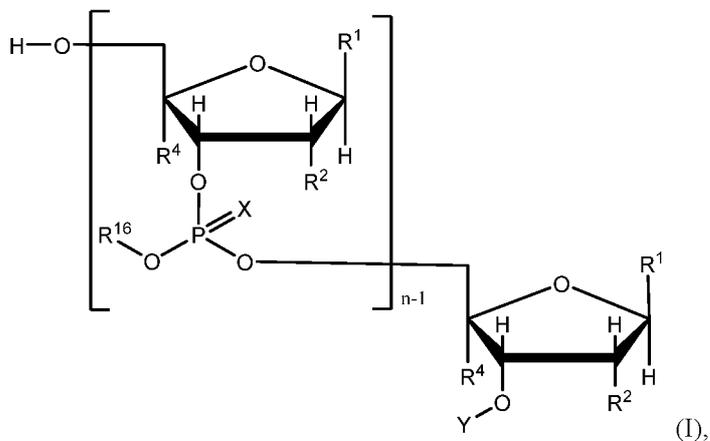
**Пример 9. Снятие защиты с полноразмерного продукта ASO**



**[0586]** Во-первых, с цианоэтильной группы снимали защиту путем растворения 64 г защищенного ASO 9 в 640 мл раствора  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{Et}_3\text{N} = 1:1$ . Растворители удаляли с помощью Rotovap после перемешивания смеси при  $25^\circ\text{C}$  в течение двух часов. Неочищенный продукт переведен на следующую стадию для снятия защиты LHPG и аминозащитных групп. К сырой смеси добавляли 500 мл концентрата  $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$  и реакционную смесь перемешивали при  $25^\circ\text{C}$  до полного растворения твердого вещества (около 20-30 мин). После растворения твердого вещества в  $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$  смесь переносили в стеклянную колбу высокого давления на 1 л и затем нагревали при  $65^\circ\text{C}$  в течение 5 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, и ASO 9 со снятой защитой был готов для последующей очистки. В этой операции сняли защиту со всех защитных групп (кроме 5'-DMTr) на ASO 9. Группа DMTr была удалена после последующей очистки НИС.

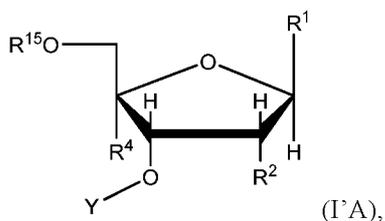
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкофазный способ получения олигонуклеотидного фрагмента формулы (I),

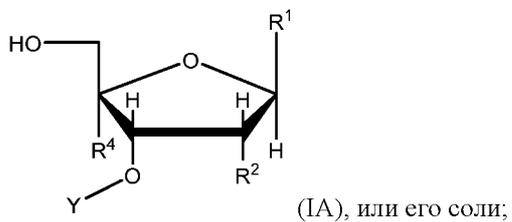


или его соли, включающий стадии:

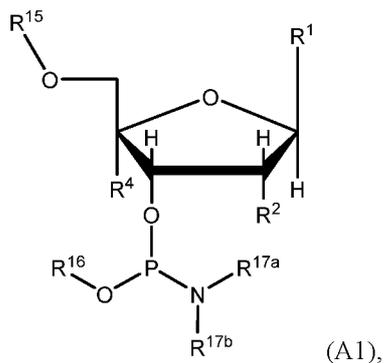
1) снятие защиты с соединения формулы (I' A):



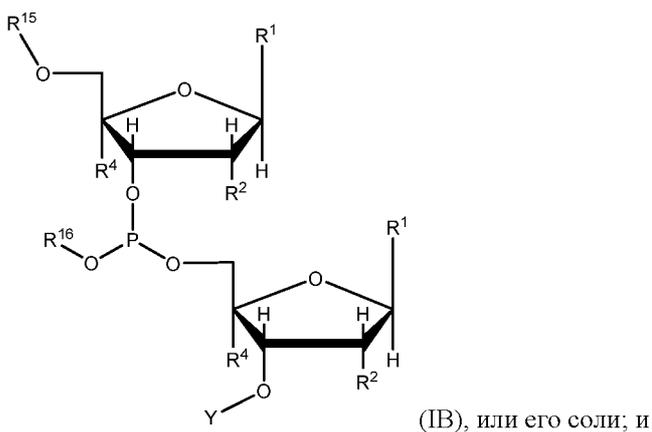
или его соли с образованием соединения формулы (IA):



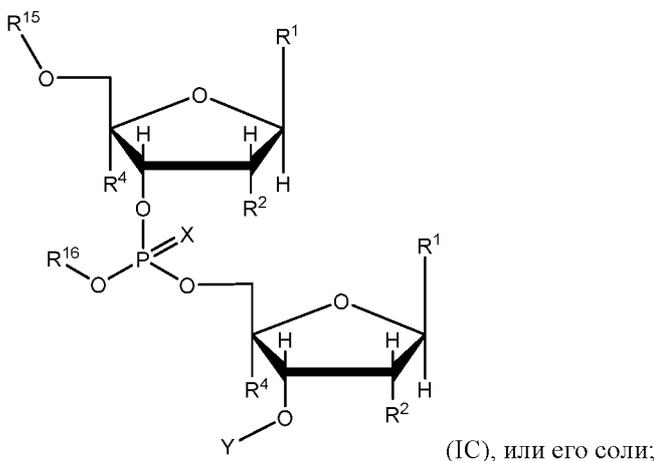
2) взаимодействие соединения формулы (IA) или его соли с соединением формулы (A1):



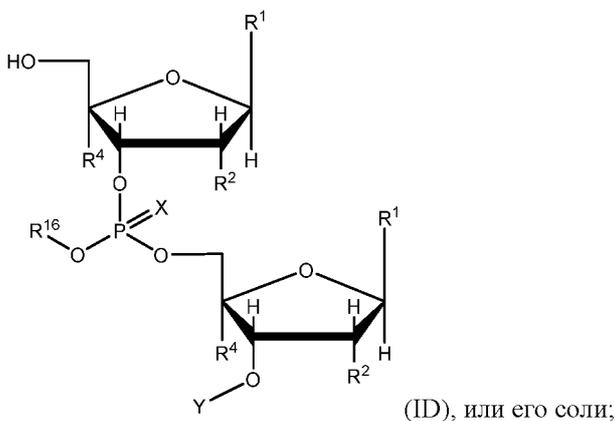
или его солью с образованием соединения формулы (IB):



3) сульфуризация или окисление соединения формулы (IB) или его соли с помощью агента сульфуризации или окисления с образованием соединения формулы (IC):



4) снятие защиты с соединения формулы (IC) или его соли с образованием соединения формулы (ID):



5) начиная с соединения формулы (ID), повторяя стадии 2), 3) и 4) n-2 раз, чтобы получить фрагмент формулы (I) или его соль, где:

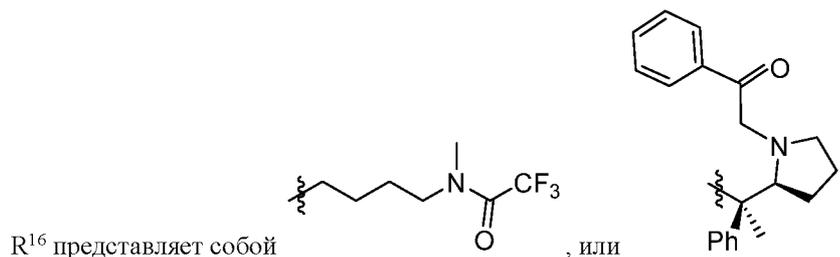
R<sup>1</sup> в каждом случае независимо представляет собой нуклеоснование, где NH<sub>2</sub> нуклеоснования, если присутствует, защищено аминозащитной группой;

R<sup>2</sup> в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и C<sub>1-6</sub>алкокси, необязательно замещенного C<sub>1-6</sub>алкокси;

R<sup>4</sup> в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой R<sup>2</sup>;

R<sup>15</sup> представляет собой защитную группу гидроксила;

R<sup>16</sup> в каждом случае независимо представляет собой C<sub>1-6</sub>алкильную группу, C<sub>2-6</sub>алкенильную группу, фенильную или бензильную группу, каждая из которых необязательно замещена –CN, –NO<sub>2</sub> или галогеном; или

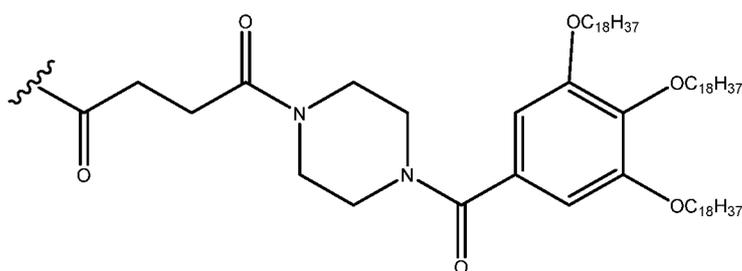


R<sup>17a</sup> и R<sup>17b</sup> независимо представляют собой C<sub>1-6</sub>алкил;

n равно целому числу от 2 до 20;

X в каждом случае независимо представляет собой O или S;

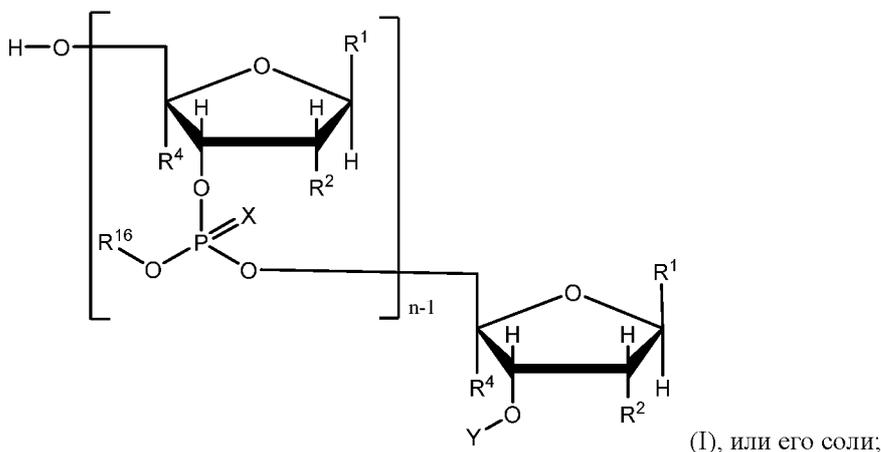
Y представляет собой гидрофобную защитную группу гидроксила, содержащую алкильную цепь, необязательно в котором Y представляет собой



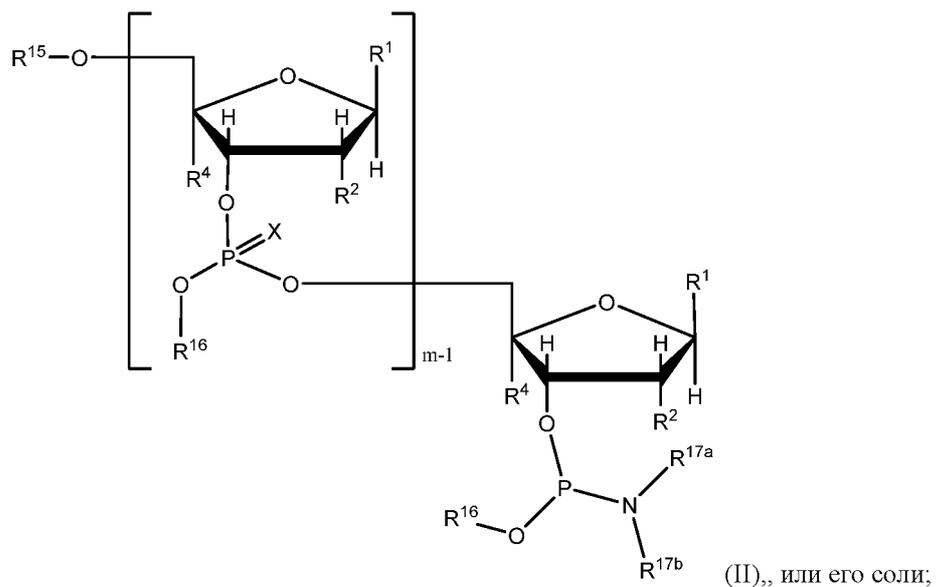
2. Способ по п. 1, в котором фрагмент формулы (I) не очищают хроматографией; необязательно где фрагмент формулы (I) очищают селективным осаждением и/или экстракцией; необязательно где для очистки продукта реакции на любой из стадий 1), 2), 3) и 4) не используют хроматографию; или где продукт реакции на любой из стадий 1), 2), 3) и 4) очищают селективным осаждением.

3. Способ по любому из пп. 1 или 2, в котором любую из реакций снятия защиты на стадии 1) и стадии 4) проводят в растворе, являющемся безводным или по существу безводным.

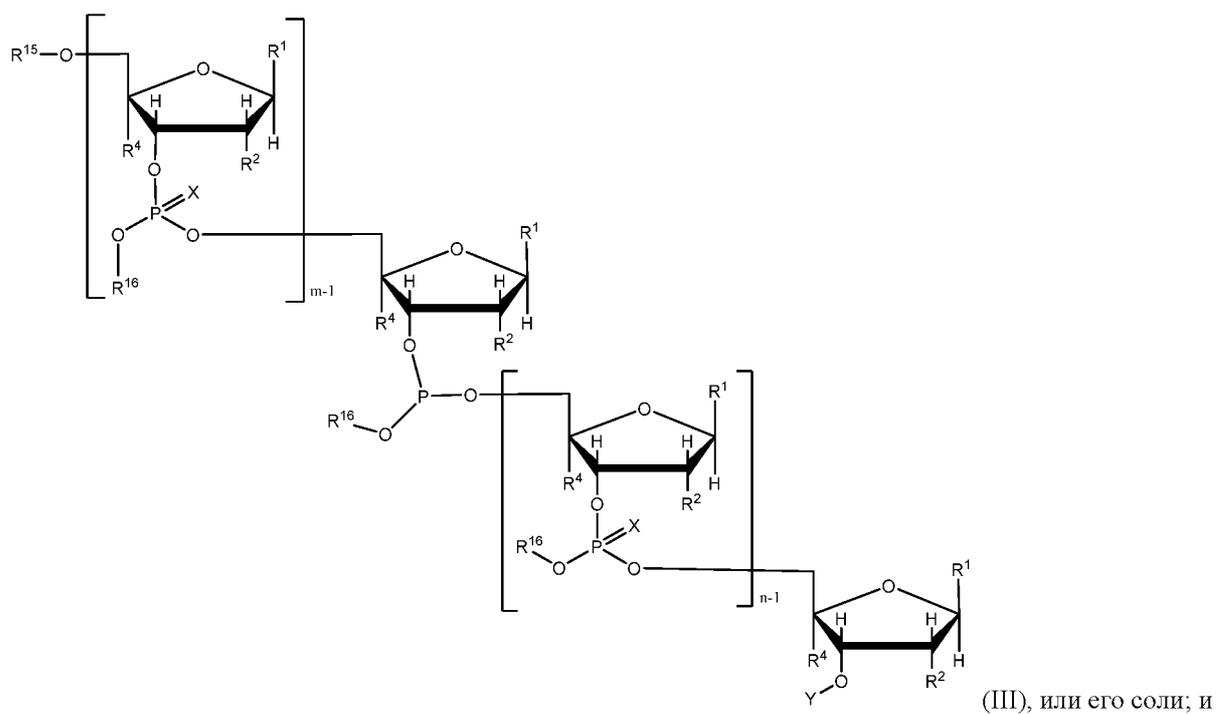
4. Конвергентный жидкофазный способ получения целевого олигонуклеотида, включающий стадии:  
а) связывание олигонуклеотидного фрагмента формулы (I):



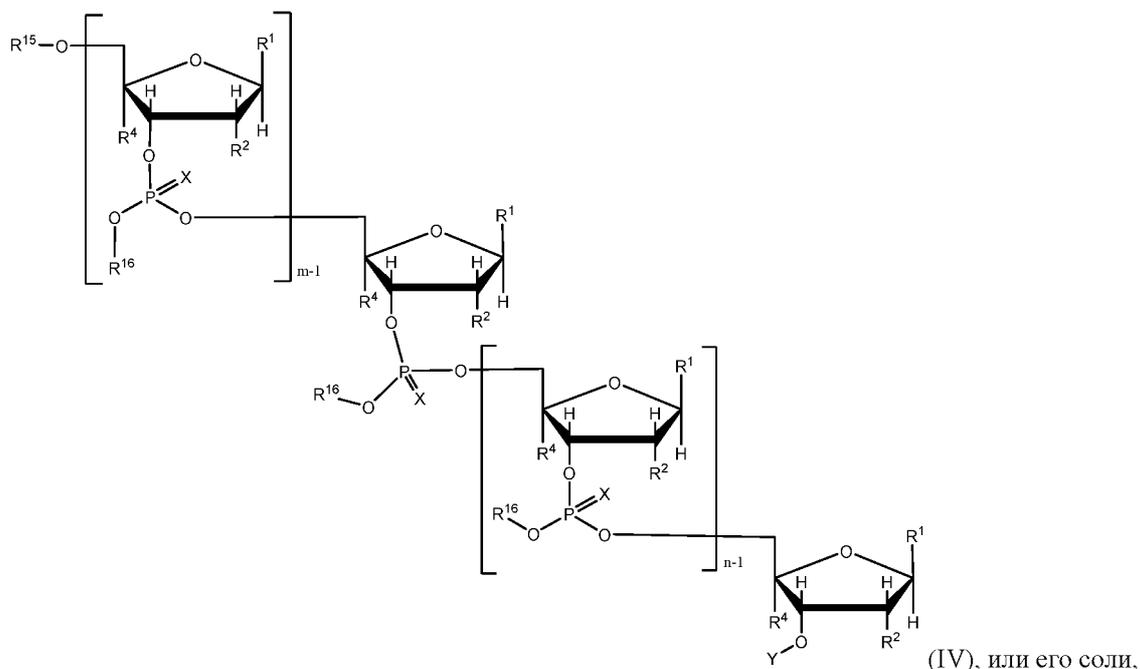
с олигонуклеотидным фрагментом формулы (II):



в растворе с образованием олигонуклеотида формулы (III):



b) сульфуризация или окисление олигонуклеотида формулы (III) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (IV):



где:

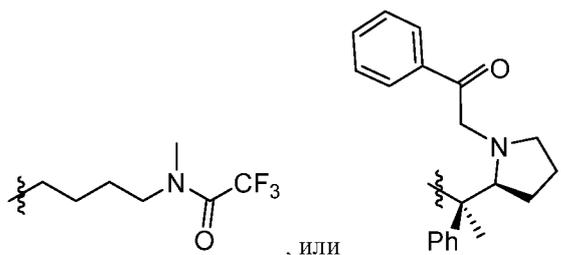
$R^1$  в каждом случае независимо представляет собой нуклеобазу, где  $NH_2$  нуклеобазы, если присутствует, защищено аминозащитной группой;

$R^2$ , в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и  $C_{1-6}$ -алкокси, необязательно замещенного  $C_{1-6}$ -алкокси;

$R^4$  в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой  $R^2$ ;

$R^{15}$  представляет собой защитную группу гидроксила;

$R^{16}$  в каждом случае независимо представляет собой  $C_{1-6}$ -алкильную группу,  $C_{2-6}$ -алкенильную группу, фенильную или бензильную группу, каждая из которых необязательно замещена  $-CN$ ,  $-NO_2$  или галогеном;  
или



$R^{16}$  представляет собой

, или

;

$R^{17a}$  и  $R^{17b}$  независимо представляют собой  $C_{1-6}$ -алкил;

$n$  равно целому числу от 2 до 200; необязательно где 1)  $n$  равно целому числу от 3 до 20; 2)  $n$  равно от 3 до 6; или 3)  $n$  равно 5;

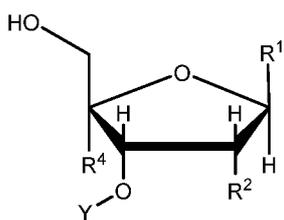
$m$  равно целому числу от 2 до 20; необязательно где  $m$  равно 3, 4, 5 или 6;

$X$  в каждом случае независимо представляет собой O или S;

$Y$  представляет собой гидрофобную защитную группу гидроксила, содержащую алкильную цепь;

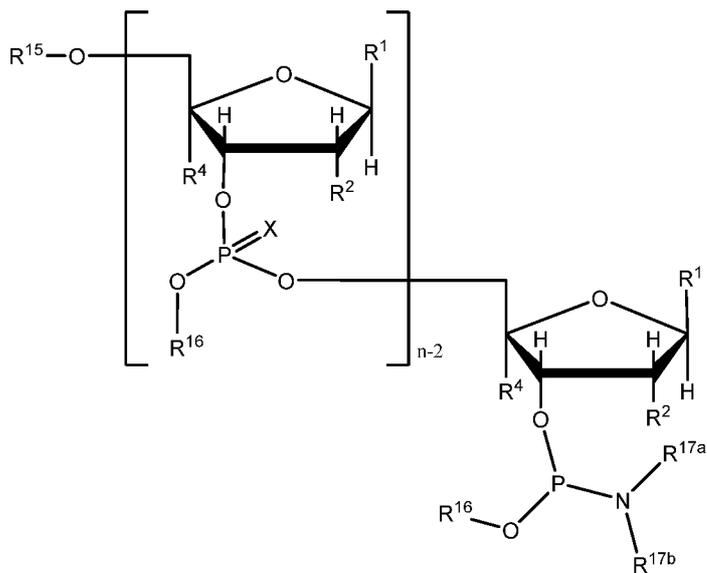
необязательно в котором хроматографию не используют для очистки продукта реакции на любой из стадий a), b), c), d), e), f) и g); или продукт реакции на любой из стадий a), b), c), d), e), f) и g) очищают экстракцией или селективным осаждением.

5. Способ по п. 4, в котором фрагмент (I) можно синтезировать путем связывания нуклеотида формулы (Ia1):



(Ia1), или его соли;

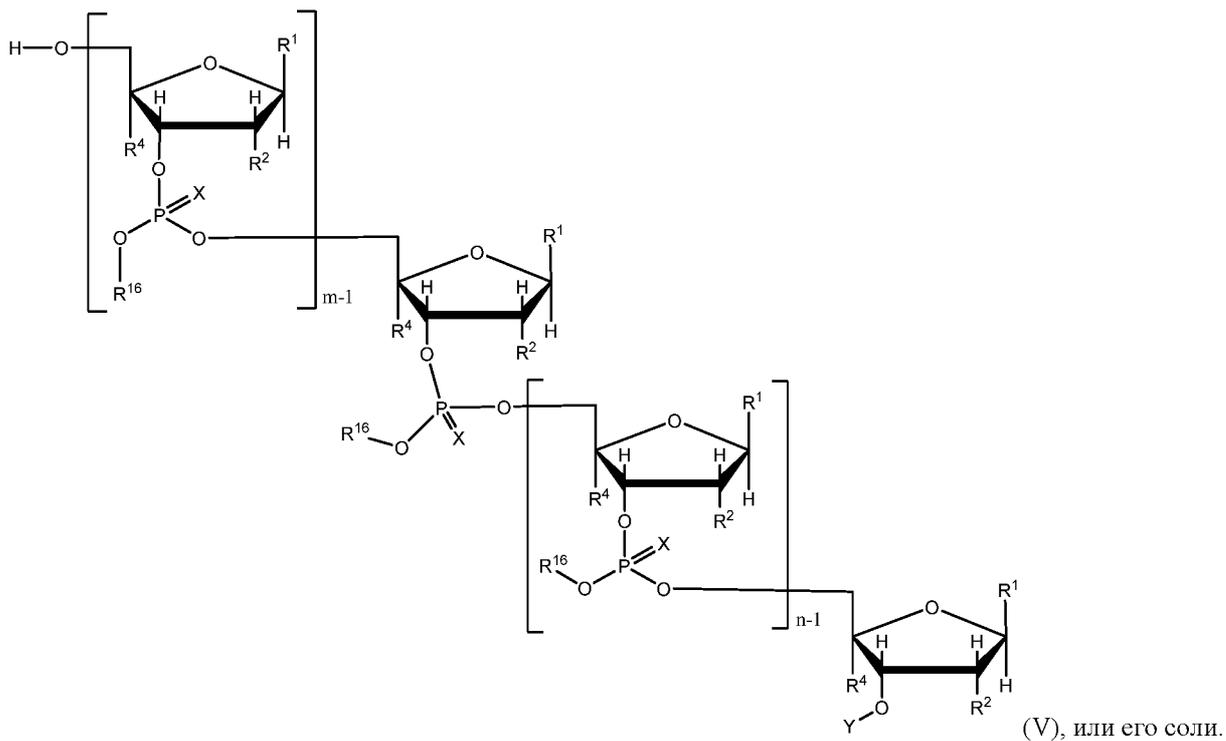
с олигонуклеотидным фрагментом формулы (Ia2):



(Ia2), или его соли,

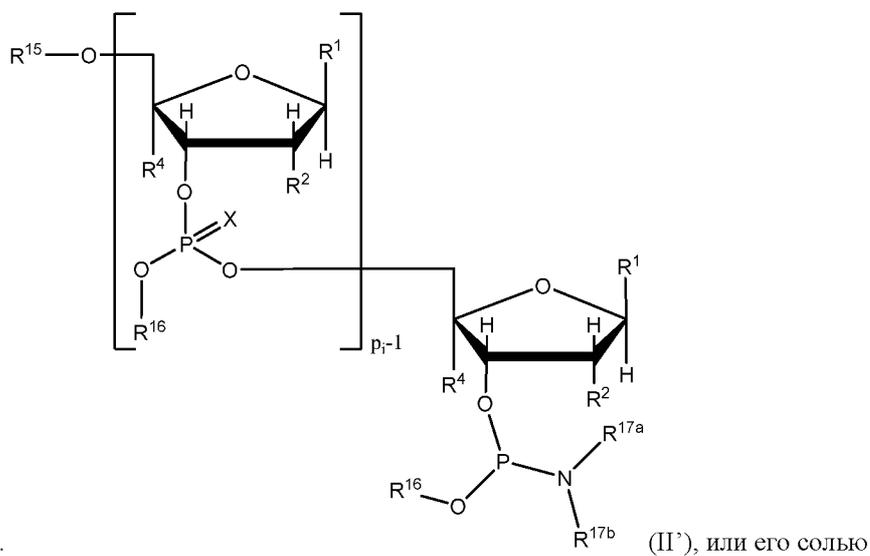
в растворе с образованием олигонуклеотида формулы (I) или его соли.

6. Способ по п.4 или 5, дополнительно включающий стадию с) снятия защиты с олигонуклеотида формулы (IV) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (V):

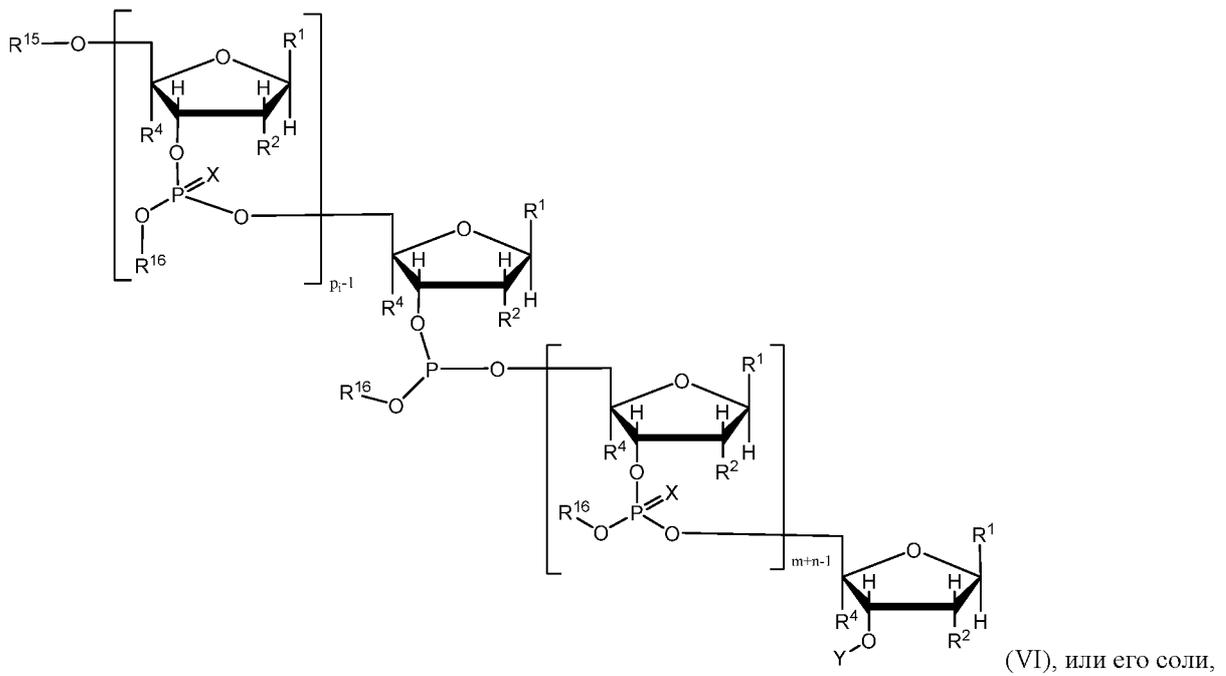


7. Способ по п. 6, дополнительно включающий:

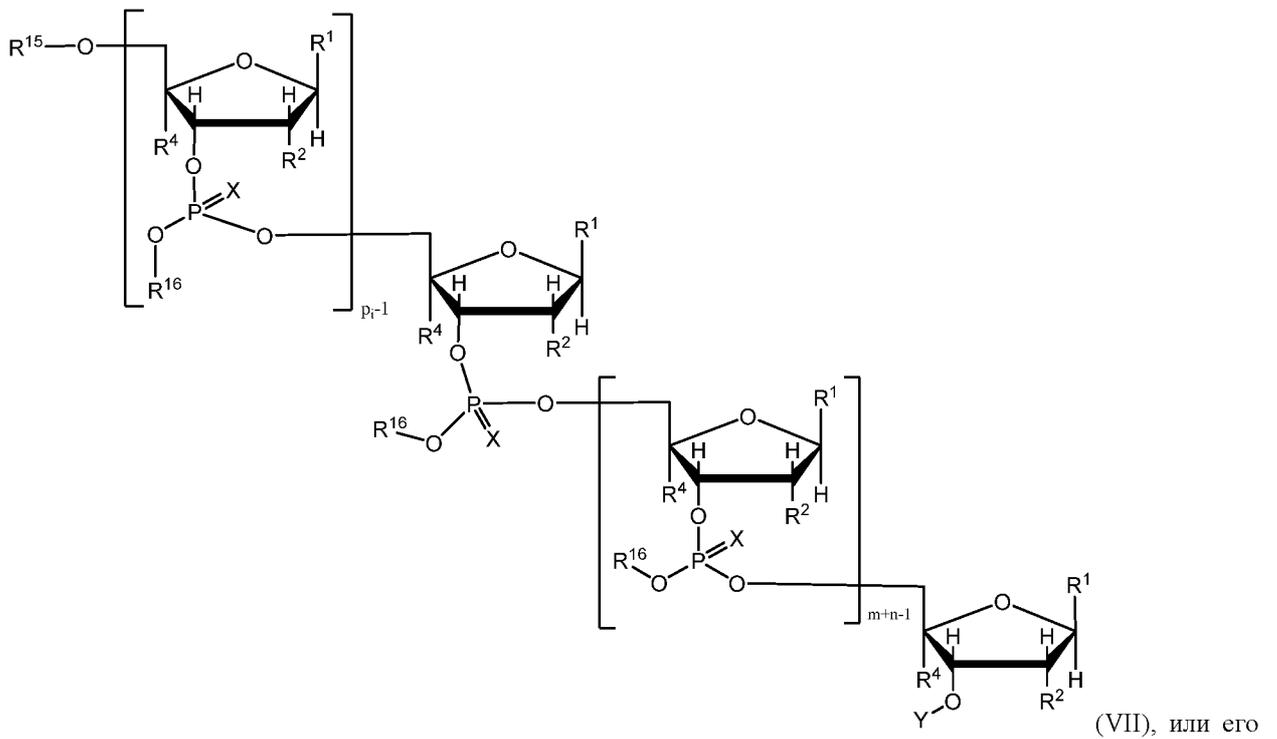
d) связывание олигонуклеотида формулы (V) или его соли с олигонуклеотидным фрагментом формулы (II'):



с образованием олигонуклеотида формулы (VI):

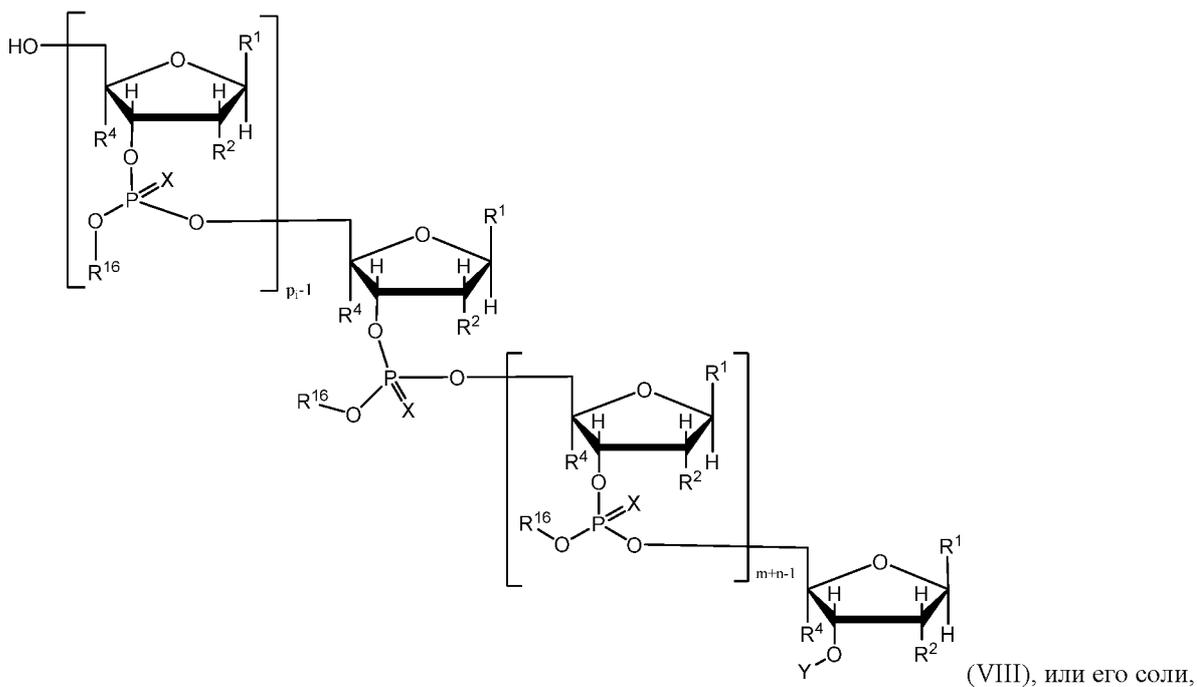


е) сульфуризацию или окисление олигонуклеотида формулы (VI) с образованием олигонуклеотида формулы (VII):

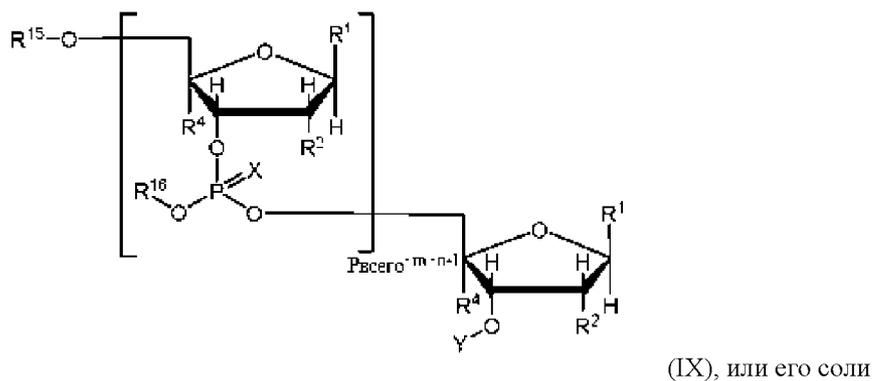


соли,

ф) снятие защиты с олигонуклеотида формулы (VII) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (VIII):



г) повторение стадий d), e) и f) в течение  $g-1$  раз с последующим повторением стадий d) и e) с образованием олигонуклеотида формулы (IX):



где:

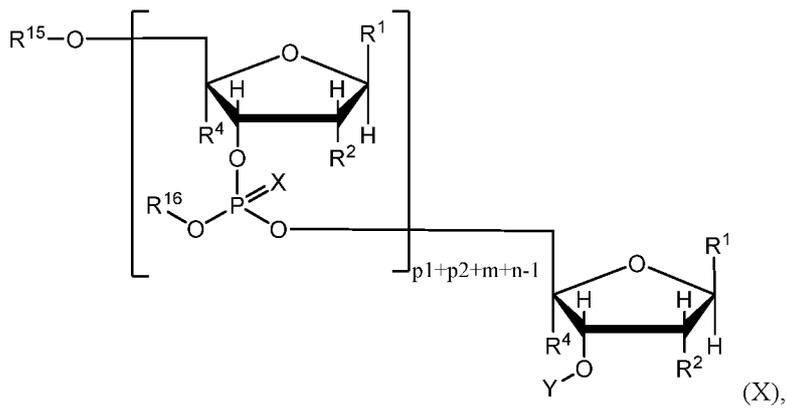
$g$  равно целому числу от 1 до 50; необязательно  $g$  равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6;

$p_i$  для каждого случая независимо равно целому числу от 2 до 20; необязательно где  $p_i$  для каждого случая независимо равно 3, 4, 5 или 6,

$i$  равно целому числу от 1 до  $g$ ; и

$$p_{\text{всего}} = \sum_{i=1}^g p_i ;$$

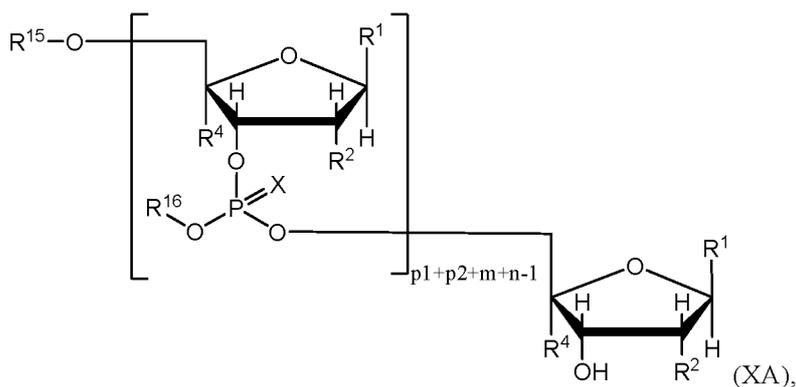
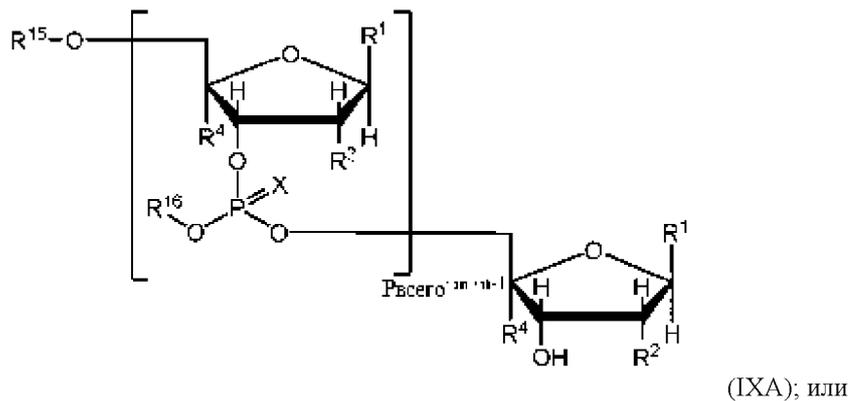
необязательно где  $g$  равно 2 и олигонуклеотид формулы (IX) представлен формулой (X):



где  $p_1$  и  $p_2$ , каждое независимо, равно целому числу от 2 до 20; необязательно где  $p_1$  и  $p_2$ , каждое независимо, равно 3, 4, 5 или 6;

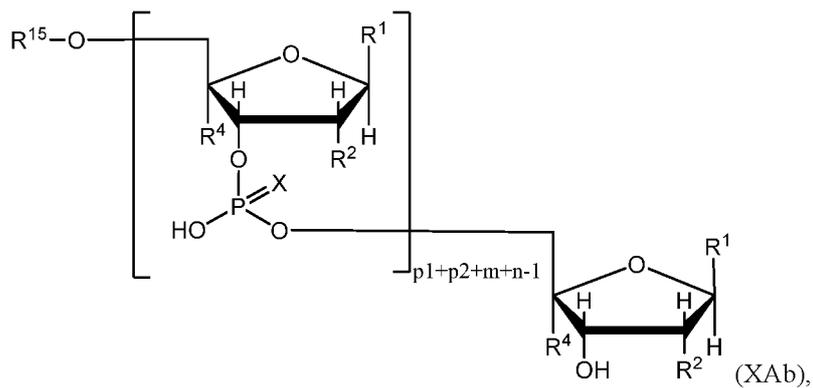
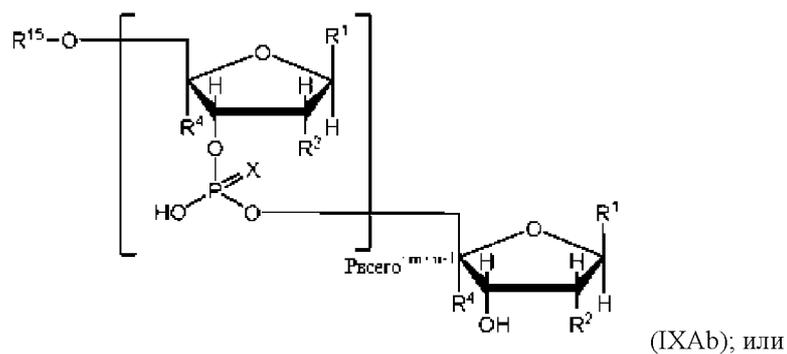
необязательно где способ дополнительно включает стадию:

h1-i) снятие защиты с олигонуклеотида (IX) или (X) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (IXA) или (XA):



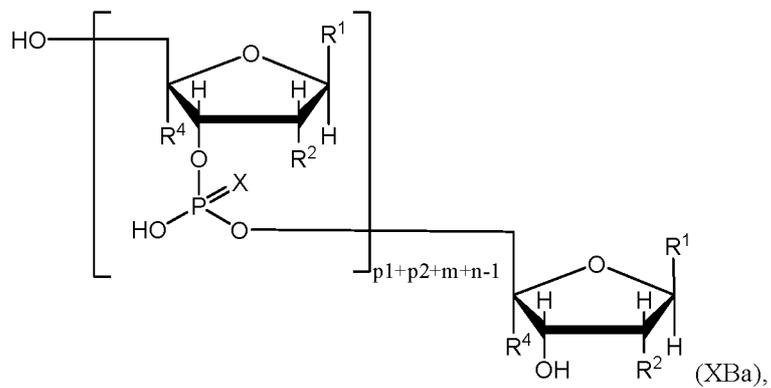
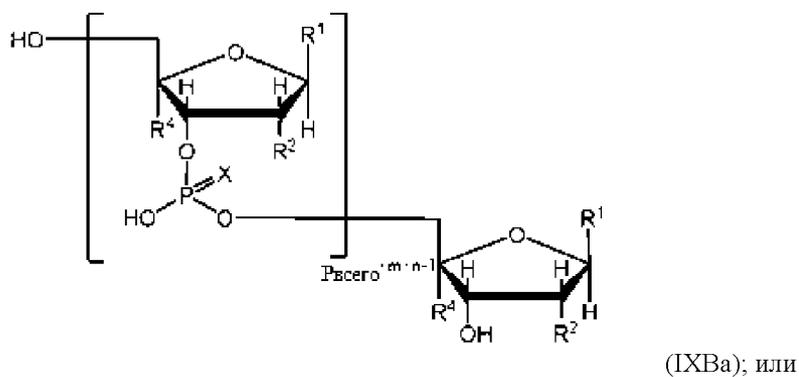
или их соли; или

h1-ii) когда  $R^{16}$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ , снятие защиты с олигонуклеотида (IX) или (X) или его соли образует олигонуклеотид формулы (IXAb) или (XAb):



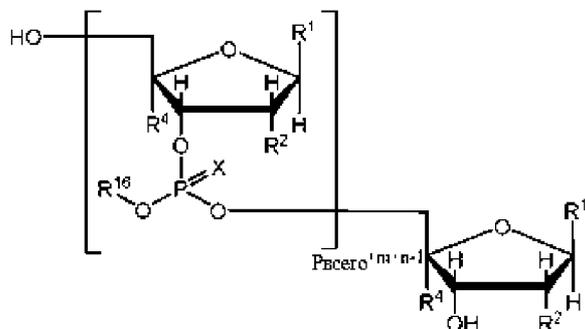
или их соли; необязательно где способ дополнительно включает стадию:

снятие защиты с олигонуклеотида (IXAb) или (XAb) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (IXBa) или (XBa):

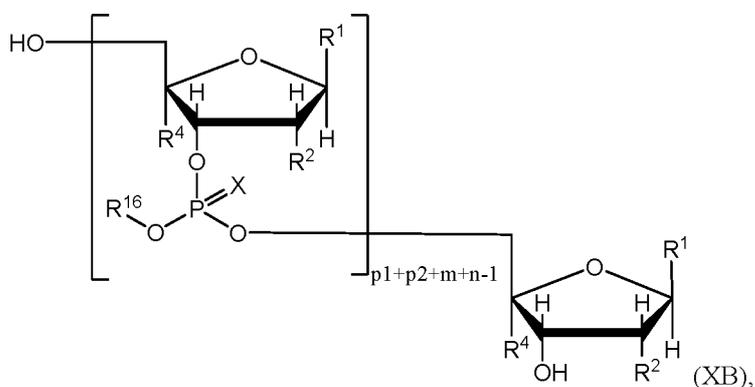


или его соли, необязательно олигонуклеотид (IXA) или (XA) реагирует с лимонной кислотой с образованием олигонуклеотида формулы (IXBa) или (XBa); или

h2) снятие защиты с олигонуклеотида (IXA) или (XA) с образованием олигонуклеотида формулы (IXB) или (XB):



(IXB); или

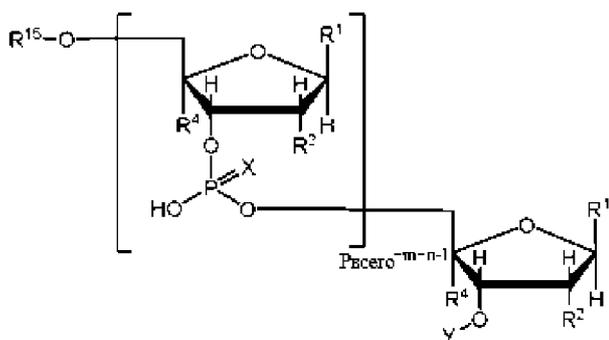


(XB),

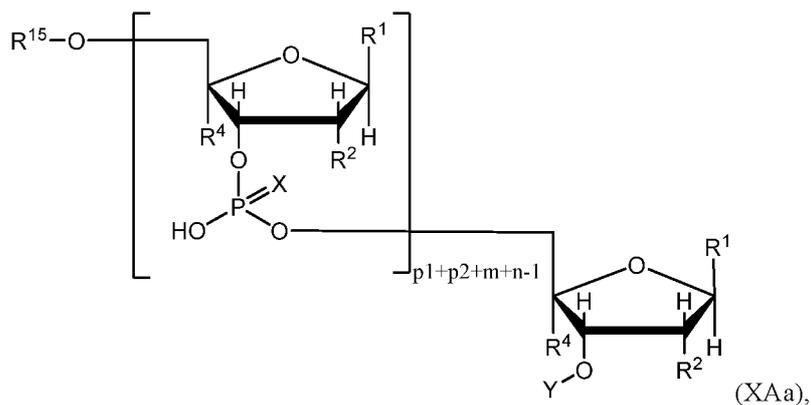
или его соли, необязательно олигонуклеотид (IXA) или (XA) реагирует с лимонной кислотой с образованием олигонуклеотида формулы (IXB) или (XB).

8. Способ по п. 7, в котором, когда  $R^{16}$  представляет собой  $-CH_2CH_2CN$ , способ дополнительно включает стадию:

h1) снятие защиты с олигонуклеотида (IX) или (X) с образованием олигонуклеотида формулы (IXAa) или (XAa):

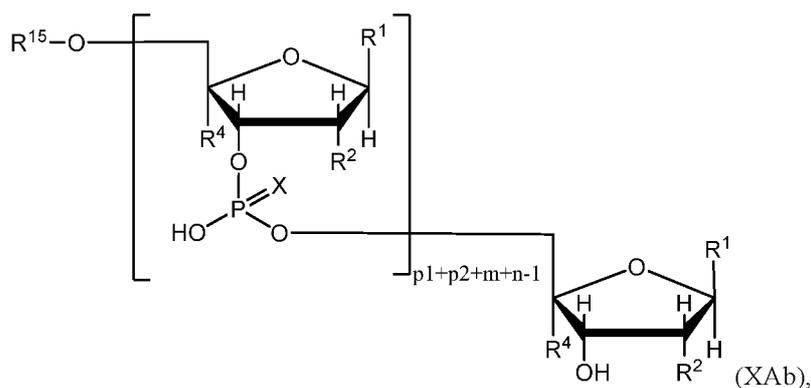
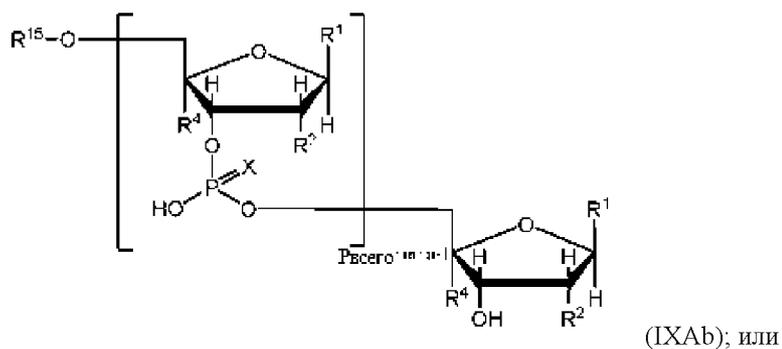


(IXAa); или



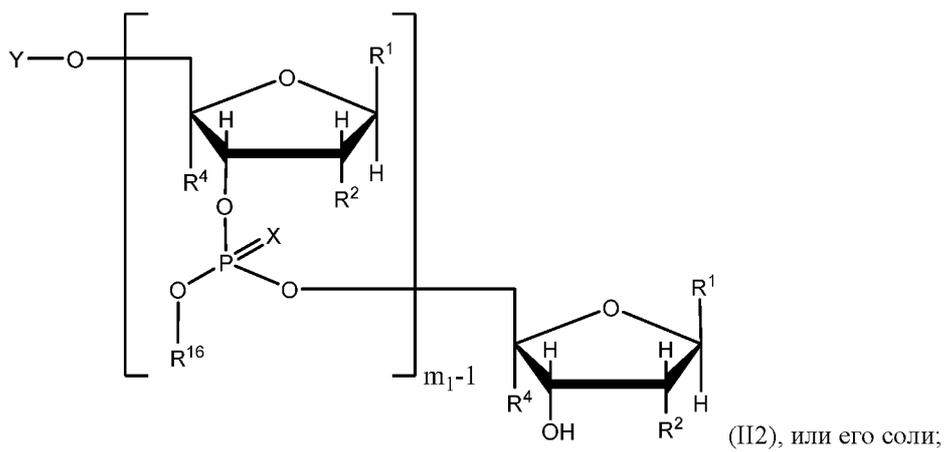
или их соли, необязательно где реакцию снятия защиты проводят путем взаимодействия олигонуклеотида (IX) или (X) или его соли с основанием; и/или где основание выбирают из 1,8-диазабцикло[5.4.0]ундец-7-ена, трет-бутиламина, втор-бутиламина, диизопропилэтиламина и триэтиламина.

9. Способ по п. 8, в котором способ дополнительно включает стадию снятия защиты с олигонуклеотида (IXAa) или (XAa) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (IXAb) или (XAb):

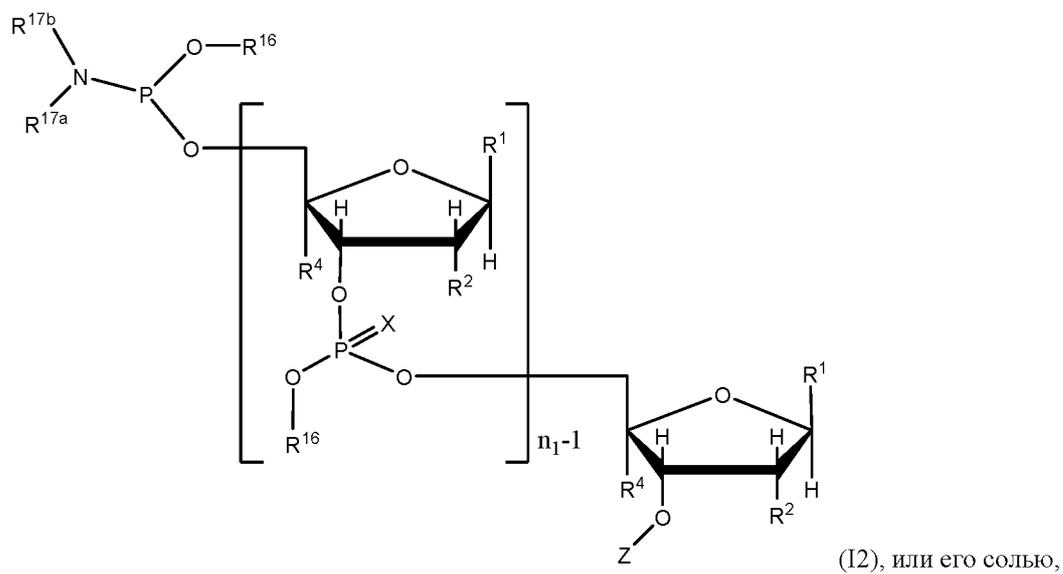


или их соли; необязательно где снятие защиты с олигонуклеотида (IXAa) или (XAa) или его соли проводят взаимодействием олигонуклеотида (IXAa) или (XAa) или его соли с  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

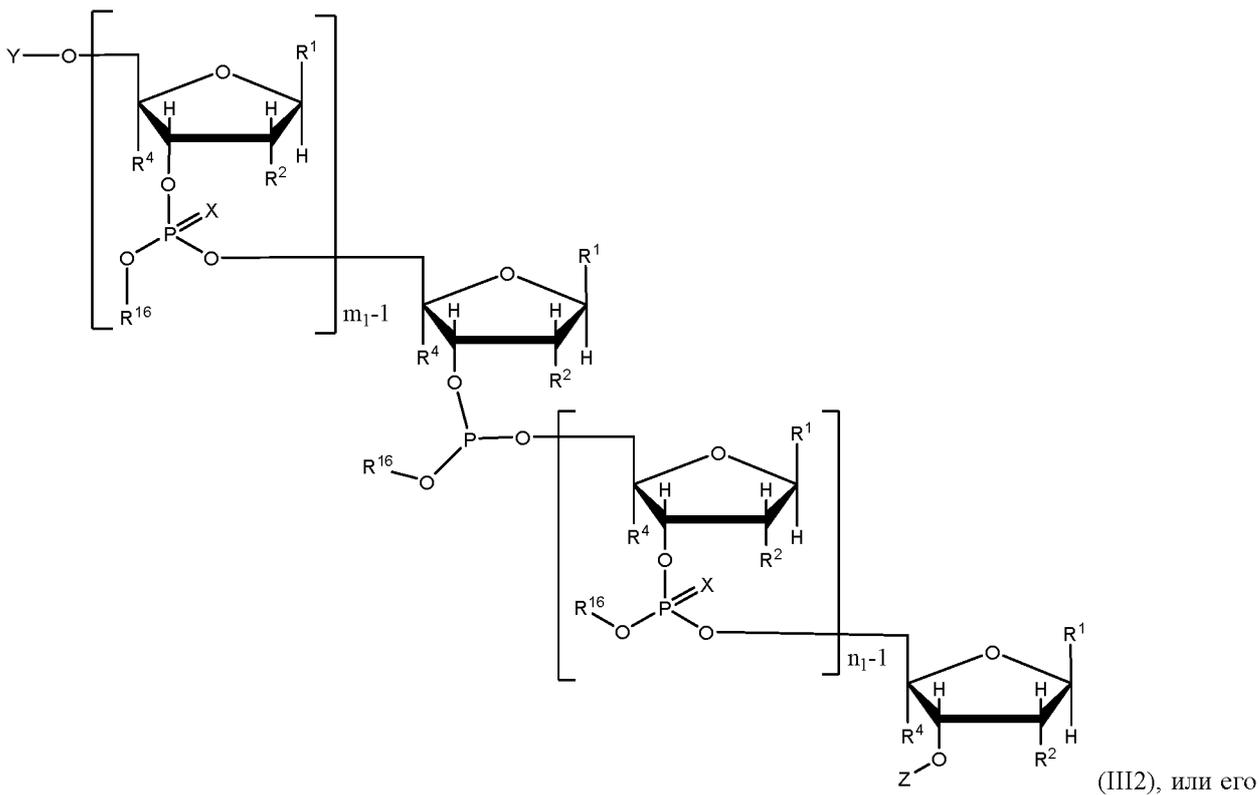
10. Конвергентный жидкофазный способ получения целевого олигонуклеотида, включающий стадии:  
а) связывание олигонуклеотидного фрагмента формулы (II2):



с олигонуклеотидным фрагментом формулы (I2):

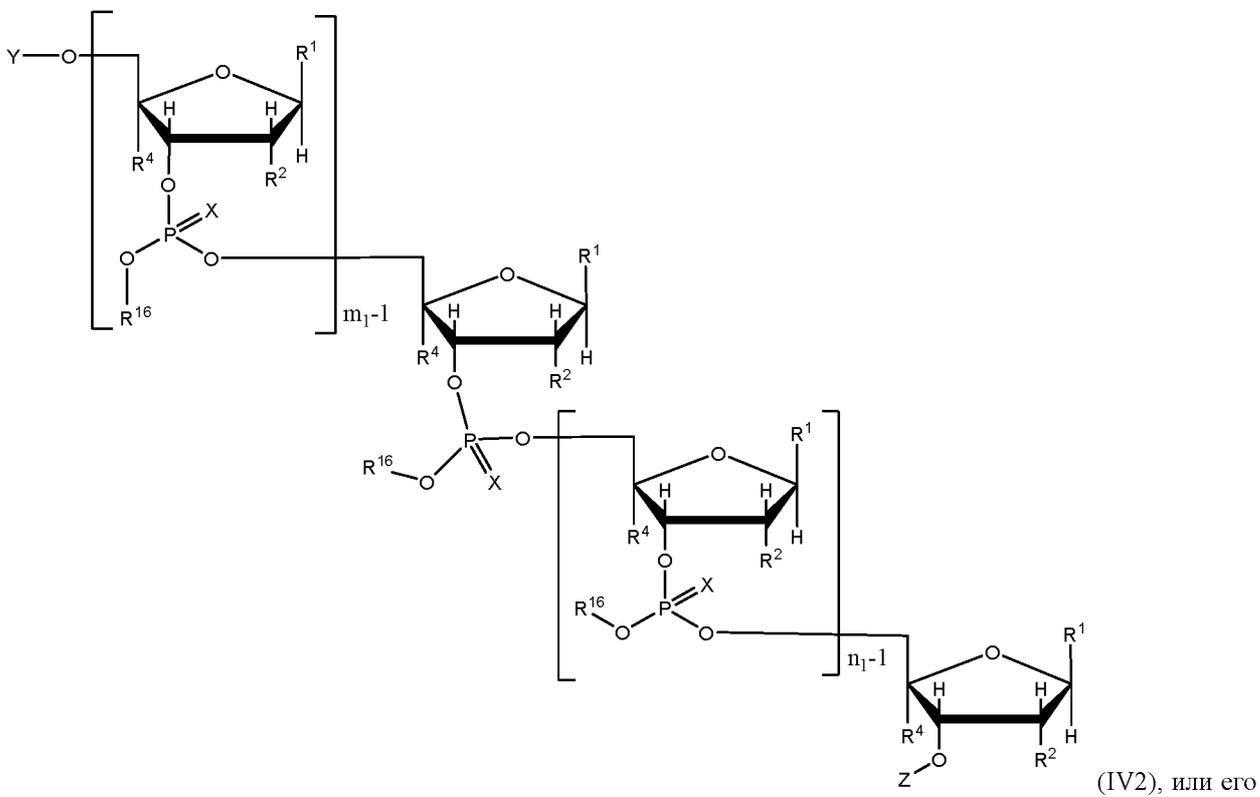


в растворе с образованием олигонуклеотида формулы (III2):



соли; и

б) сульфуризация или окисление олигонуклеотида формулы (III2) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (IV2):



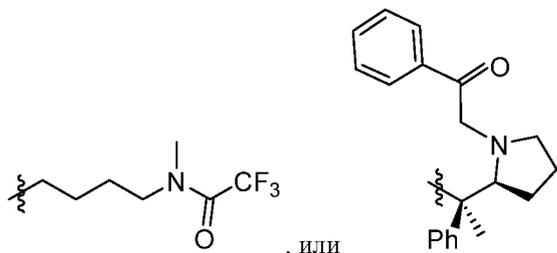
соли, где:

$R^1$  в каждом случае независимо представляет собой нуклеоснование, где  $NH_2$  нуклеоснования, если присутствует, защищено аминозащитной группой;

$R^2$ , в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и  $C_{1-6}$ алкокси, необязательно замещенного  $C_{1-6}$ алкокси;

$R^4$  в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой  $R^2$ ;

$R^{16}$  в каждом случае независимо представляет собой  $C_{1-6}$ алкильную группу,  $C_{2-6}$ алкенильную группу, фенильную или бензильную группу, каждая из которых необязательно замещена  $-CN$ ,  $-NO_2$  или галогеном; или



$R^{16}$  представляет собой

, или

;

$R^{17a}$  и  $R^{17b}$  независимо представляют собой  $C_{1-6}$ алкил;

$n_1$  равно целому числу от 2 до 20, необязательно где  $n_1$  равно 3, 4, 5 или 6;

$m_1$  равно целому числу от 2 до 200, необязательно где  $m_1$  равно 3, 4, 5 или 6;

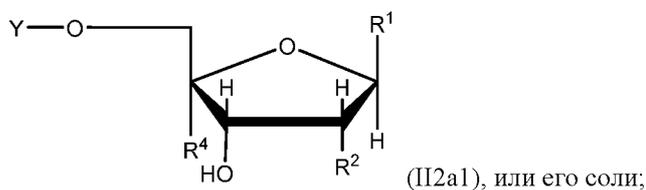
X, в каждом случае независимо представляет собой O или S;

Y представляет собой гидрофобную защитную группу гидроксила, содержащую алкильную цепь.

Z представляет собой силильную защитную группу гидроксила.

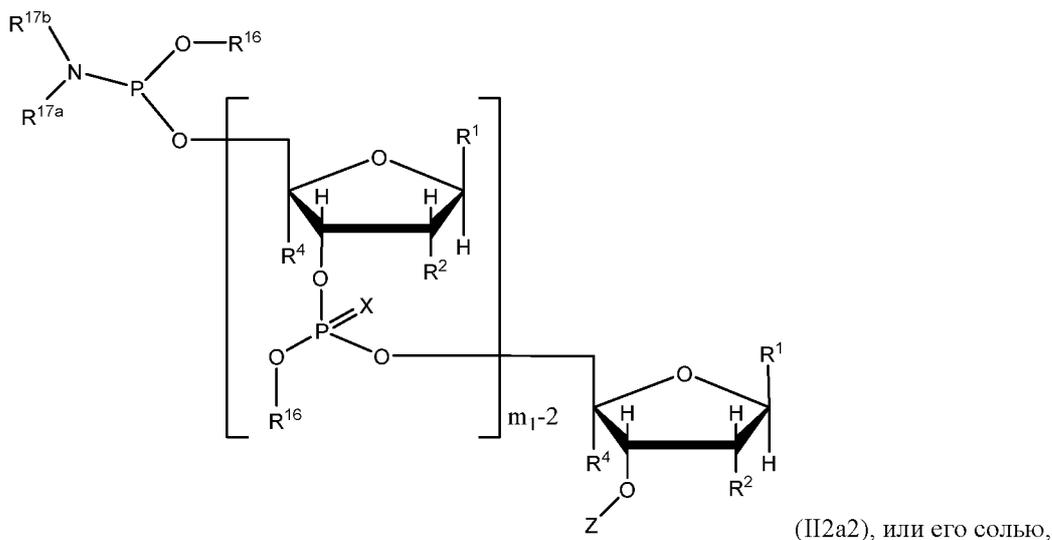
11. Способ по п. 10, в котором фрагмент (II2) получают путем:

ia) сочетания нуклеотида формулы (II2a1):



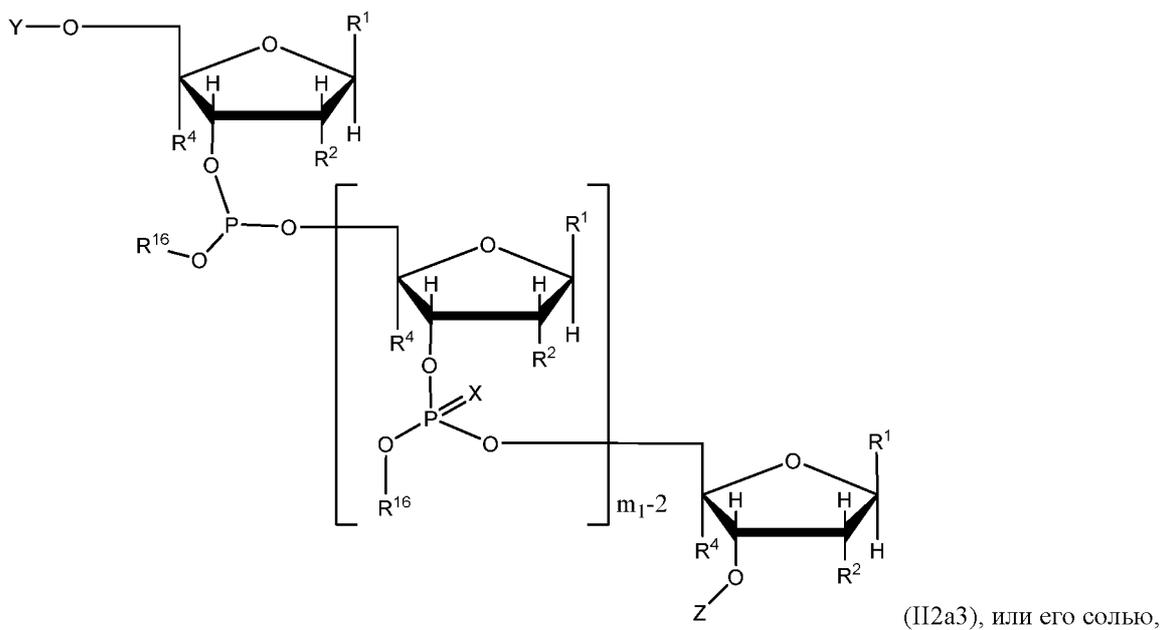
(II2a1), или его соли;

с олигонуклеотидным фрагментом формулы (II2a2):

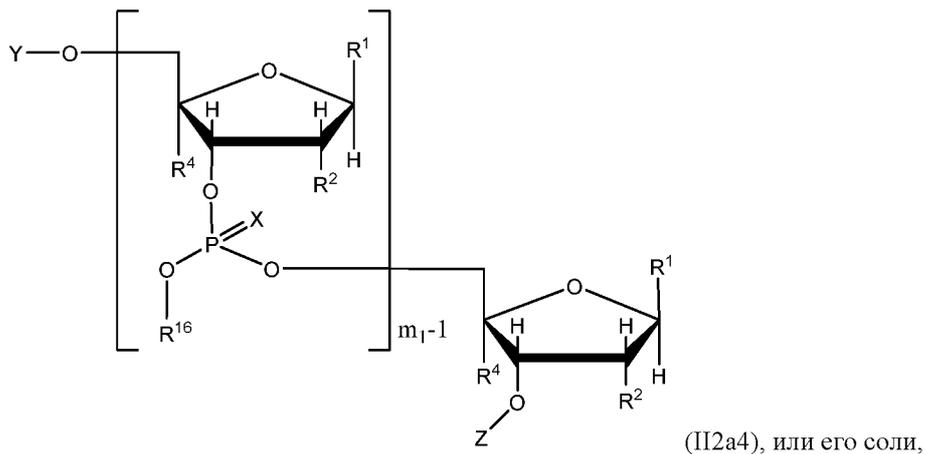


(II2a2), или его соль,

в растворе с образованием олигонуклеотида формулы (II2a3) или его соли,

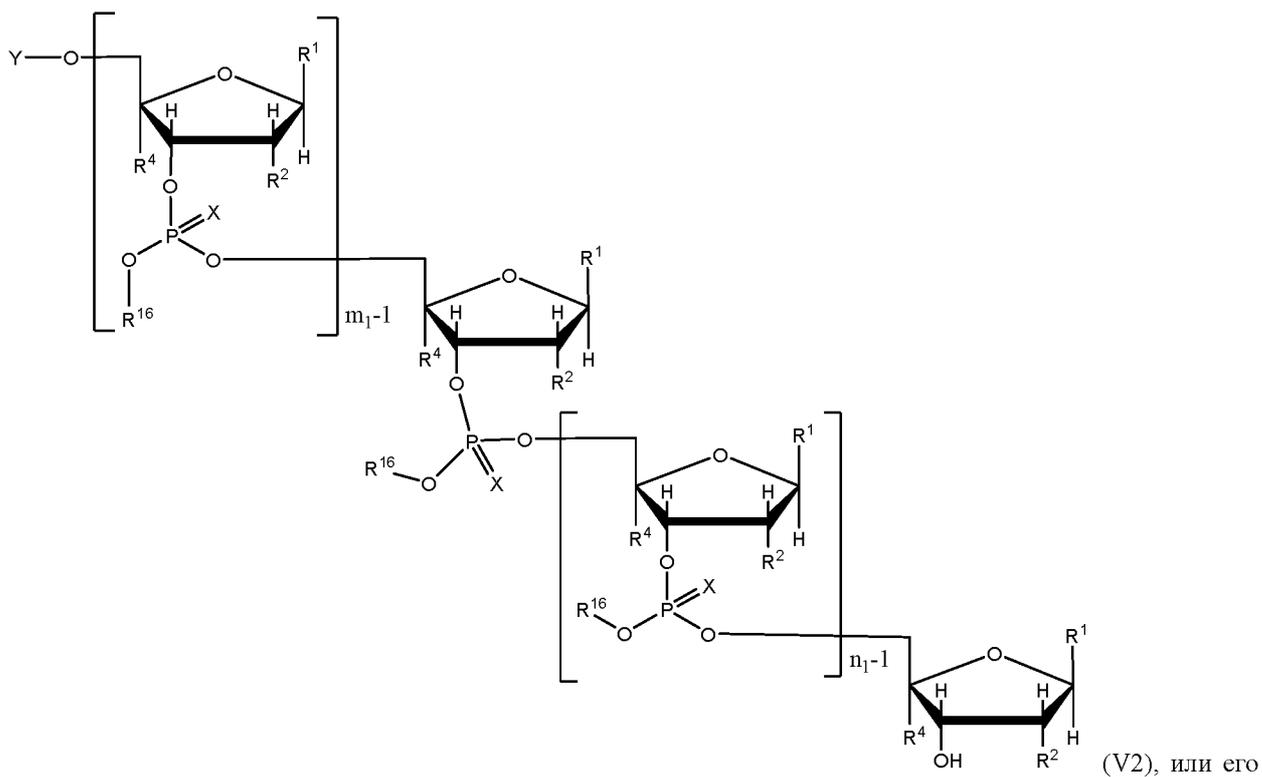


ii) а) сульфурризацией или окислением олигонуклеотида формулы (II2a3) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (II2a4):



ii) а) снятием защиты с олигонуклеотида формулы (II2a4) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (II2).

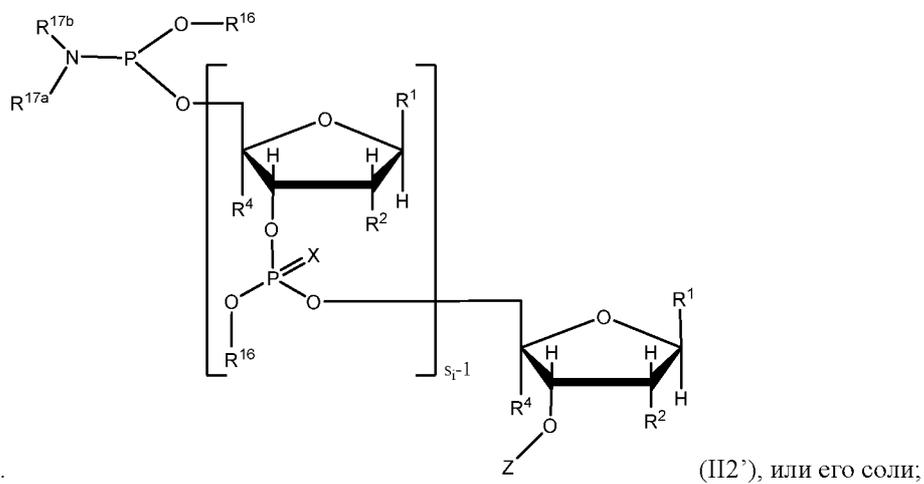
12. Способ по п. 10 или 11, дополнительно включающий стадию с) снятия защиты с олигонуклеотида формулы (IV2) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (V2):



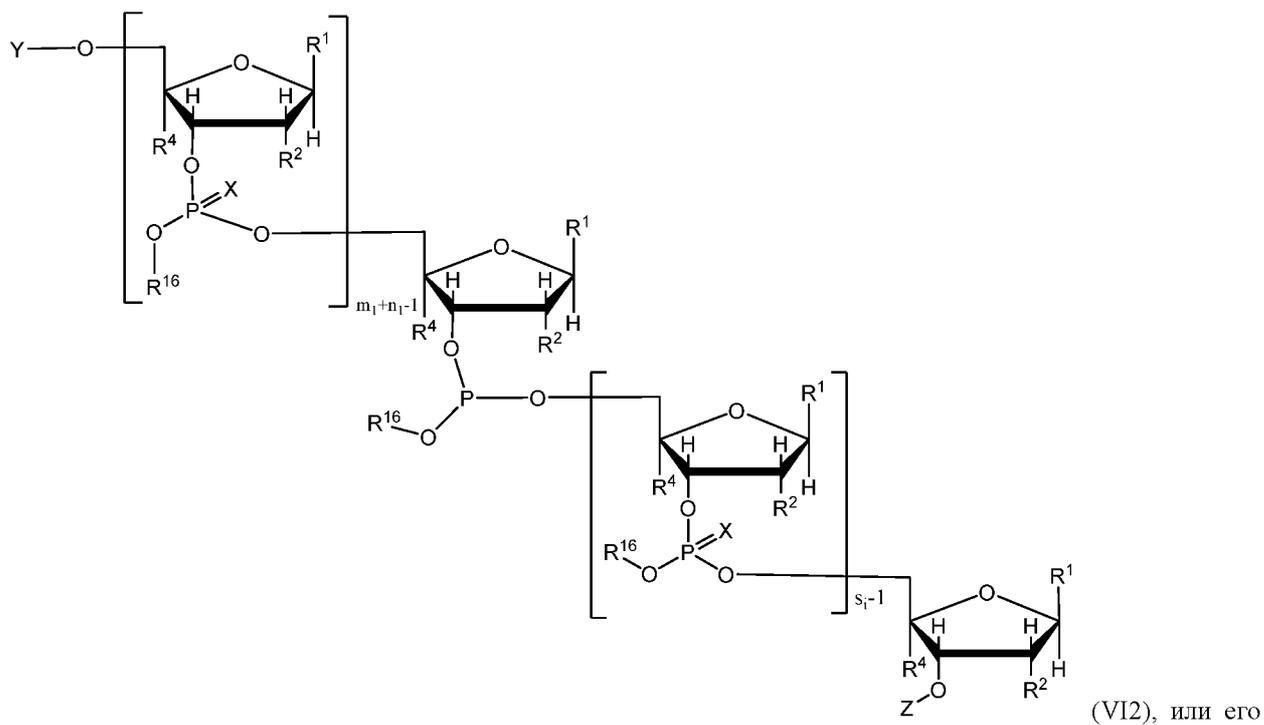
соли;

13. Способ по п. 12, дополнительно включающий:

d) сочетание олигонуклеотида формулы (V2) или его соли с олигонуклеотидным фрагментом формулы (II2')

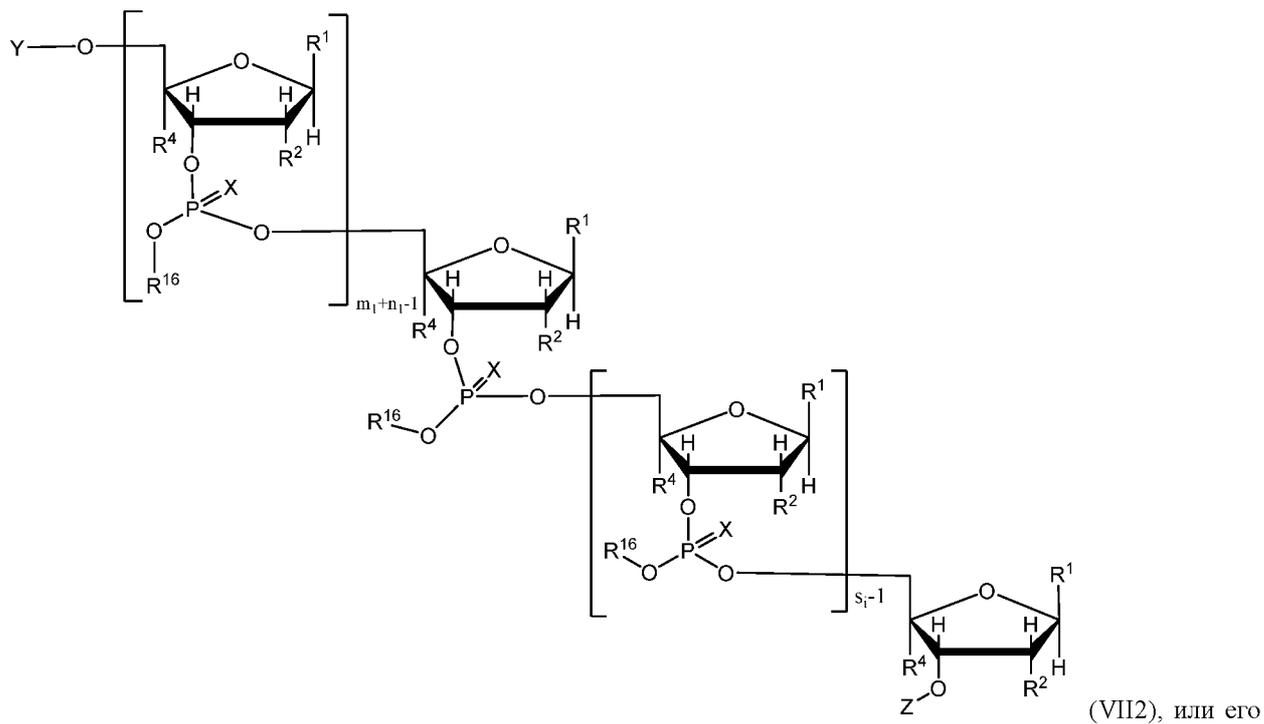


с образованием олигонуклеотида формулы (VI2):



соли,

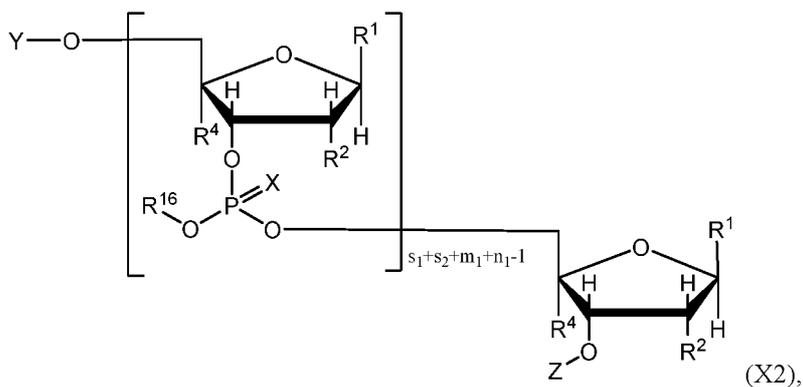
е) сульфуризацию или окисление олигонуклеотида формулы (VI2) с образованием олигонуклеотида формулы (VII2):



соли,

f) снятие защиты с олигонуклеотида формулы (VII2) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (VIII2):

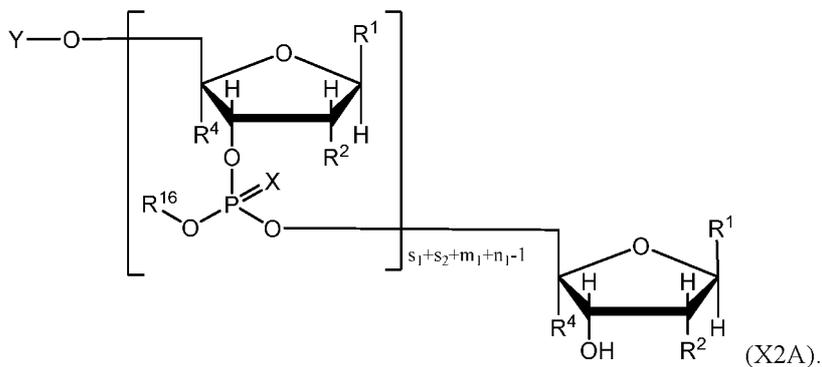
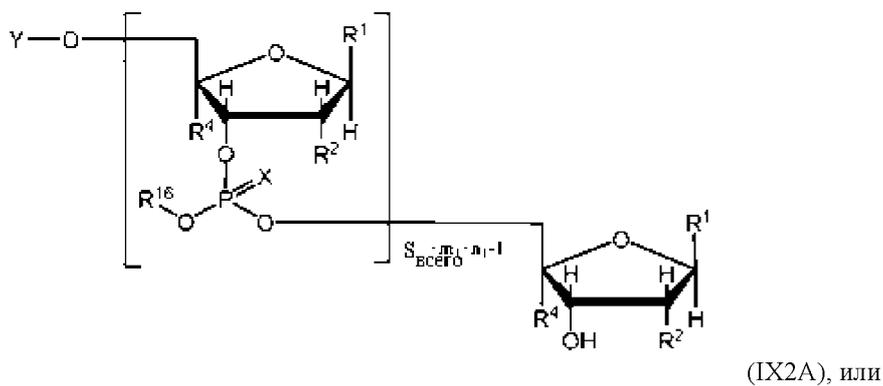




где  $s_1$  и  $s_2$ , каждое независимо, равно целому числу от 2 до 20; необязательно где  $s_1$  и  $s_2$ , каждое независимо, равно 3, 4, 5 или 6;

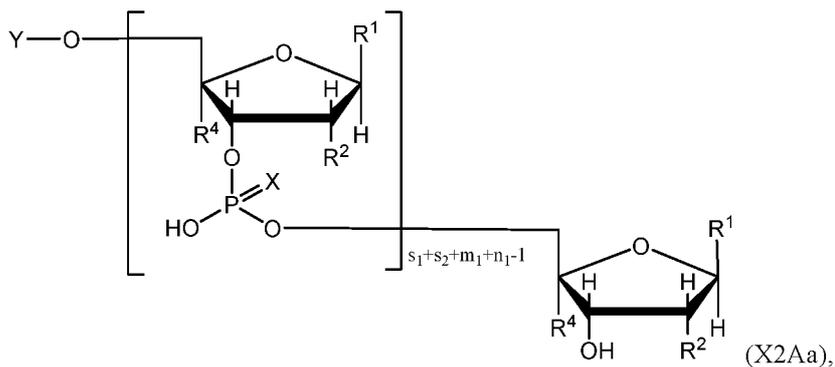
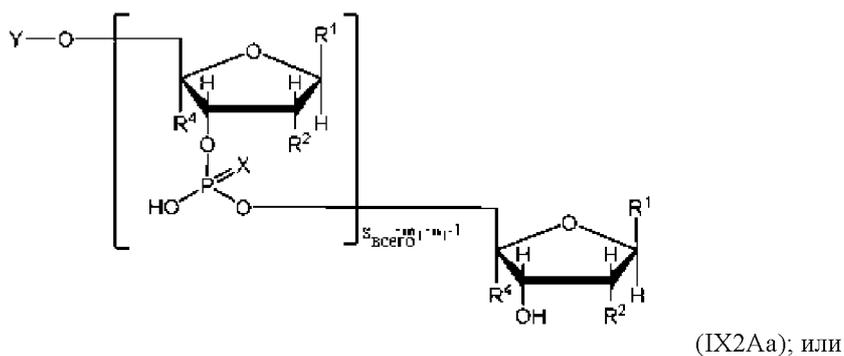
необязательно где хроматографию не используют для очистки продукта реакции на любой из стадий а), б), с), д), е), ф) и г); или продукт реакции любой из стадий а), б), с), д), е), ф) и г) очищают экстракцией или селективным осаждением;

необязательно где способ дополнительно включает снятие защиты с олигонуклеотида формулы (IX2) или (X2) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (IX2A) или (X2A) или его соли:



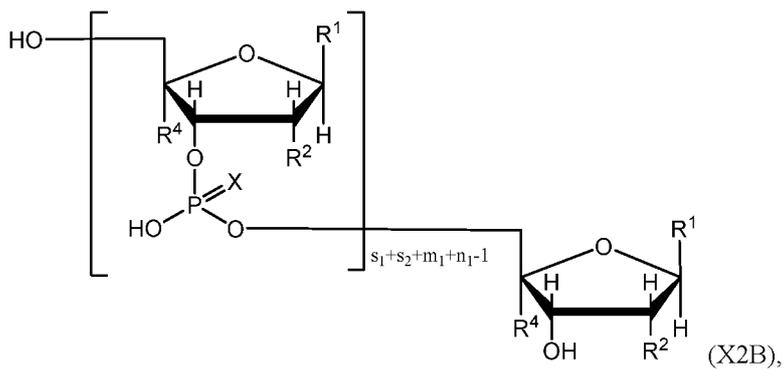
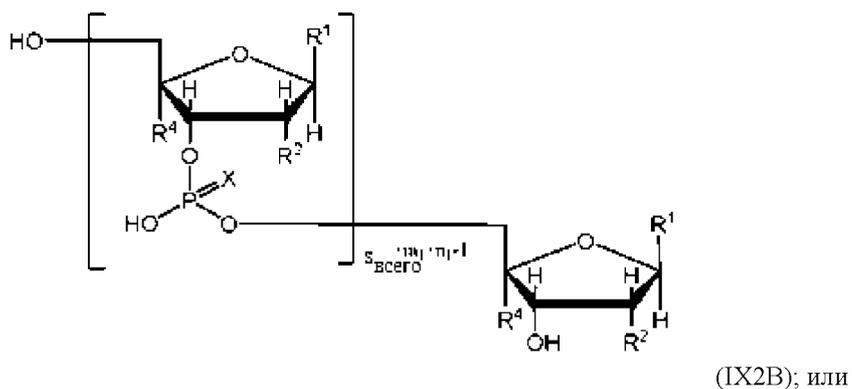
14. Способ по п.13, в котором, когда  $R^{16}$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ , способ дополнительно включает стадию:

h1) снятие защиты с олигонуклеотида (IX2A) или (X2A) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (IX2Aa) или (X2Aa):



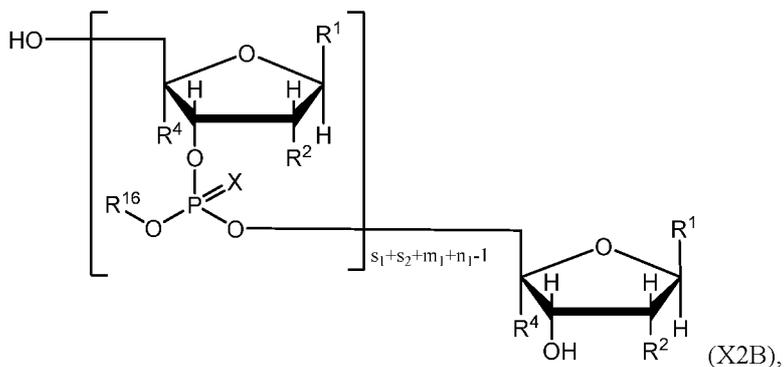
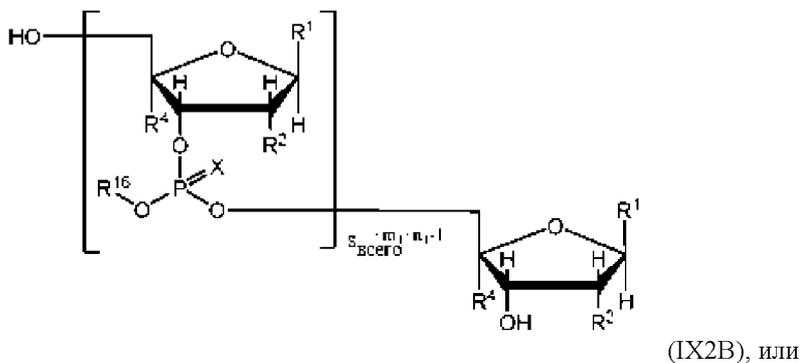
или их соли, необязательно где реакцию снятия защиты проводят путем взаимодействия олигонуклеотида (IX2A) или (X2A) или его соли с основанием, и/или основание выбирают из 1,8-диазобисцикло [5.4.0]ундец-7-ена, трет-бутиламина, втор-бутиламина, диизопропилэтиламина и триэтиламина.

15. Способ по п.14, в котором способ дополнительно включает стадию снятия защиты с олигонуклеотида (IX2Aa) или (X2Aa) или его соли с образованием олигонуклеотида формулы (IX2B) или (X2B):

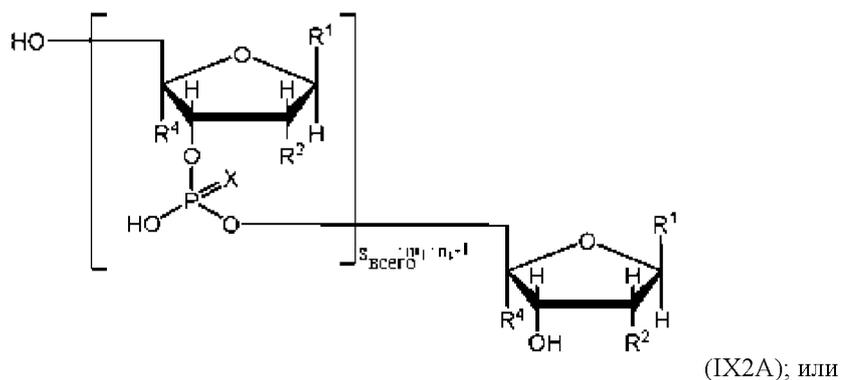


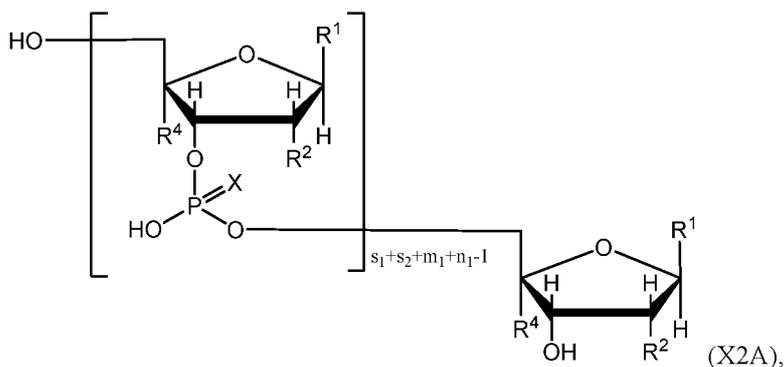
или их соли, необязательно где реакцию снятия защиты проводят путем взаимодействия олигонуклеотида (IX2Aa) или (X2Aa) или его соли с  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

16. Способ по любому из пп. 13-15, в котором способ дополнительно включает стадию снятия защиты с олигонуклеотида (IX2) или (X2) или его соли с  $\text{NH}_4\text{OH}$  с образованием олигонуклеотида формулы (IX2B) или (X2B):



или его соли, где, когда  $\text{R}^{16}$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ , снятие защиты с олигонуклеотида (IX2) или (X2) или его соли образует олигонуклеотид формулы (IX2A) или (X2A):





или их соли.

17. Способ по любому из пп. 1-16, в котором i) все группы P=X в соединении или олигонуклеотиде представляют собой P=S; ii) все группы P=X в соединении или олигонуклеотиде представляют собой P=O; iii) более 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% групп P=X в соединении или олигонуклеотиде являются P=S; или iv) 10-90%, 20-80%, 30-70% или 40-60% групп P=X в соединении или олигонуклеотиде представляют собой P=S.

18. Способ по любому из пп. 1-17, в котором i) нуклеос основание выбрано из группы, состоящей из цитозина, гуанина, аденина, тимина, урацила, гипоксантина, ксантина, 7-метилгуанина, 5,6-дигидроурацила, 5-метилцитозина и 5-гидроксиметилцитозина, где NH<sub>2</sub> группа нуклеос основания, если она присутствует, защищена PhCO-, CH<sub>3</sub>CO-, *i*PrCO-, Me<sub>2</sub>N-CH= или Me<sub>2</sub>N-CMe=; или ii) нуклеос основание выбрано из группы, состоящей из цитозина, гуанина, аденина, тимина, урацила и 5-метилцитозина, где NH<sub>2</sub> группа нуклеос основания, если она присутствует, защищена PhCO-, CH<sub>3</sub>CO-, *i*PrCO-, Me<sub>2</sub>N-CH= или Me<sub>2</sub>N-CMe=.

19. Способ по любому из пп. 1-18, в котором

i) каждый R<sup>2</sup> независимо выбран из группы, состоящей из H, фтора и C<sub>1-4</sub>алкокси, необязательно замещенного C<sub>1-4</sub>алкокси;

каждый R<sup>4</sup> независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой R<sup>2</sup>, где кольцо представляет собой 5- или 6-членное кольцо, необязательно замещенное 1-3 C<sub>1-4</sub>алкильными группами;

R<sup>16</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN; и

R<sup>17a</sup> и R<sup>17b</sup> независимо представляют собой C<sub>1-4</sub>алкил; или

ii) каждый R<sup>2</sup> независимо выбран из H или -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OMe;

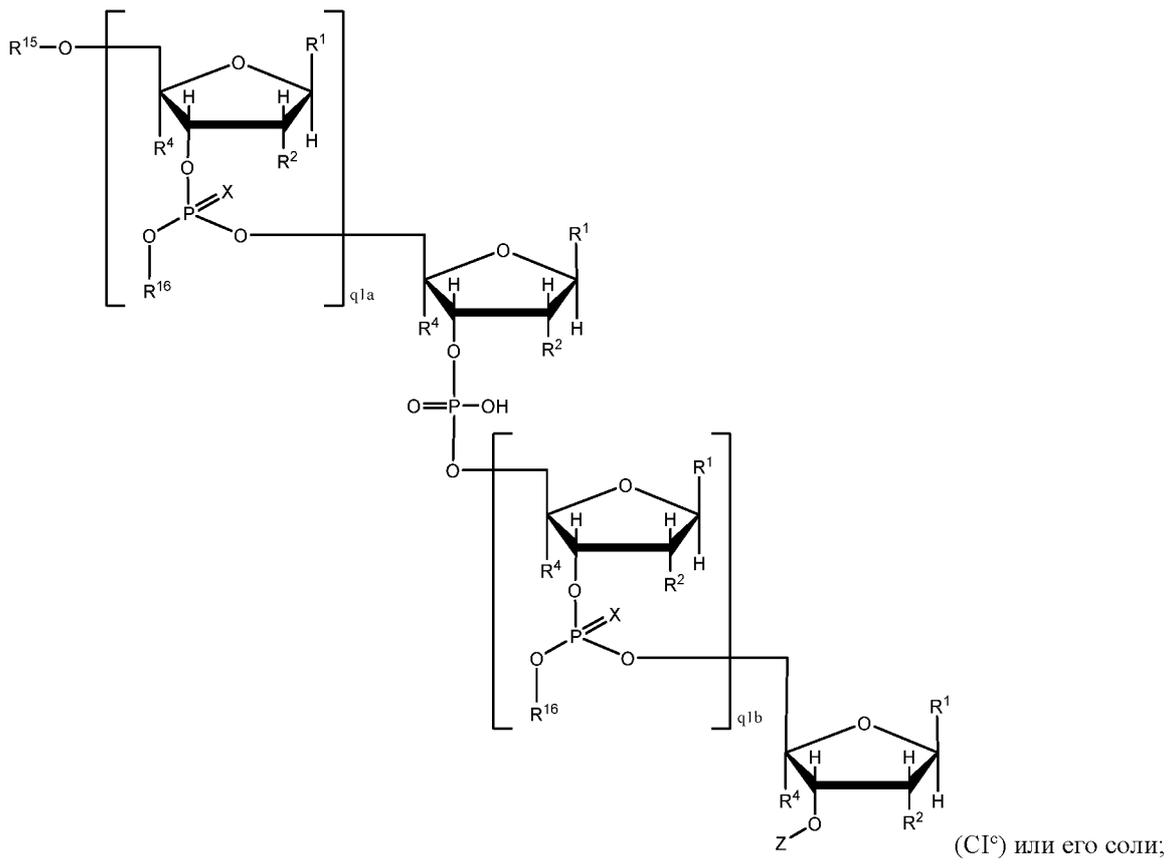
каждый R<sup>4</sup> представляет собой H;

R<sup>16</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN; и

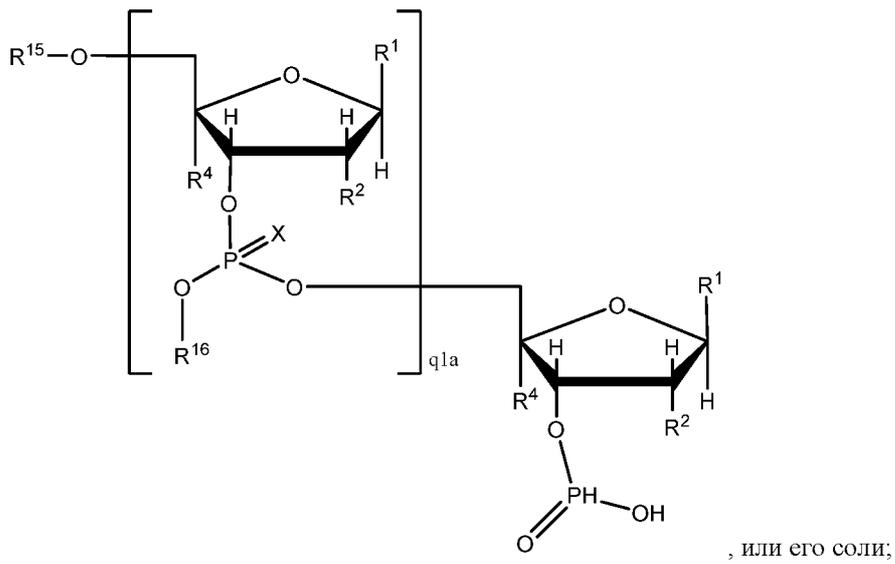
R<sup>17a</sup> и R<sup>17b</sup> оба представляют собой CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

20. Способ по любому из пп. 4-19, в котором целевой олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид, содержащий от 16 до 30 нуклеотидов.

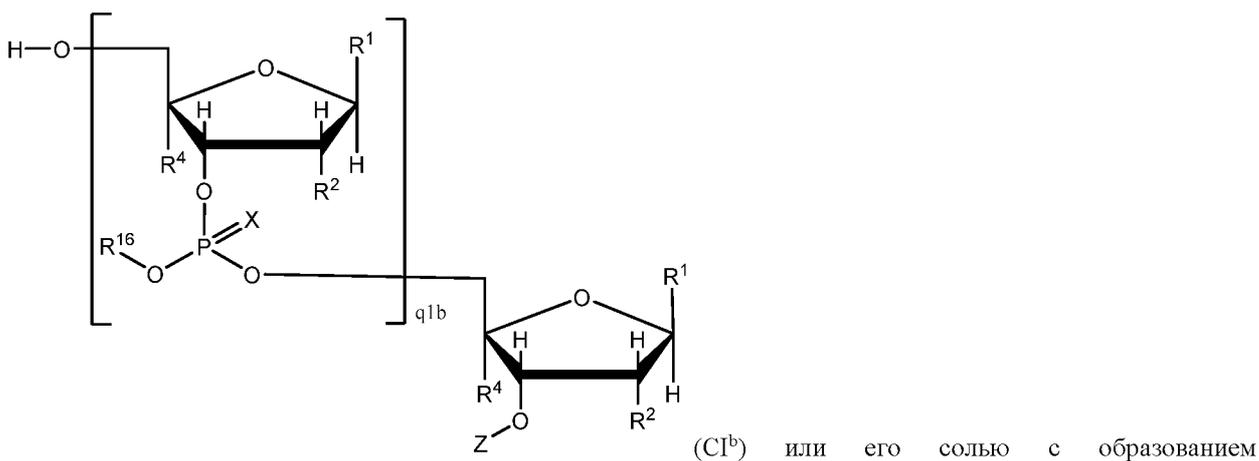
21. Жидкофазный способ получения олигонуклеотида формулы (CI<sup>c</sup>):



включающий связывание олигонуклеотидного фрагмента формулы (CI<sup>a</sup>):



с олигонуклеотидным фрагментом формулы (CI<sup>b</sup>):



олигонуклеотида формулы (C1<sup>c</sup>), где:

R<sup>1</sup> в каждом случае независимо представляет собой нуклеоснование, где NH<sub>2</sub> нуклеоснования, если присутствует, защищено аминозащитной группой;

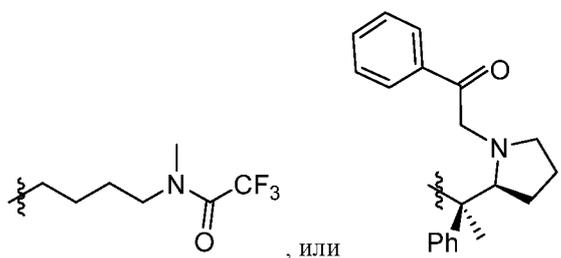
R<sup>2</sup>, в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и C<sub>1-6</sub>алкокси, необязательно замещенного C<sub>1-6</sub>алкокси;

R<sup>4</sup> в каждом случае независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой R<sup>2</sup>;

R<sup>15</sup> представляет собой защитную группу гидроксила;

R<sup>16</sup> в каждом случае независимо представляет собой C<sub>1-6</sub>алкильную группу, C<sub>2-6</sub>алкенильную группу, фенильную или бензильную группу, каждая из которых необязательно замещена -CN, -NO<sub>2</sub> или галогеном; или

R<sup>16</sup> представляет собой



q1a равно целому числу от 2 до 20;

q1b равно целому числу от 2 до 20;

X, в каждом случае независимо представляет собой O или S; и

Z представляет собой защитную группу гидроксила.

22. Способ по п.21, в котором i) все группы P=X в соединении или олигонуклеотиде представляют собой P=S; ii) все группы P=X в соединении или олигонуклеотиде представляют собой P=O; iii) более 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% групп P=X в соединении или олигонуклеотиде представляют собой P=S; или iv) 10-90%, 20-80%, 30-70% или 40-60% групп P=X в соединении или олигонуклеотиде представляют собой P=S.

23. Способ по п.21 или 22, в котором i) нуклеоснование выбрано из группы, состоящей из цитозина, гуанина, аденина, тимина, урацила, гипоксантина, ксантина, 7-метилгуанина, 5,6-дигидроурацила, 5-метилцитозина и 5-гидроксиметилцитозина, где NH<sub>2</sub> группа нуклеоснования, если она присутствует, защищена PhCO-, CH<sub>3</sub>CO-, *i*PrCO-, Me<sub>2</sub>N-CH= или Me<sub>2</sub>N-CMe=; ii) нуклеоснование выбрано из группы,

состоящей из цитозина, гуанина, аденина, тимина, урацила и 5-метилцитозина, где  $\text{NH}_2$  группа нуклеоснования, если она присутствует, защищена  $\text{PhCO-}$ ,  $\text{CH}_3\text{CO-}$ ,  $i\text{PrCO-}$ ,  $\text{Me}_2\text{N-CH=}$  или  $\text{Me}_2\text{N-CMe=}$ .

24. Способ по любому из пп. 21-23, в котором

i) каждый  $\text{R}^2$  независимо выбран из группы, состоящей из H, фтора и  $\text{C}_{1-4}$ алкокси, необязательно замещенного  $\text{C}_{1-4}$ алкокси;

каждый  $\text{R}^4$  независимо представляет собой H или образует кольцо с алкоксигруппой  $\text{R}^2$ , где кольцо представляет собой 5- или 6-членное кольцо, необязательно замещенное 1-3  $\text{C}_{1-4}$ алкильными группами;

$\text{R}^{16}$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ; и

$\text{R}^{17a}$  и  $\text{R}^{17b}$  независимо представляют собой  $\text{C}_{1-4}$ алкил; или

ii) каждый  $\text{R}^2$  независимо выбран из H или  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OMe}$ ;

каждый  $\text{R}^4$  представляет собой H;

$\text{R}^{16}$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ; и

$\text{R}^{17a}$  и  $\text{R}^{17b}$  оба представляют собой  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ .

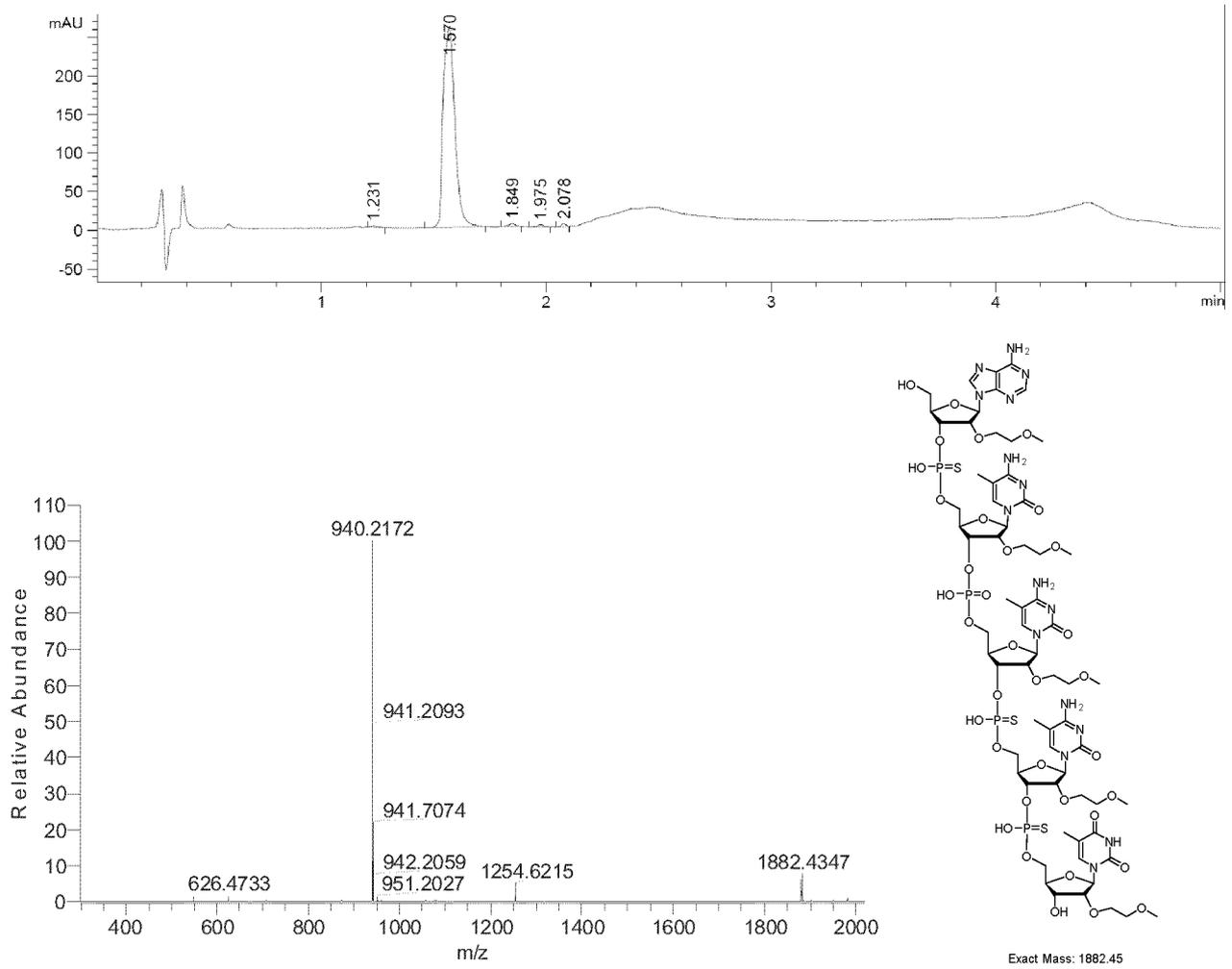


FIG. 1

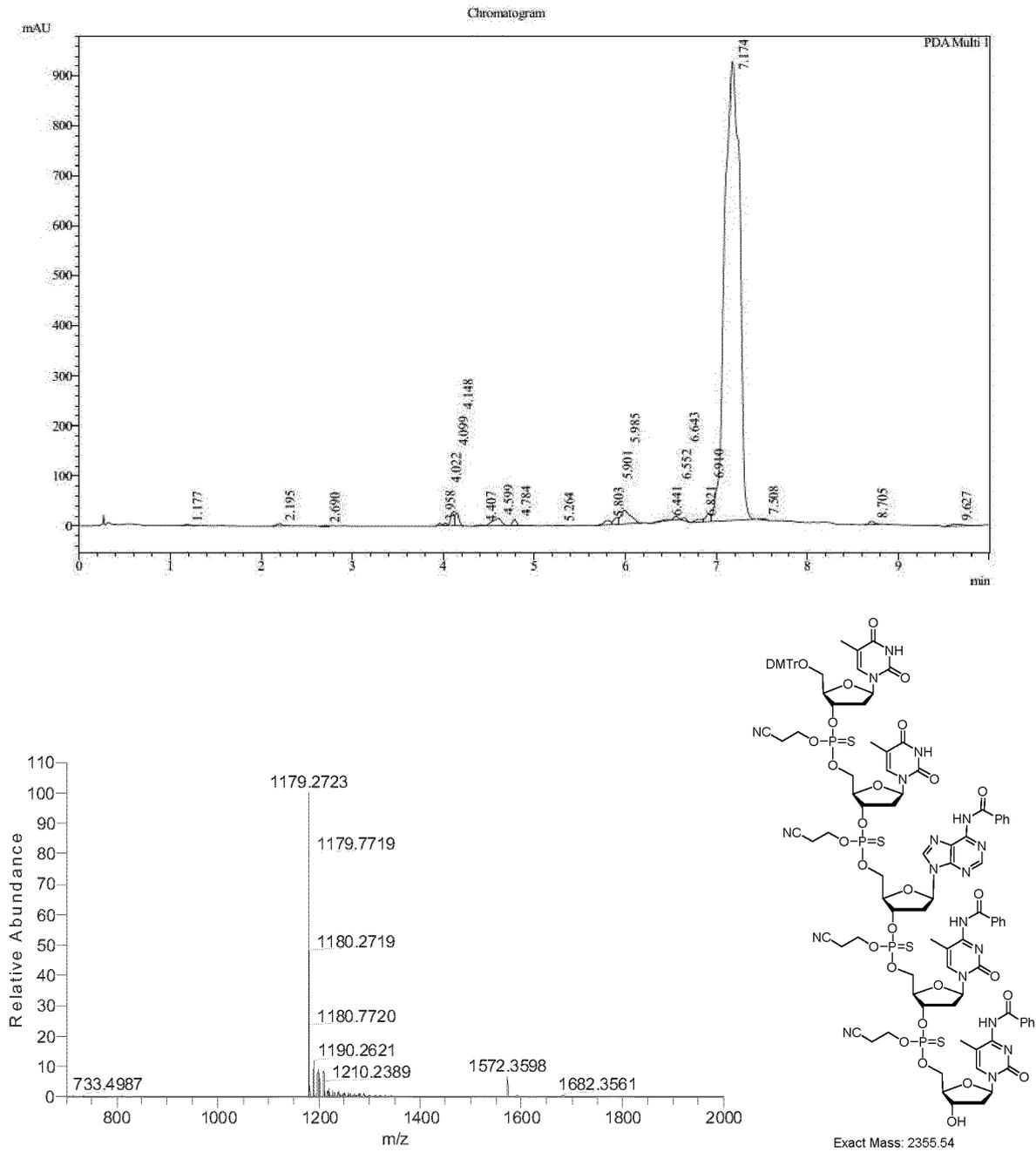


FIG. 2

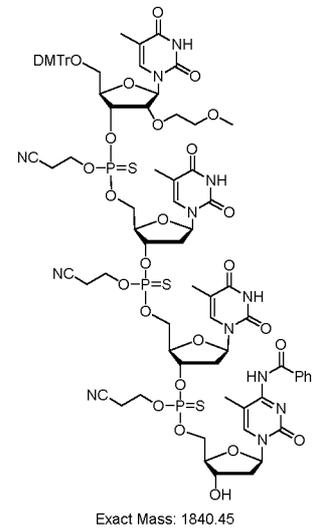
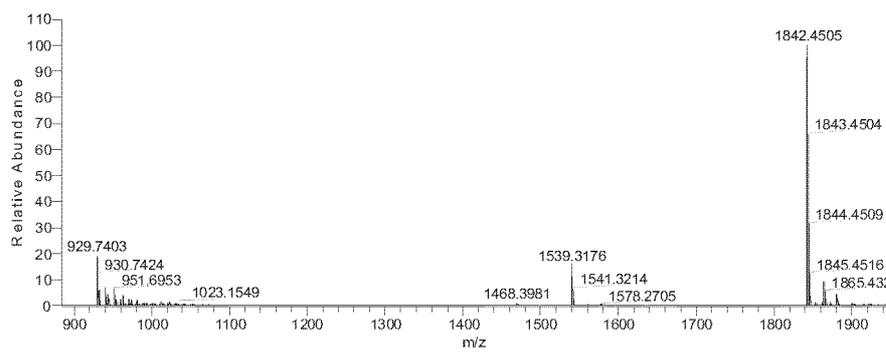
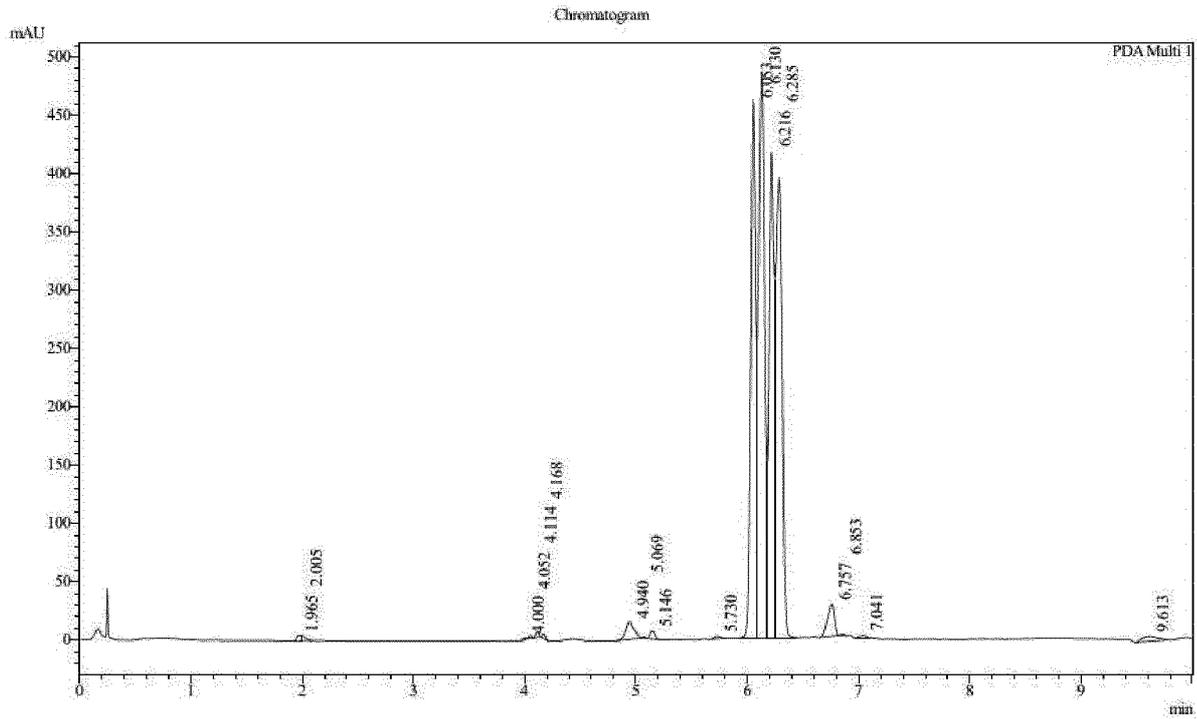


FIG. 3

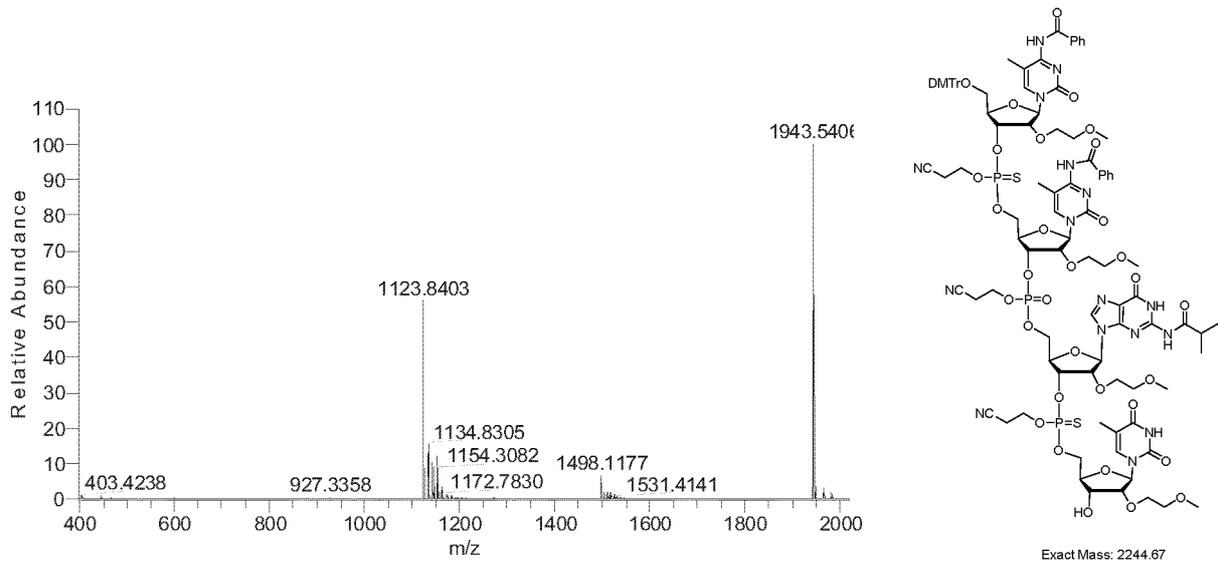
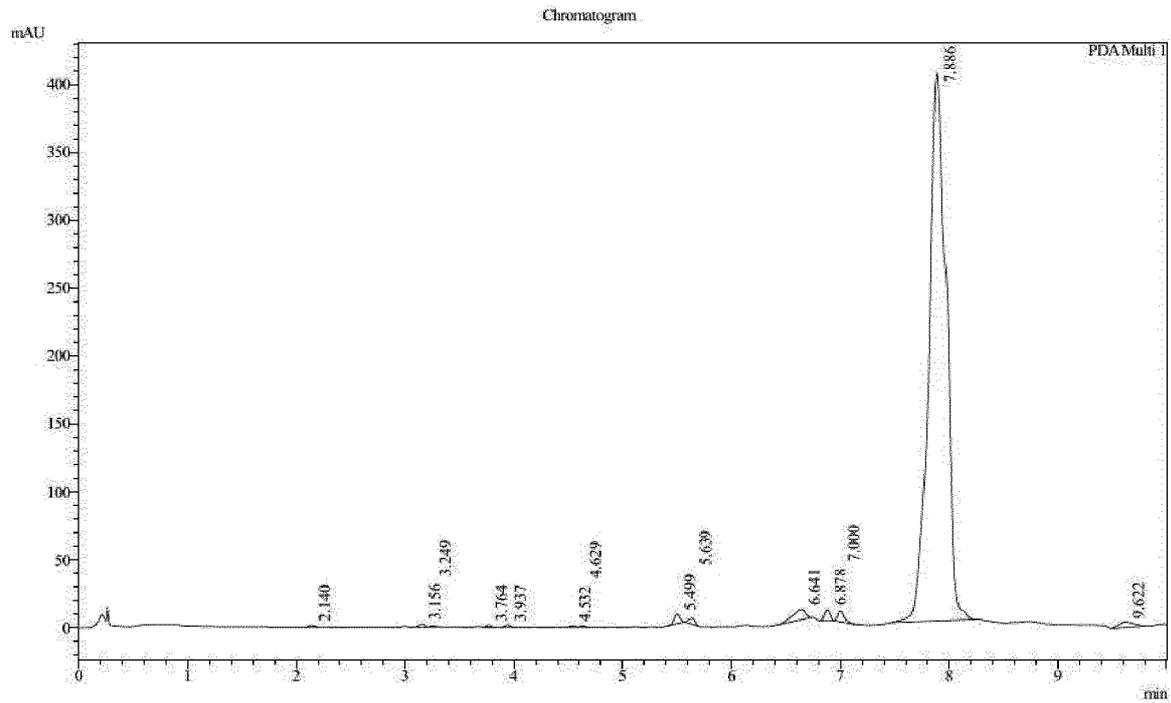


FIG. 4



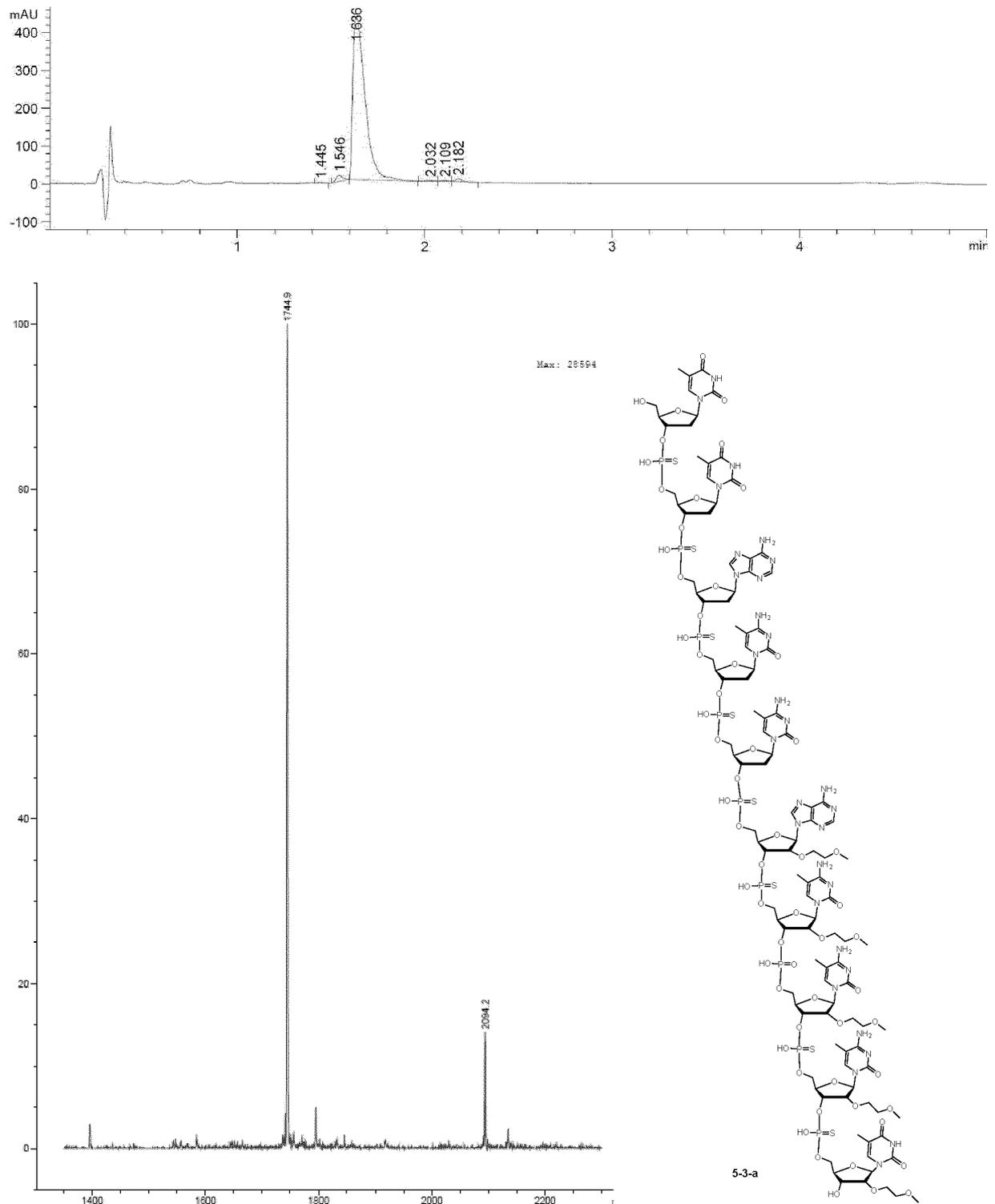


FIG. 6

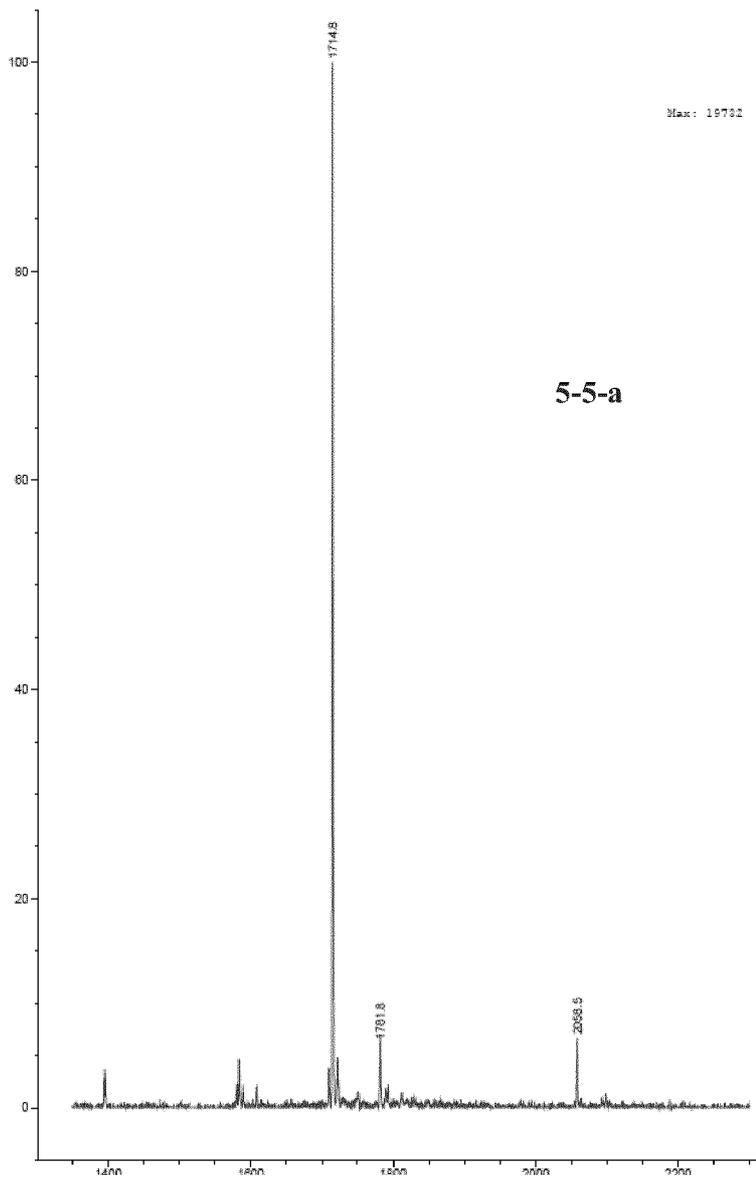
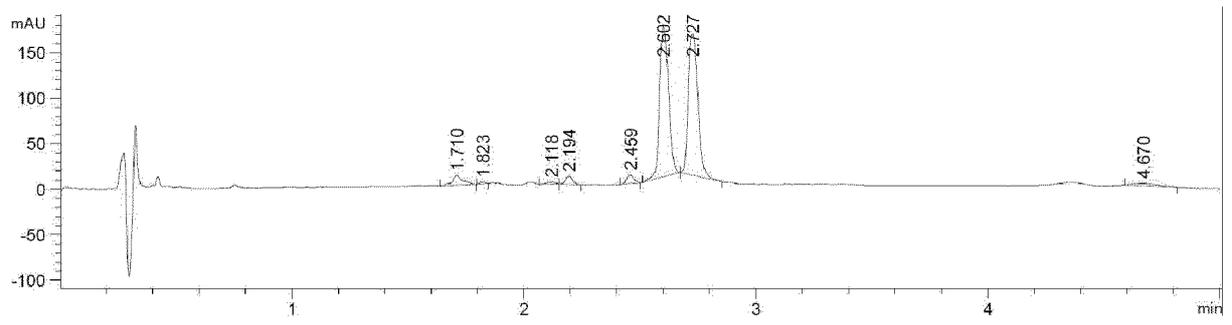


FIG. 7

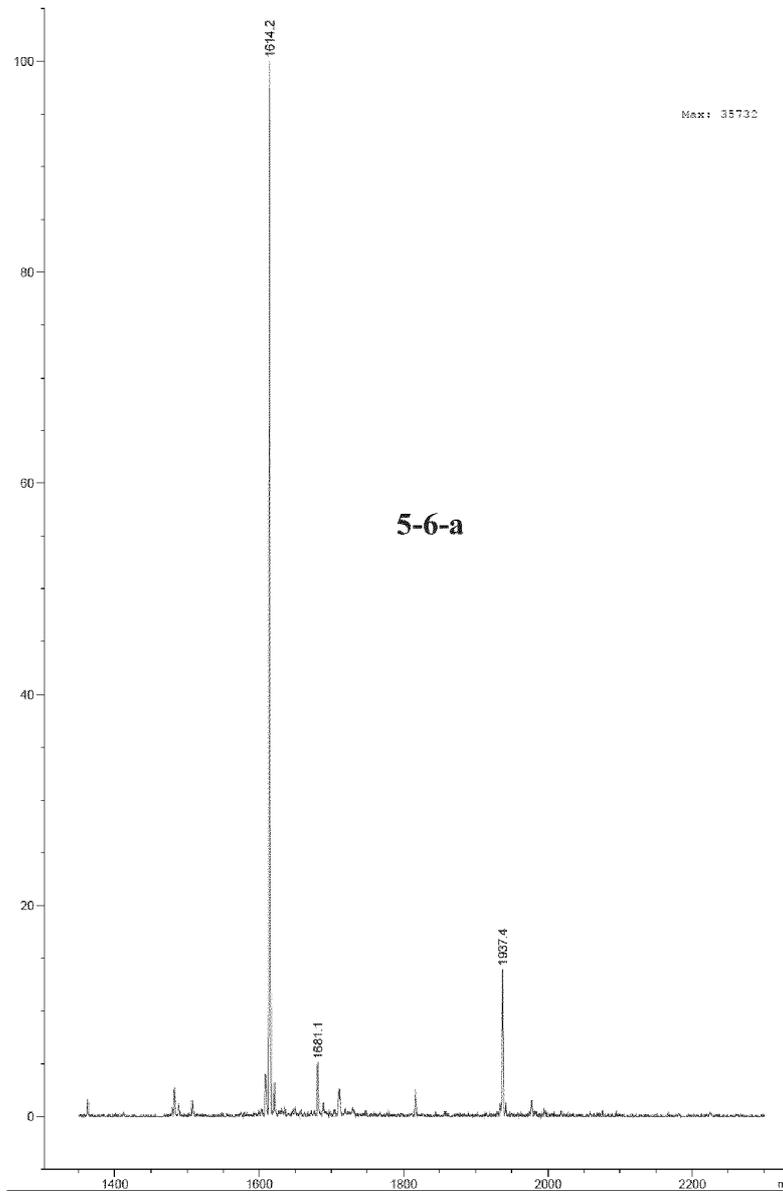
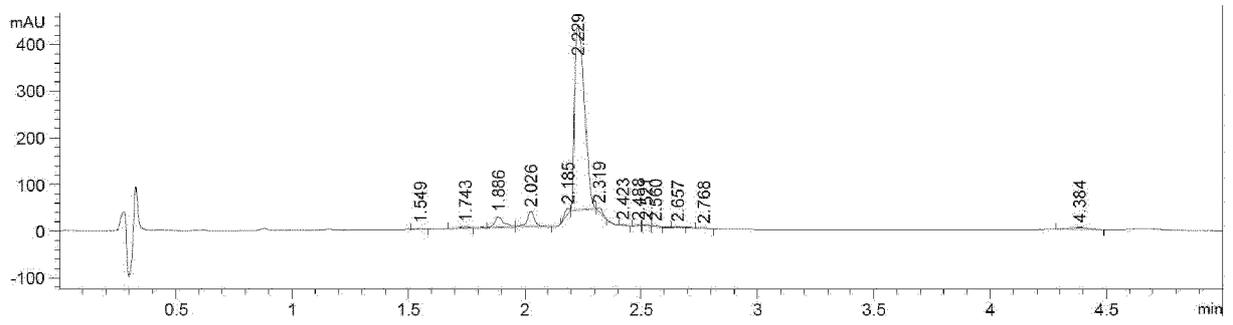


FIG. 8

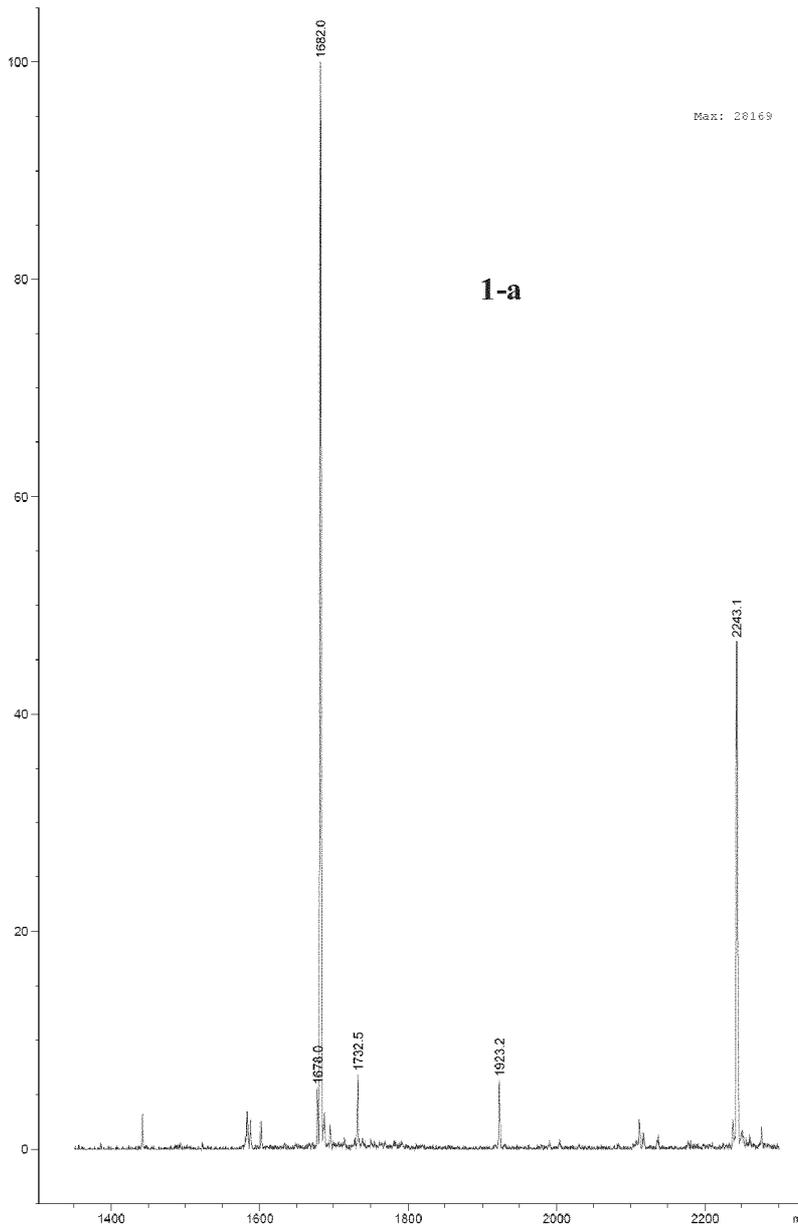
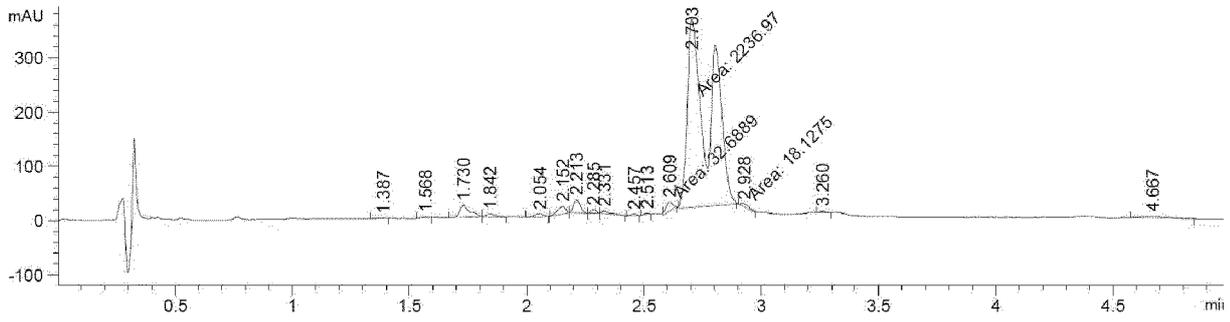


FIG. 9

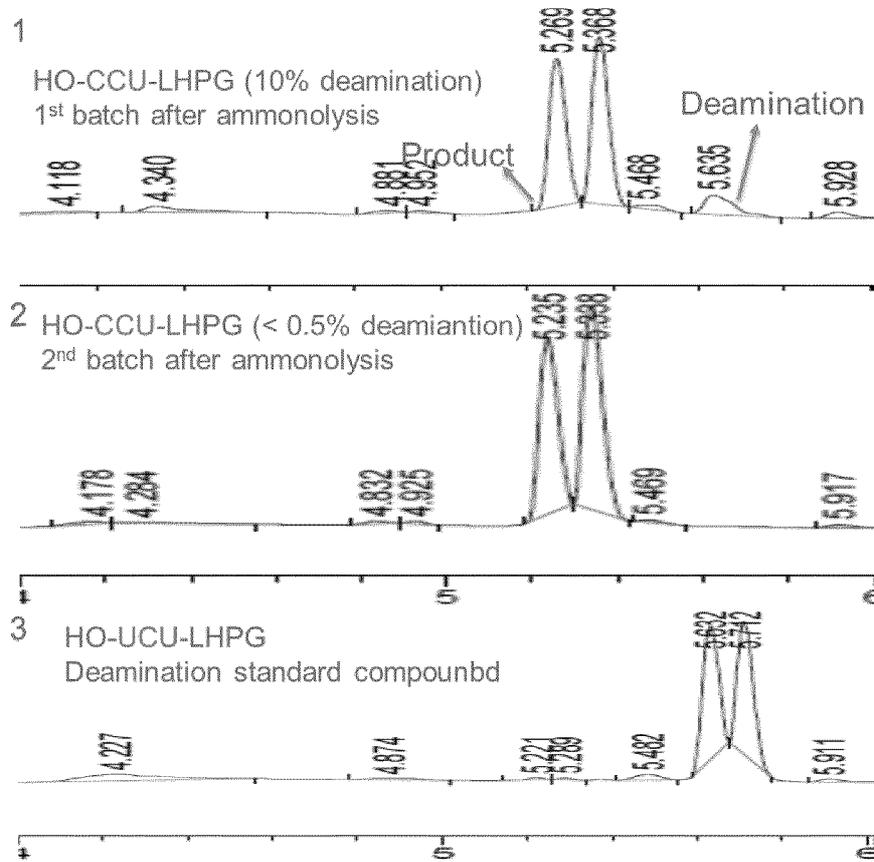


FIG. 10

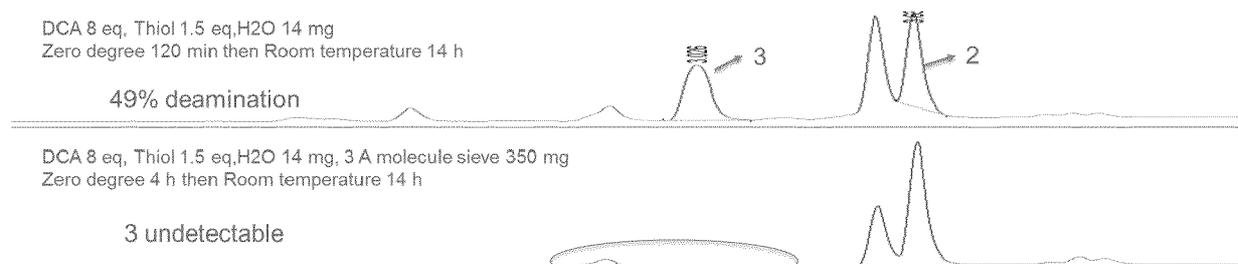


FIG. 11

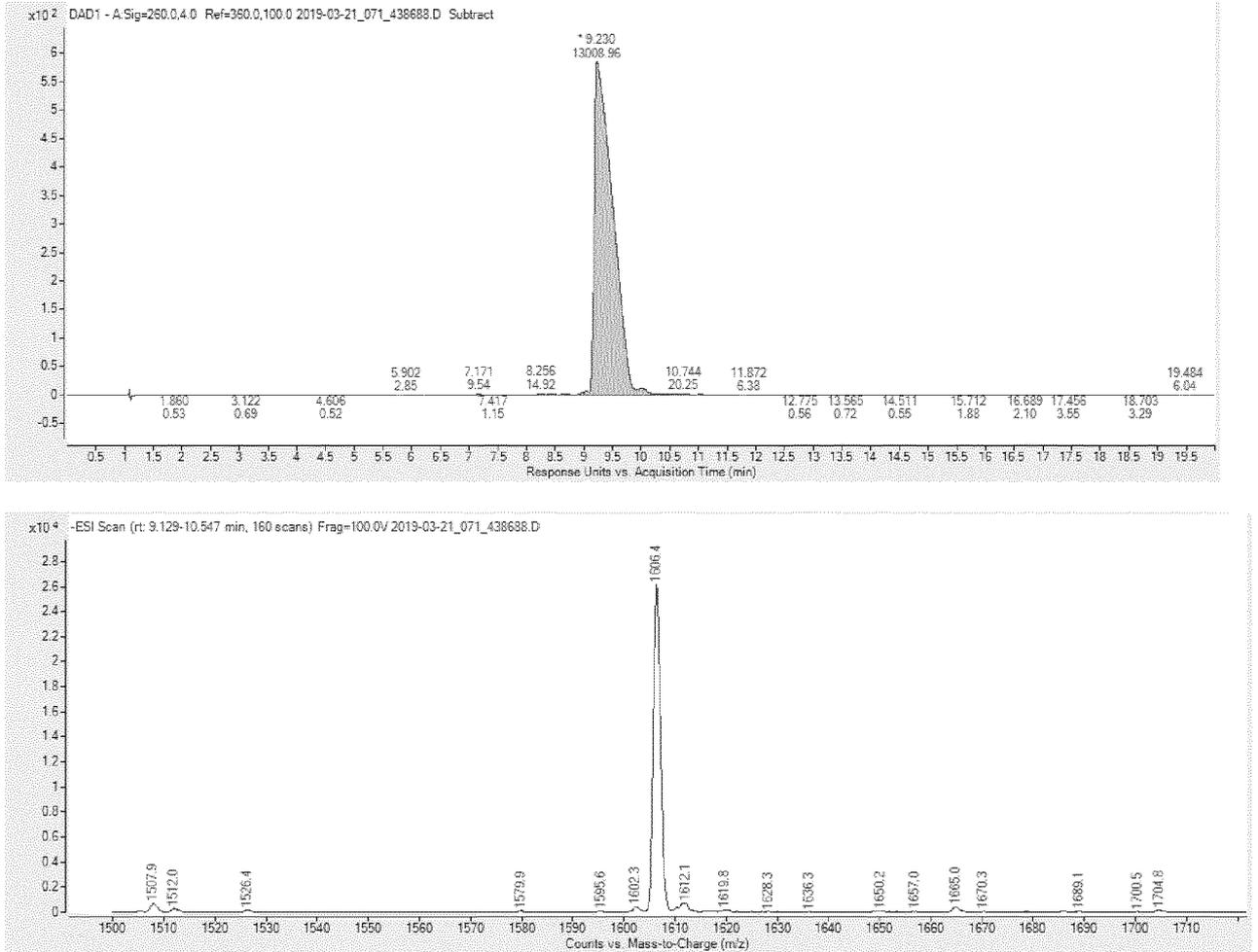


FIG. 12

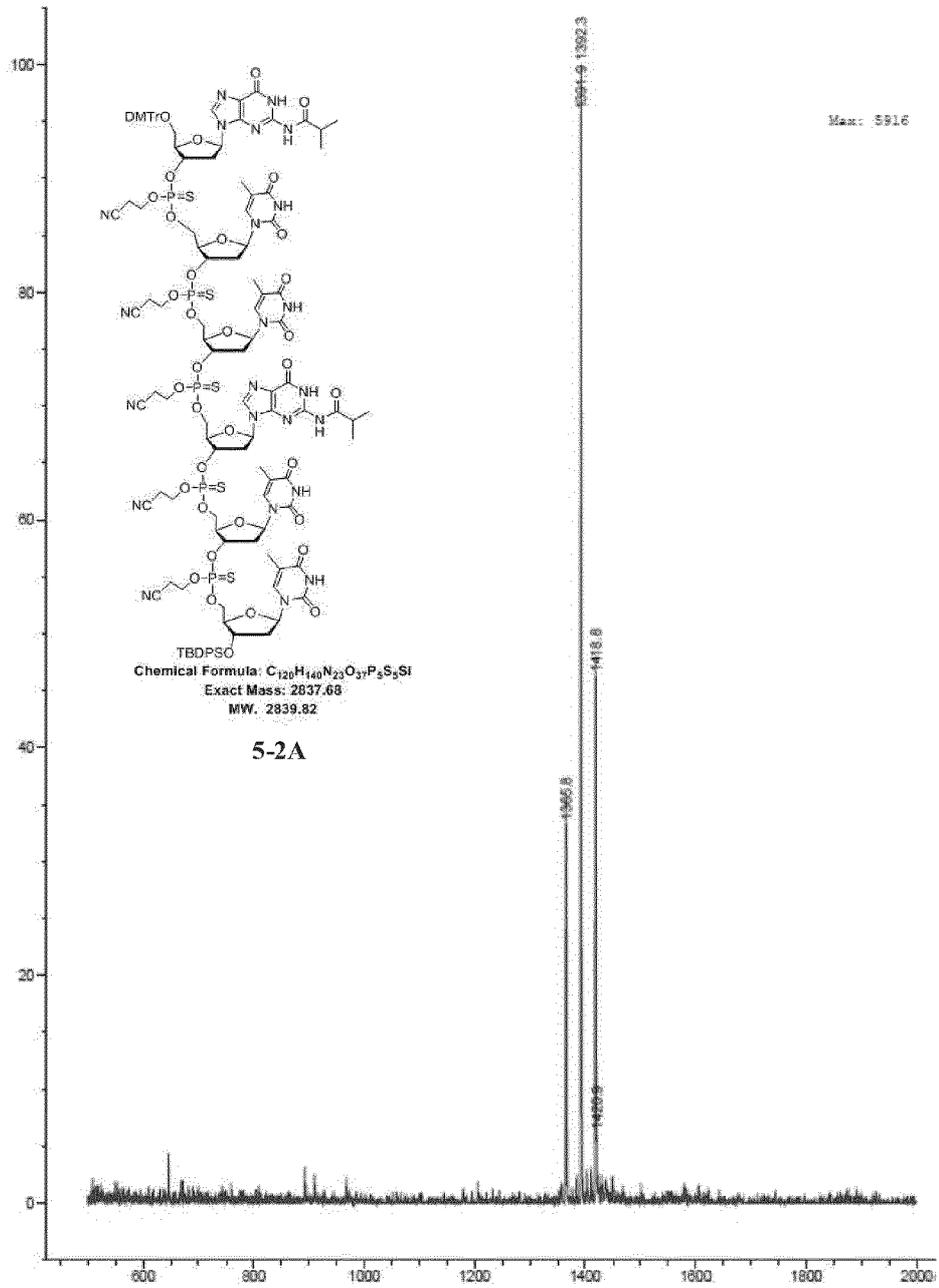


FIG. 13

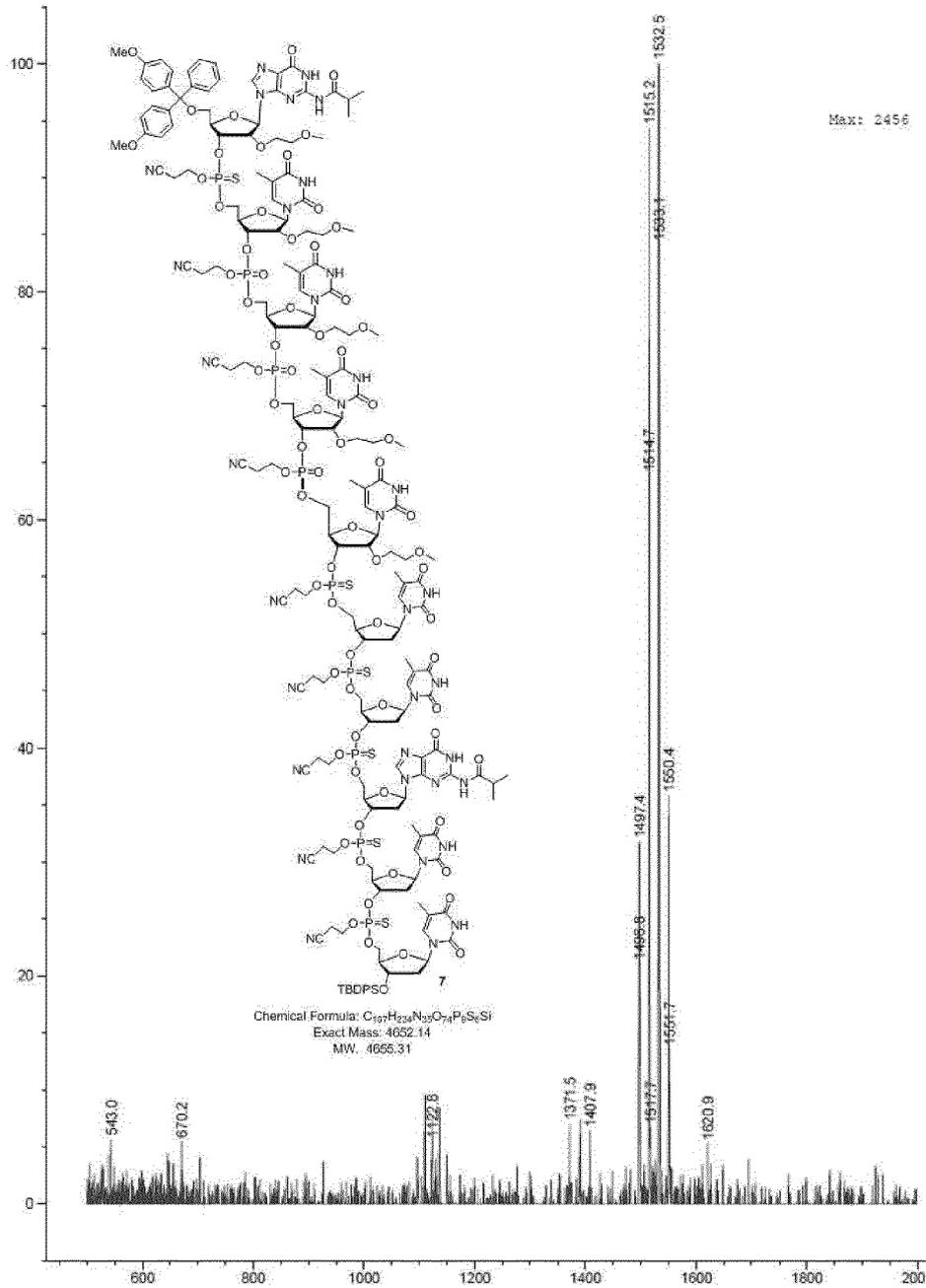


FIG. 14

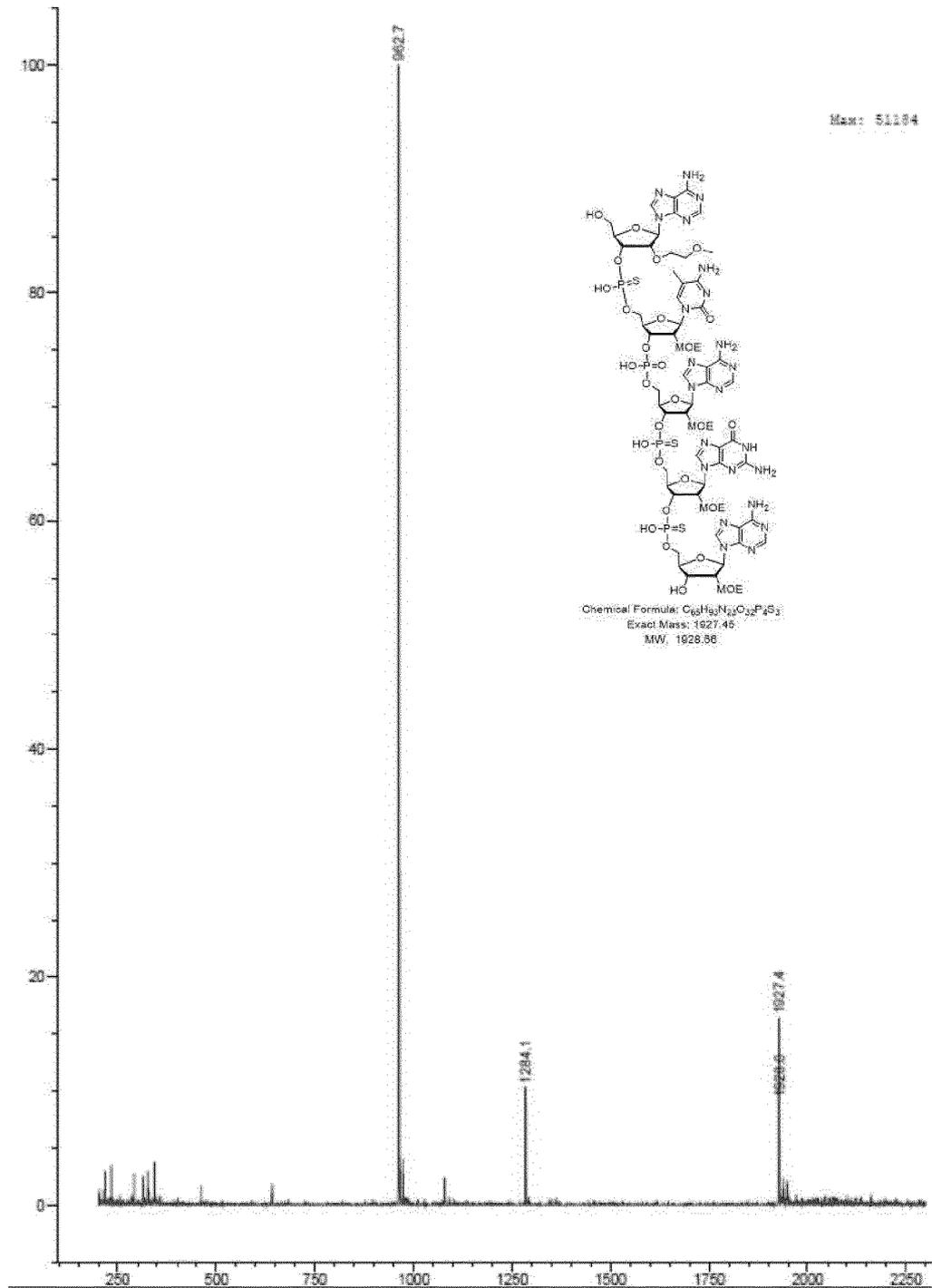


FIG. 15

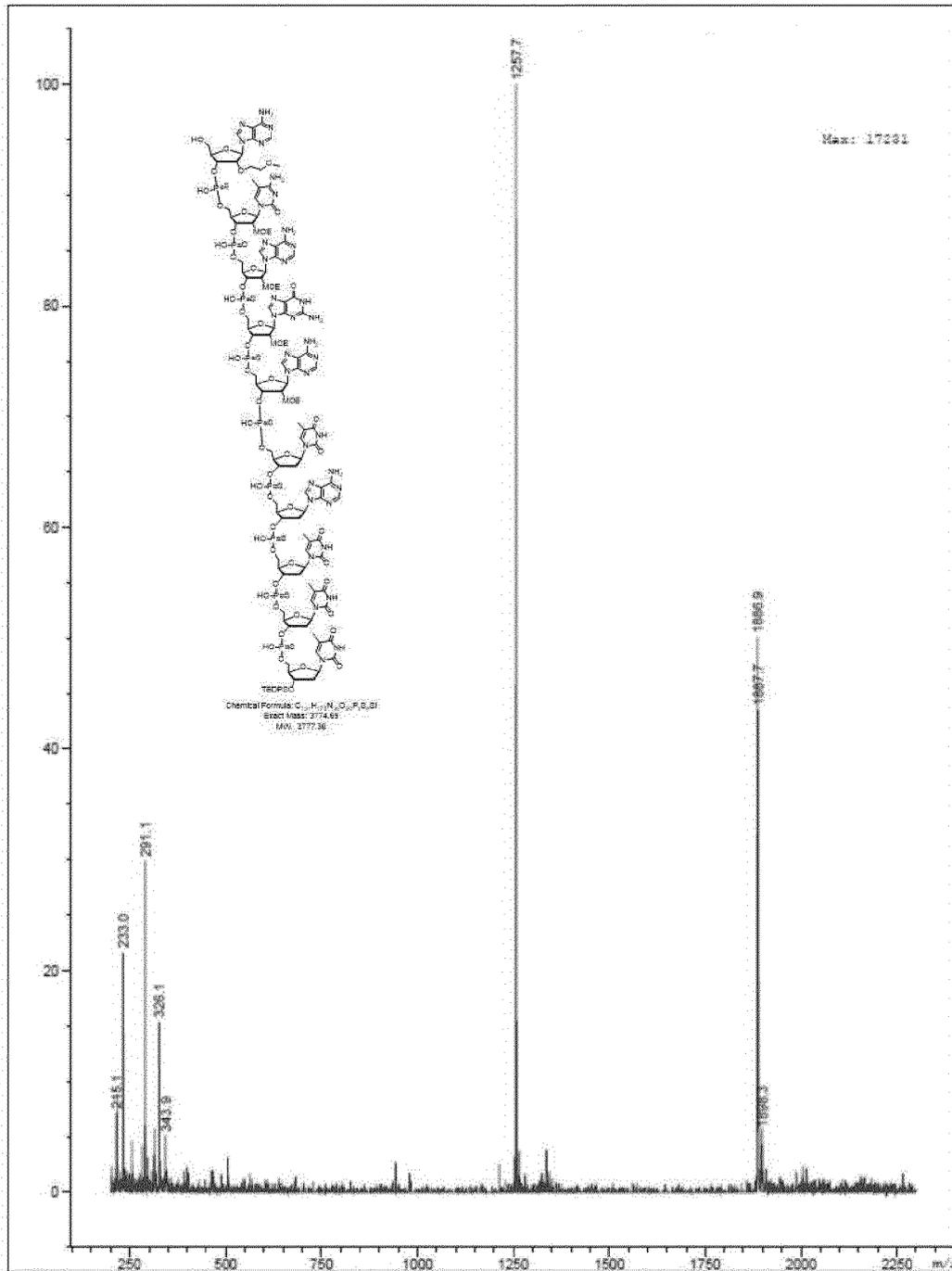


FIG. 16

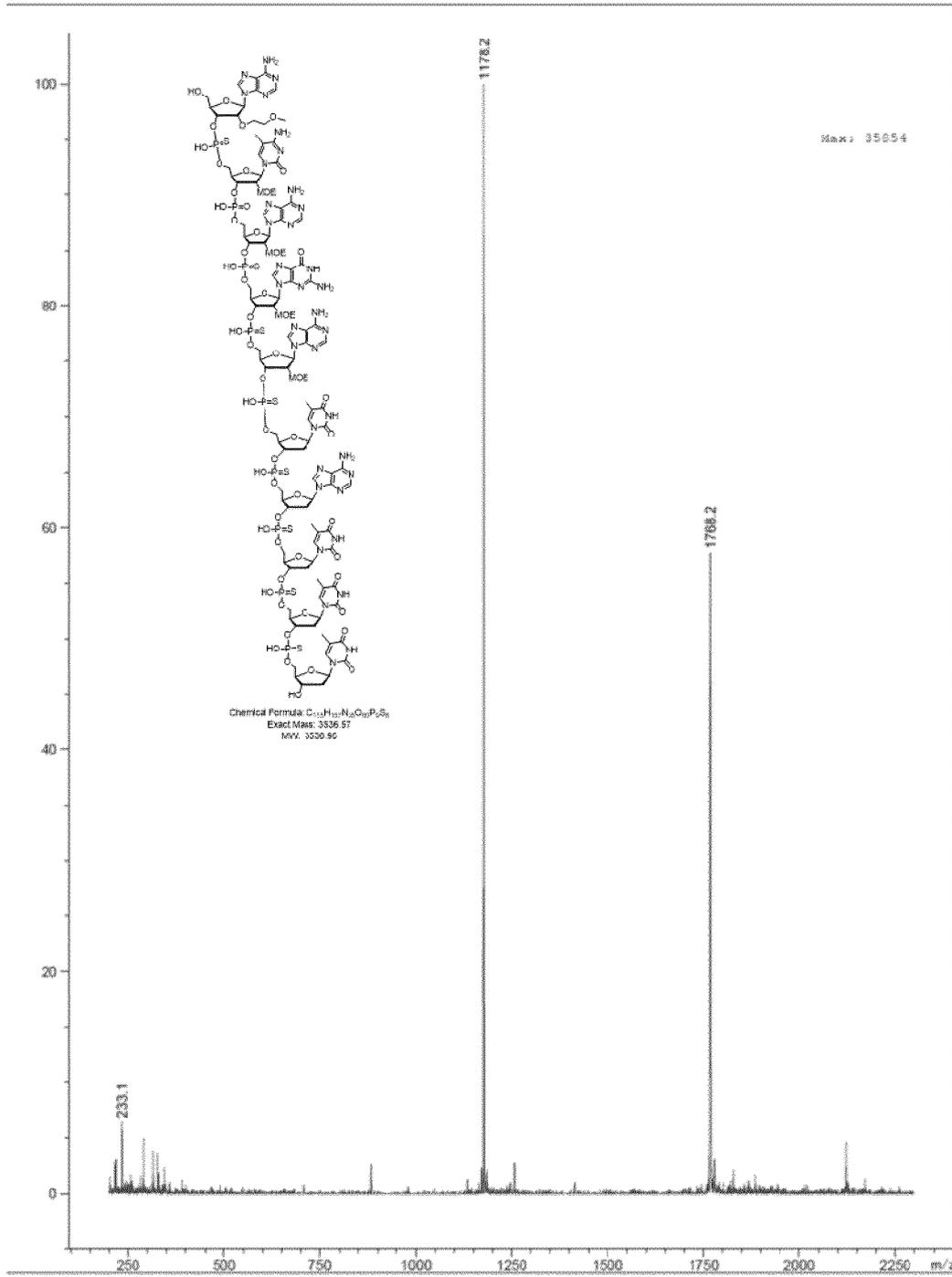


FIG. 17

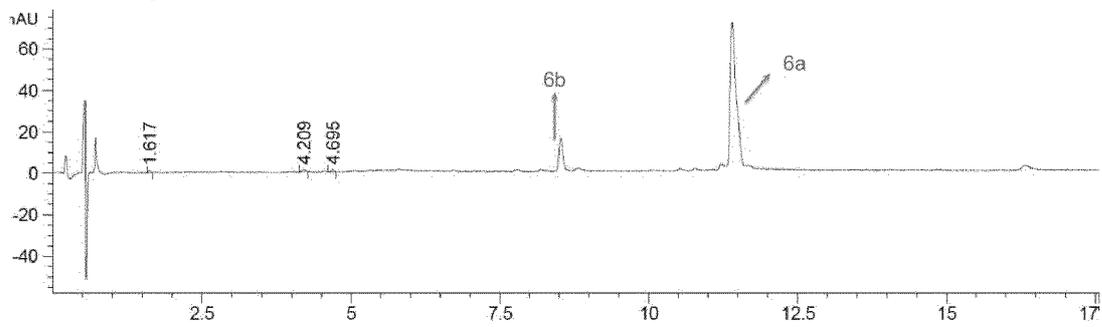
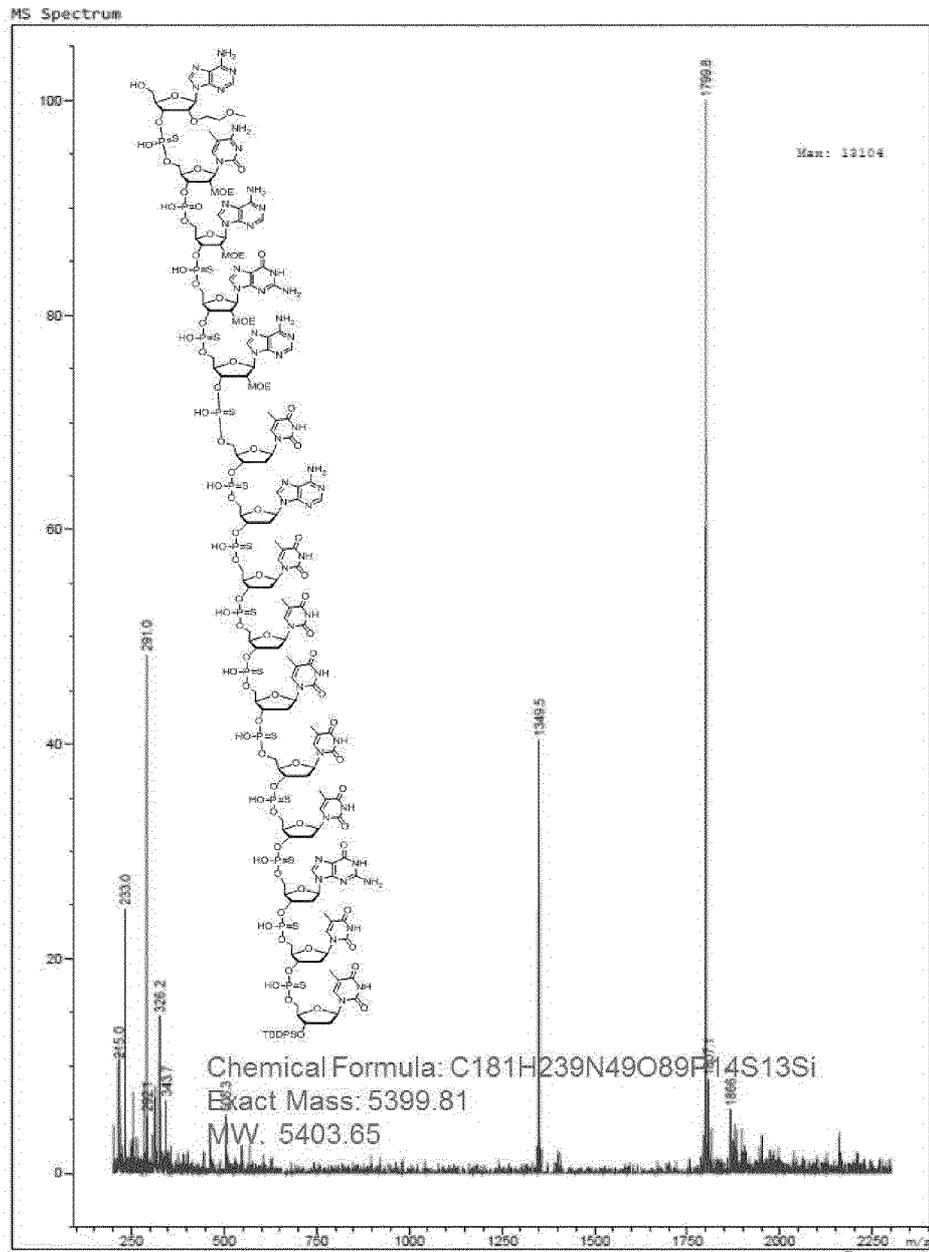


FIG. 18

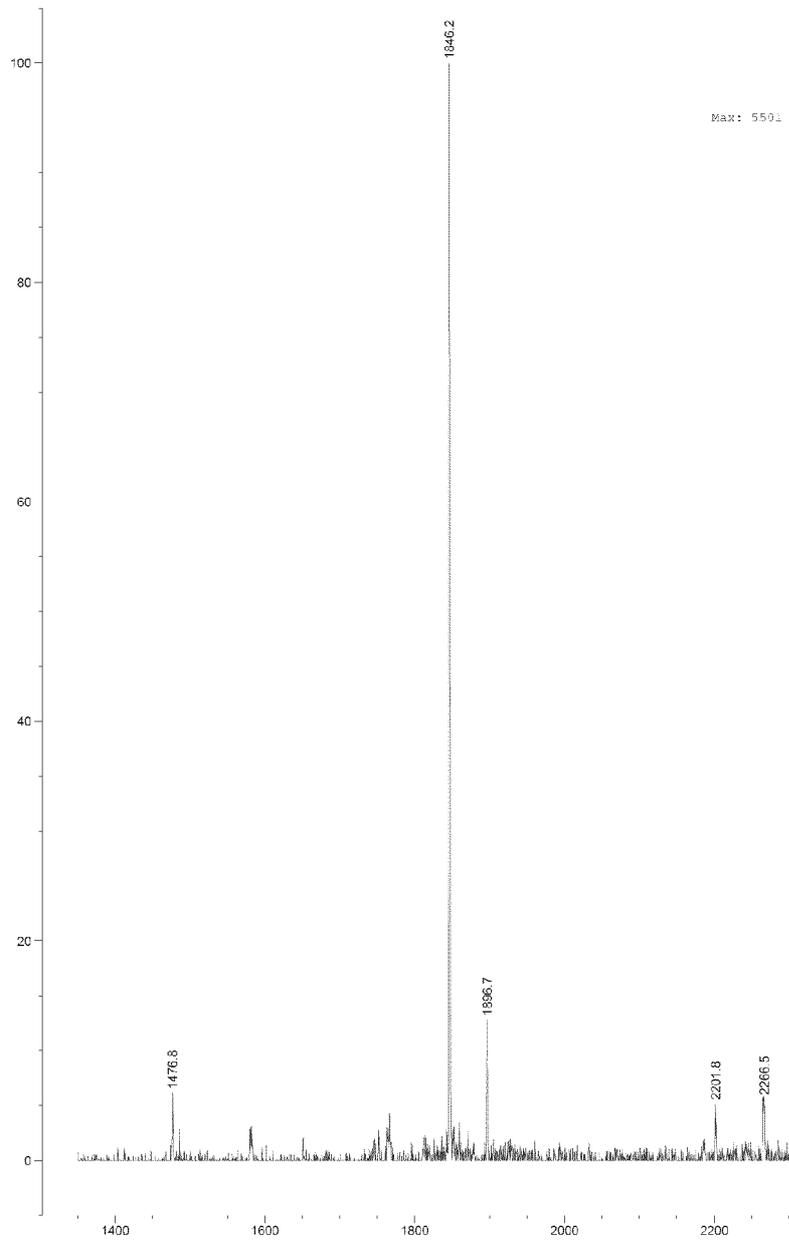
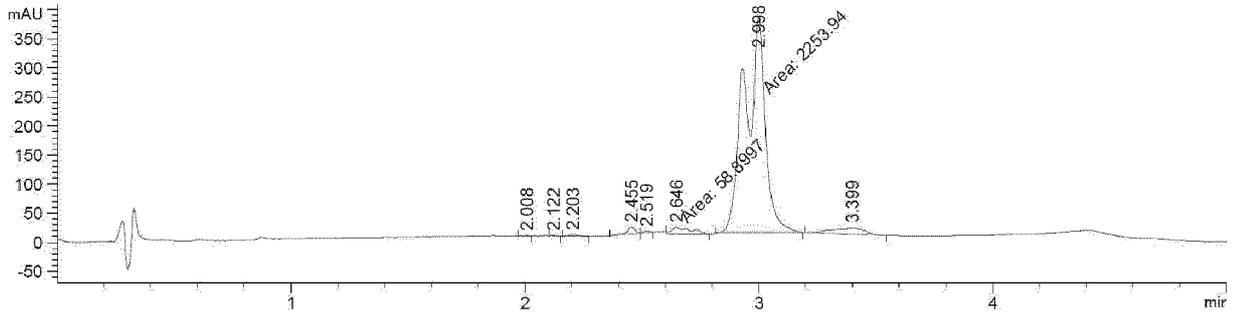


FIG. 19

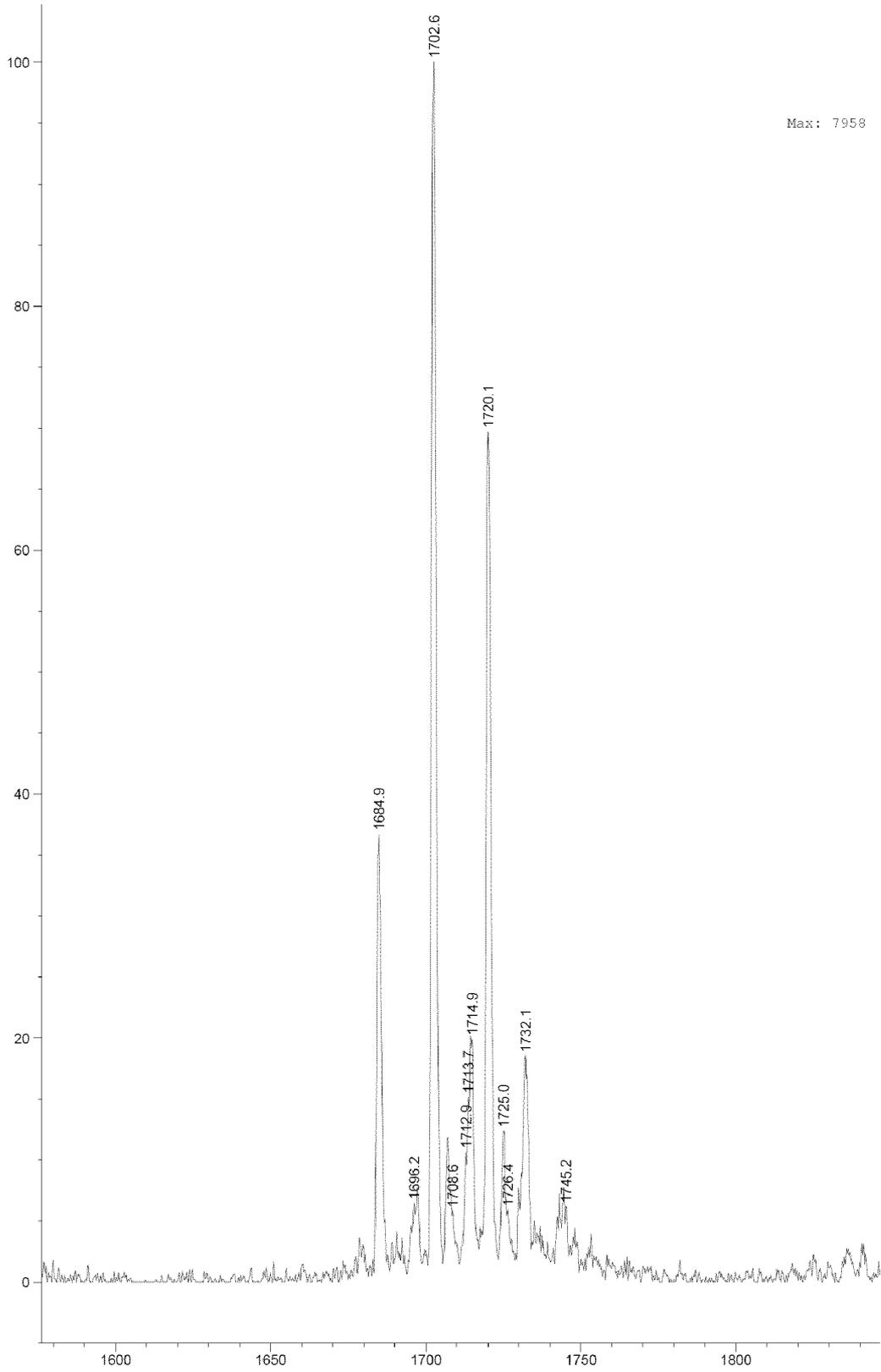


FIG. 20

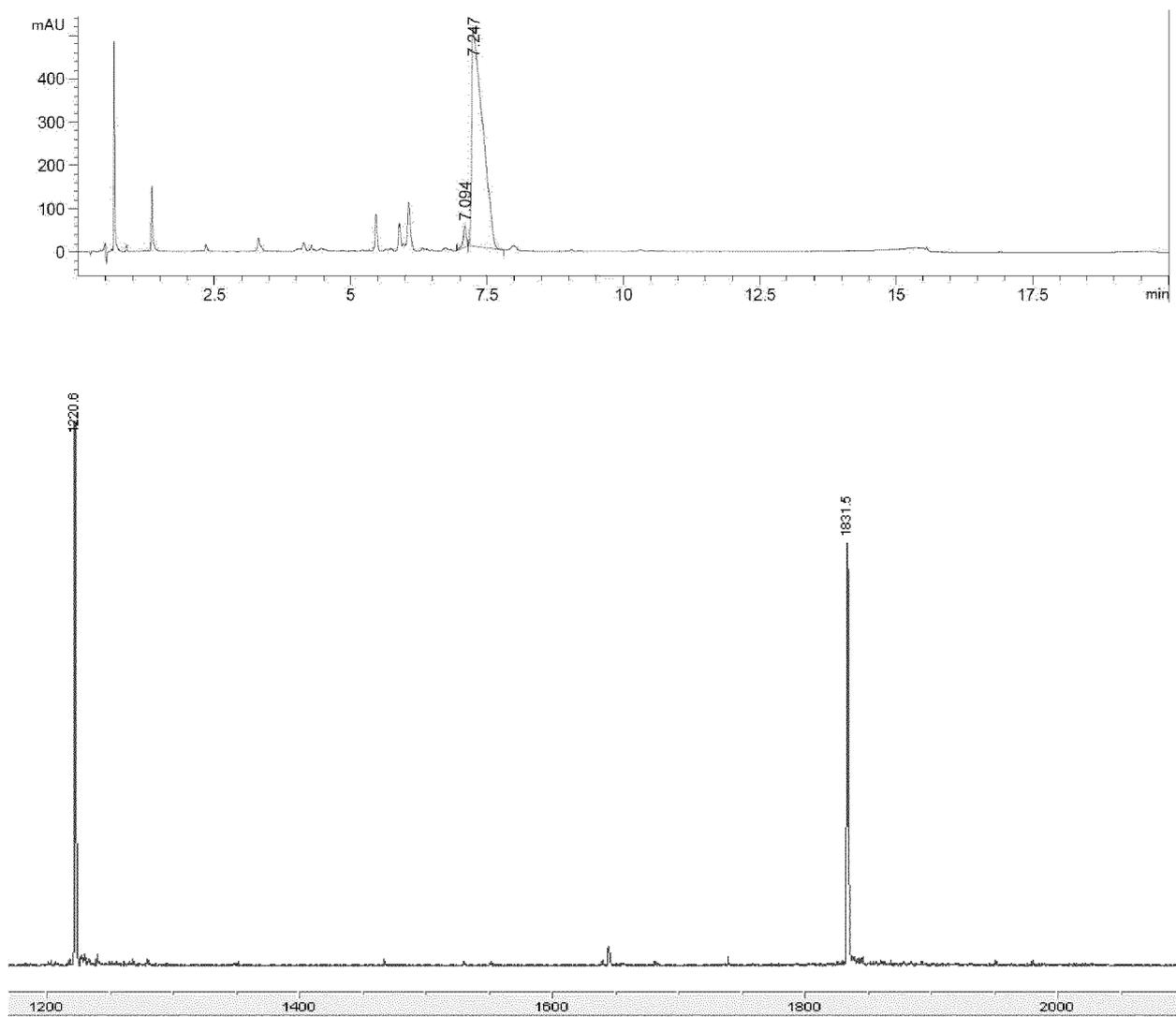


FIG. 21

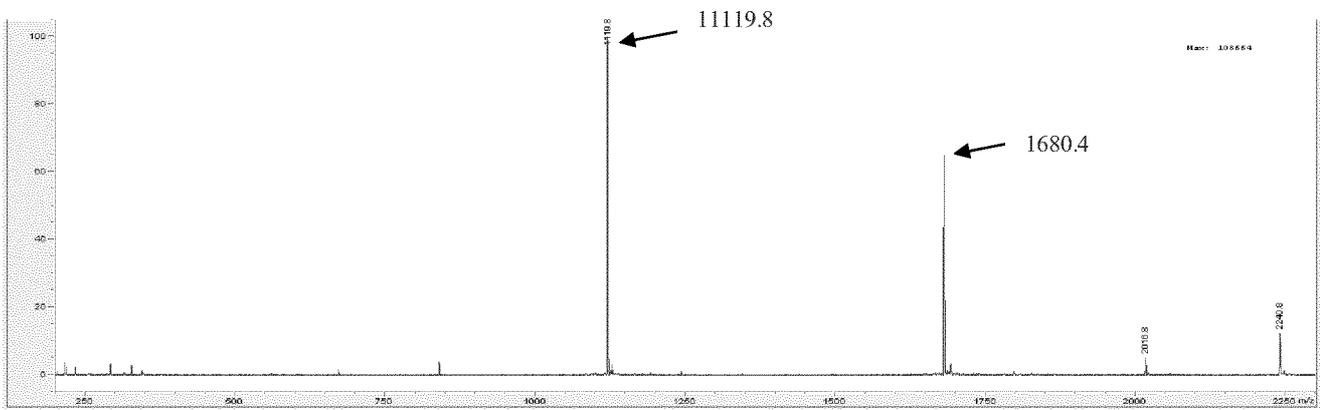
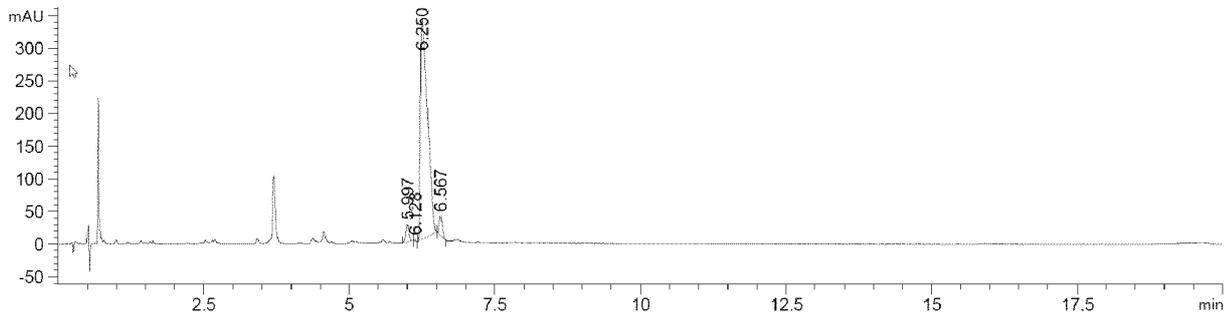


FIG. 22

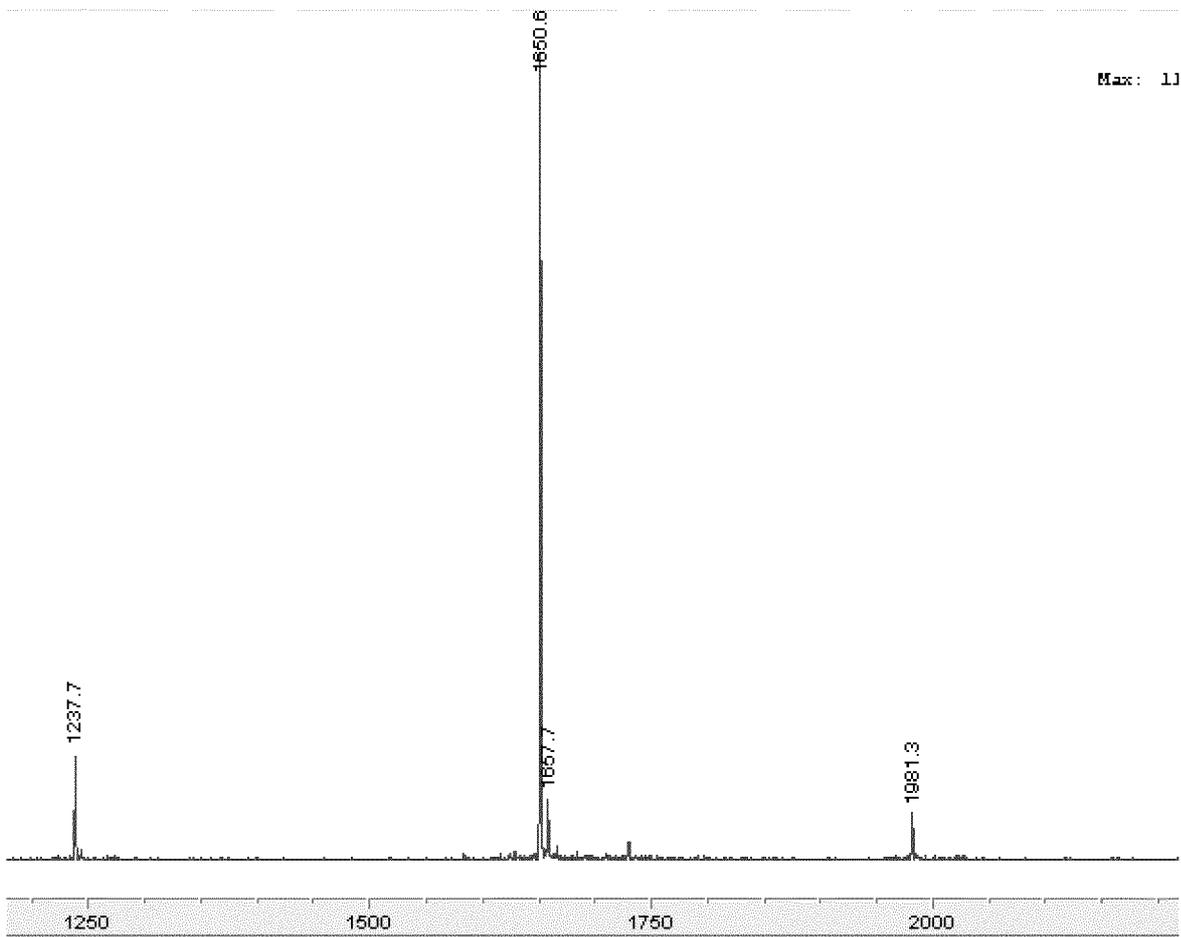
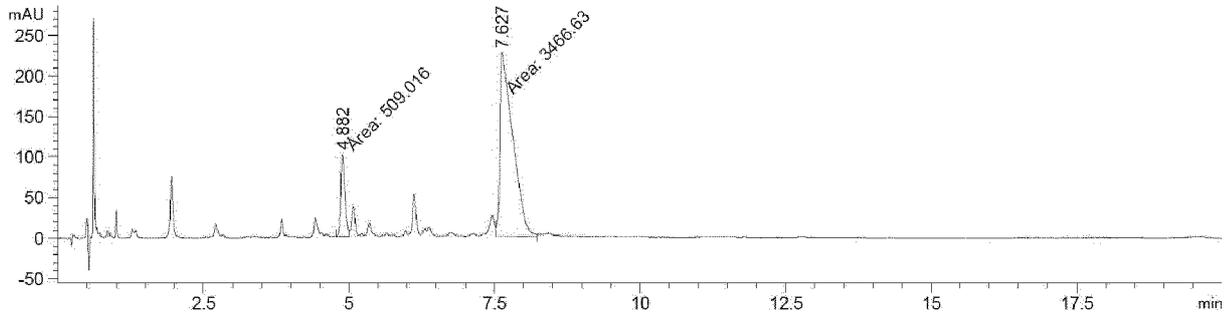


FIG. 23

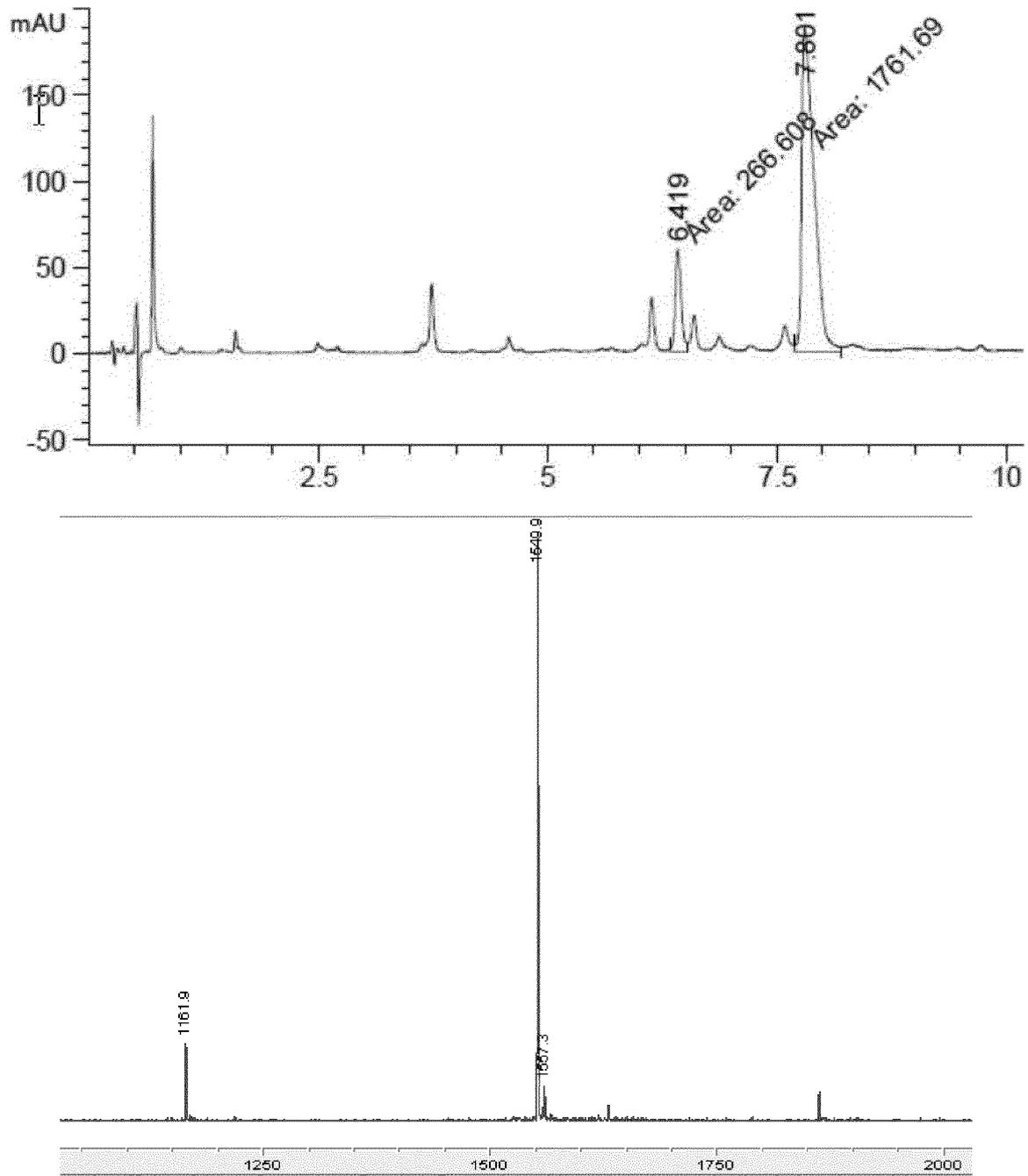


FIG. 24

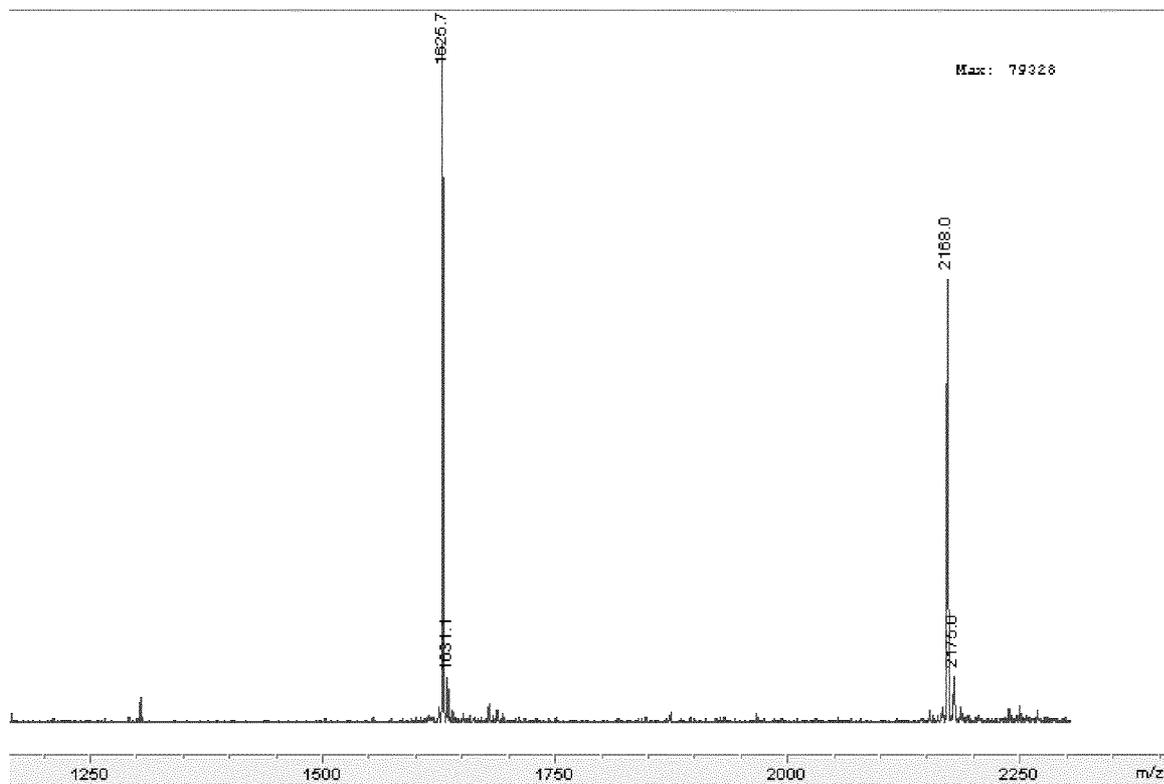
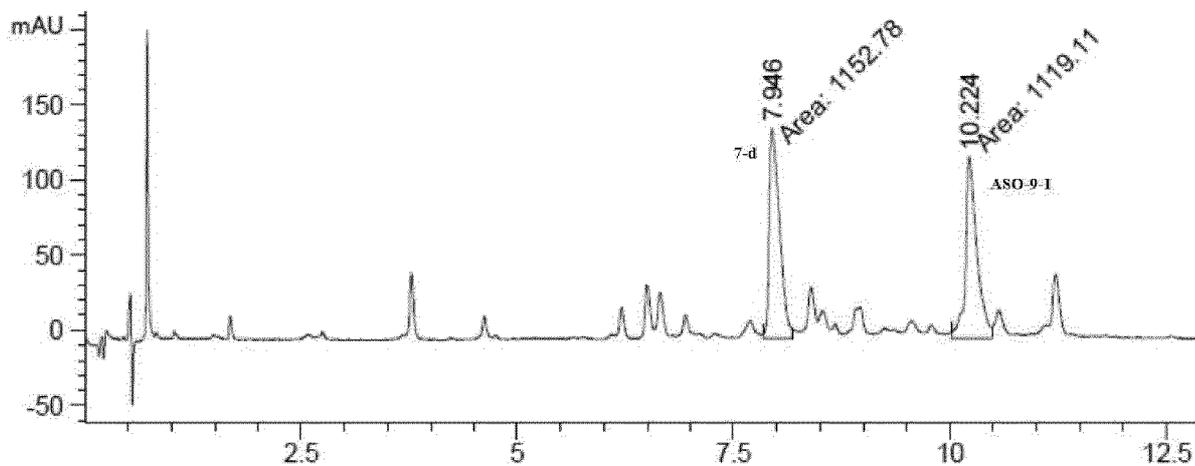


FIG. 25

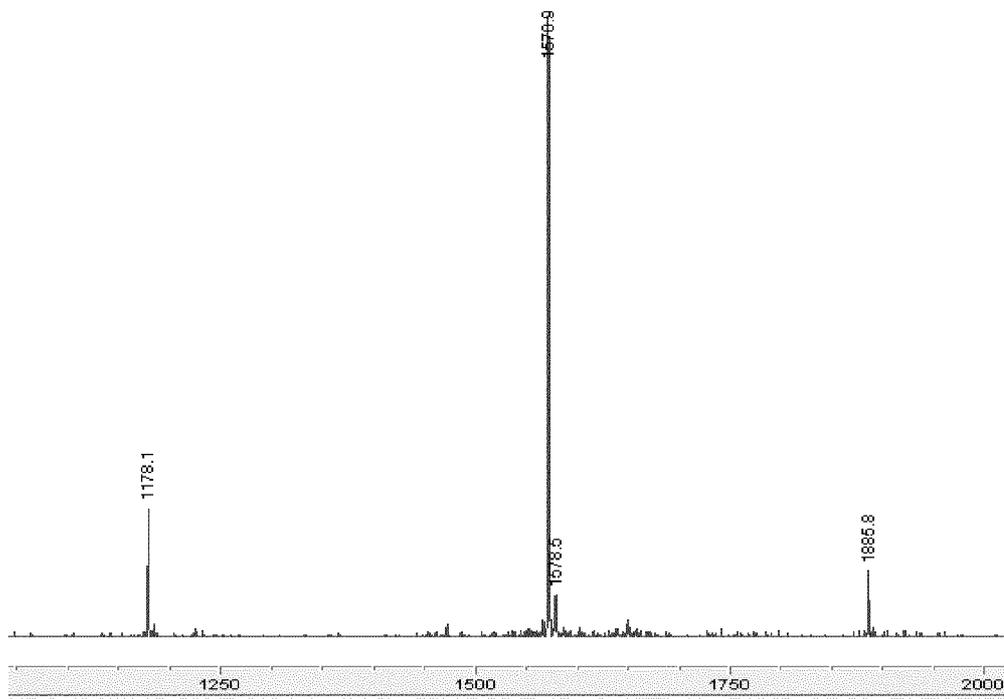
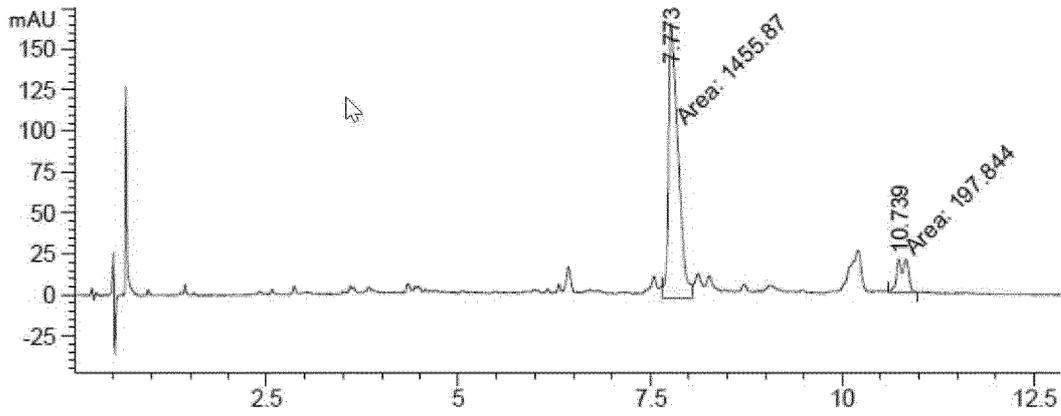


FIG. 26

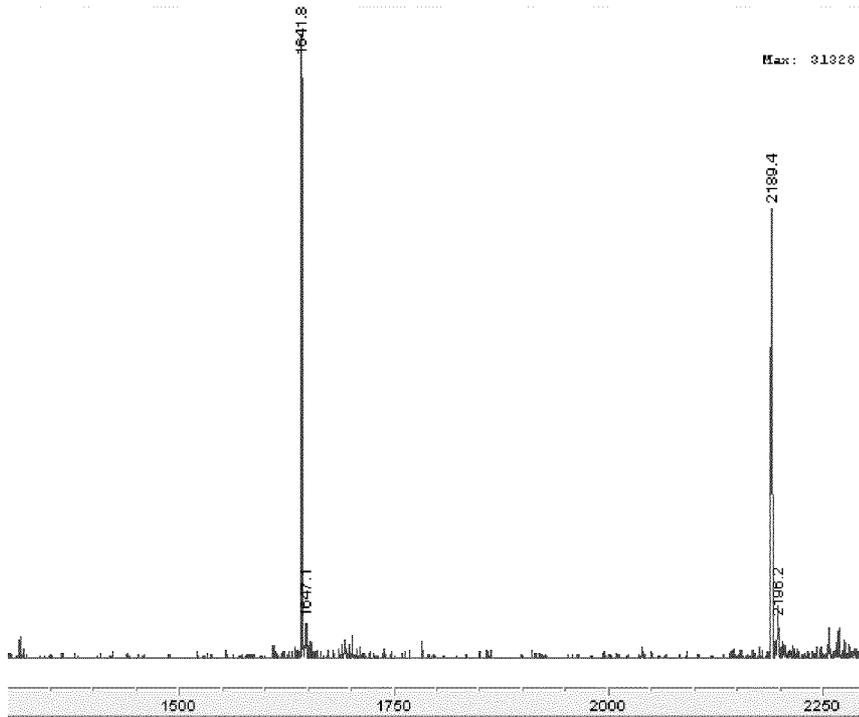
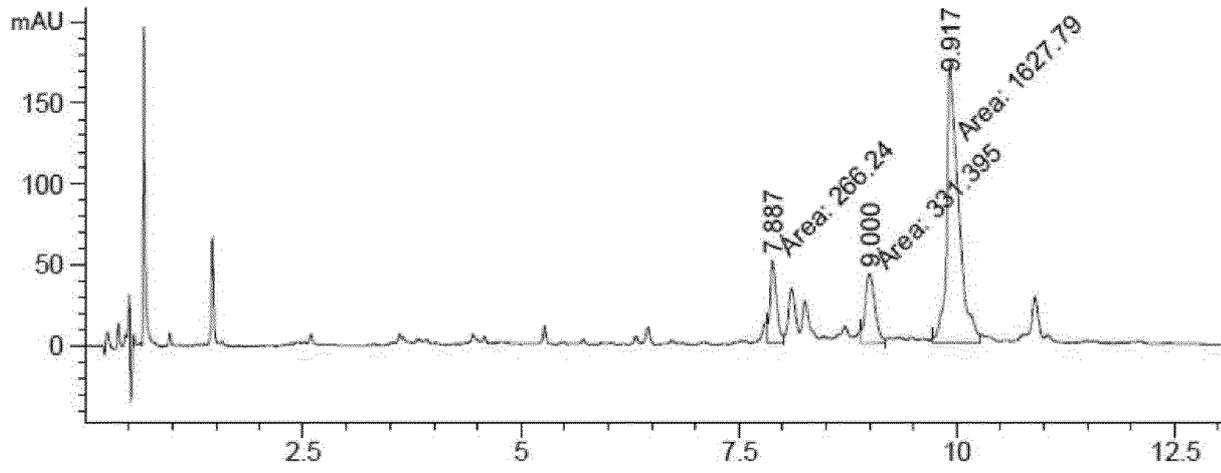


FIG. 27

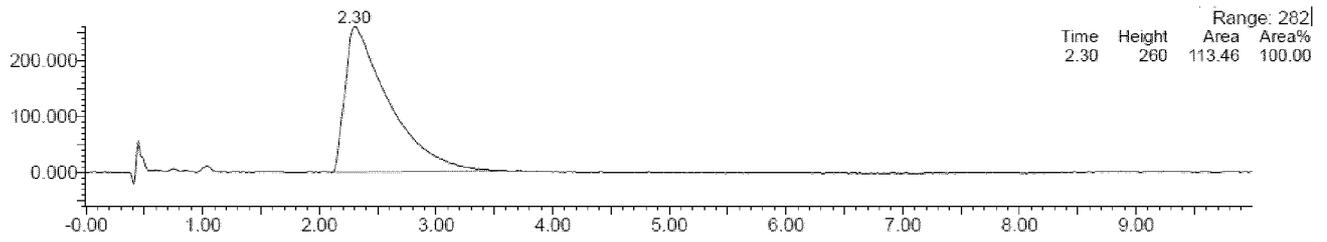


FIG. 28

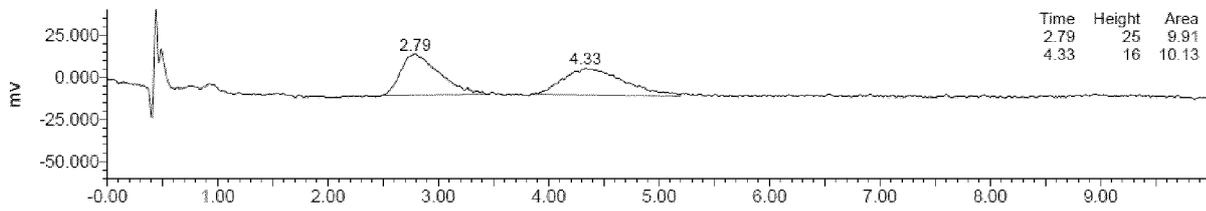
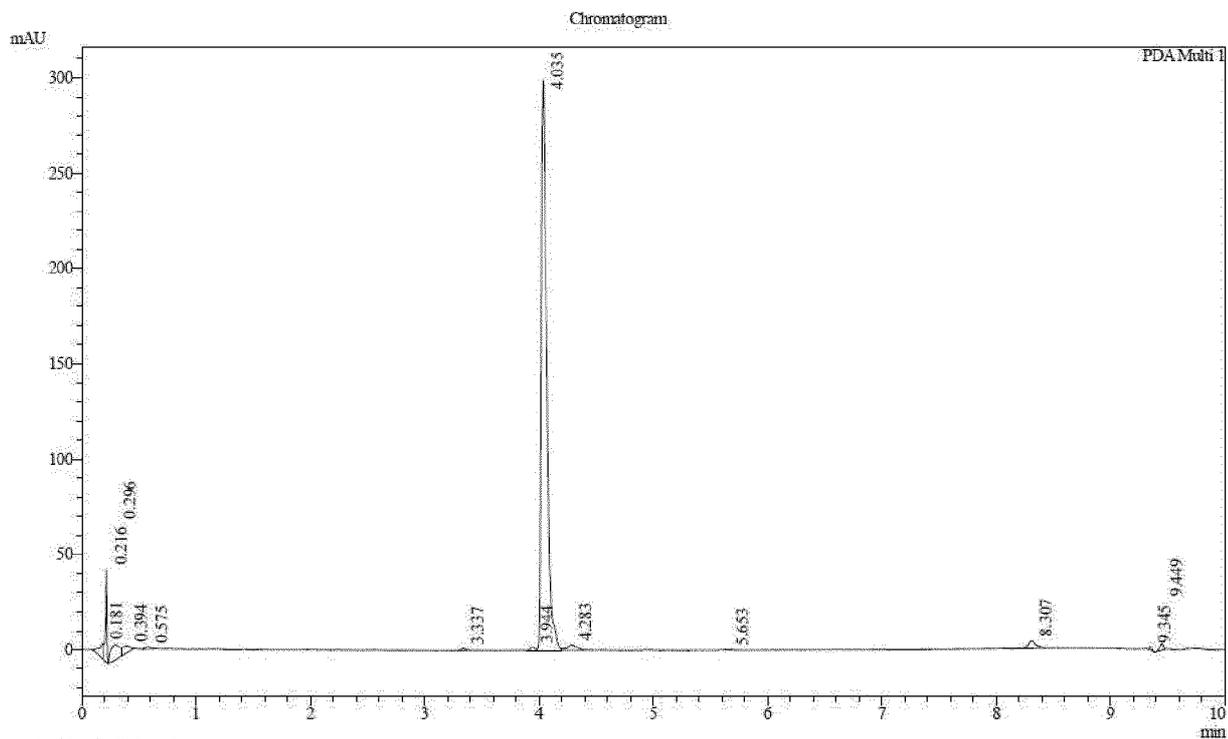


FIG. 29



1 PDA Multi 1 / 220nm, 4nm

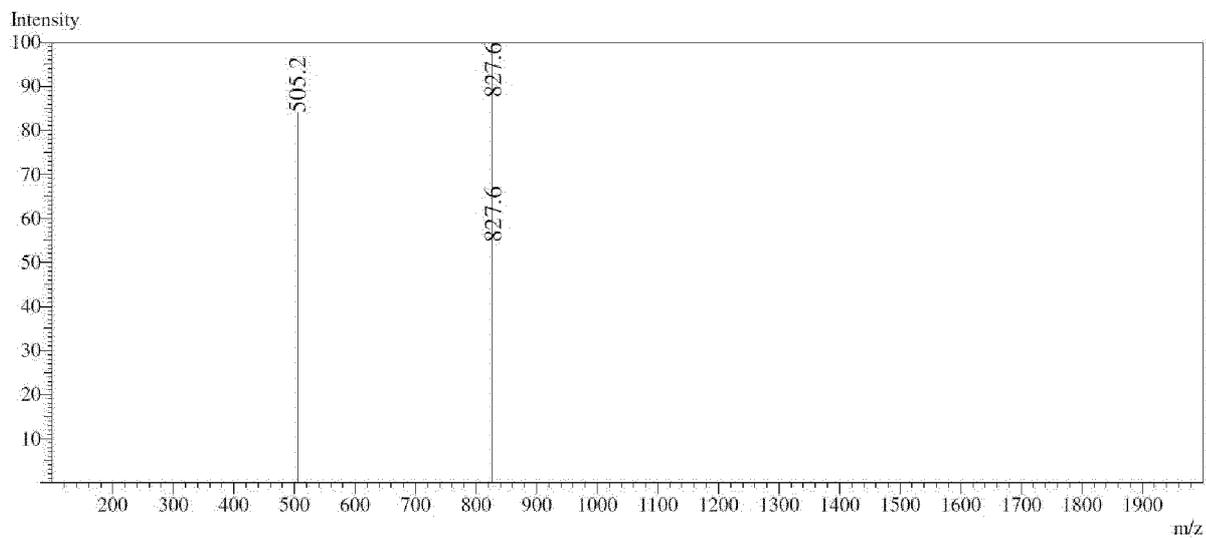


FIG. 30

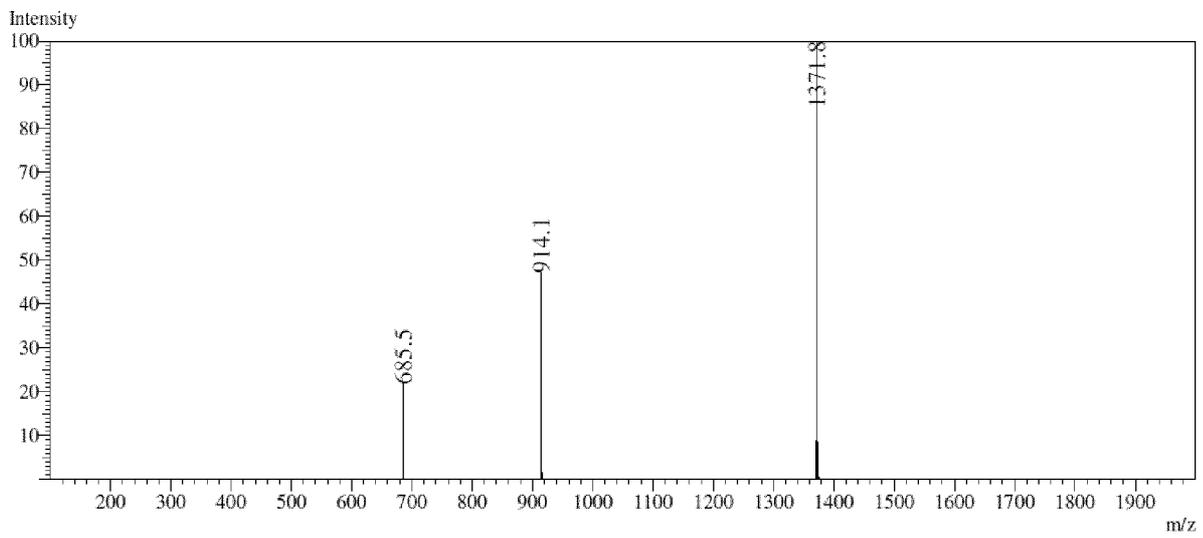
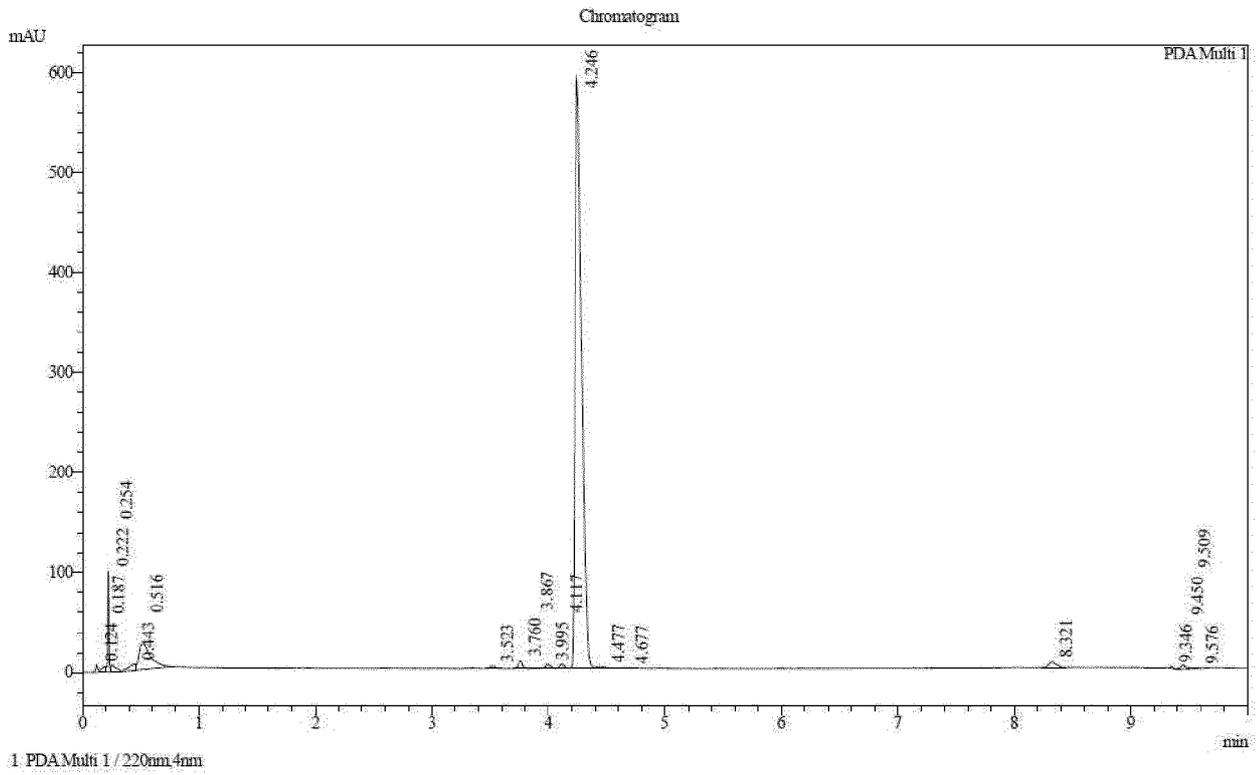


FIG. 31

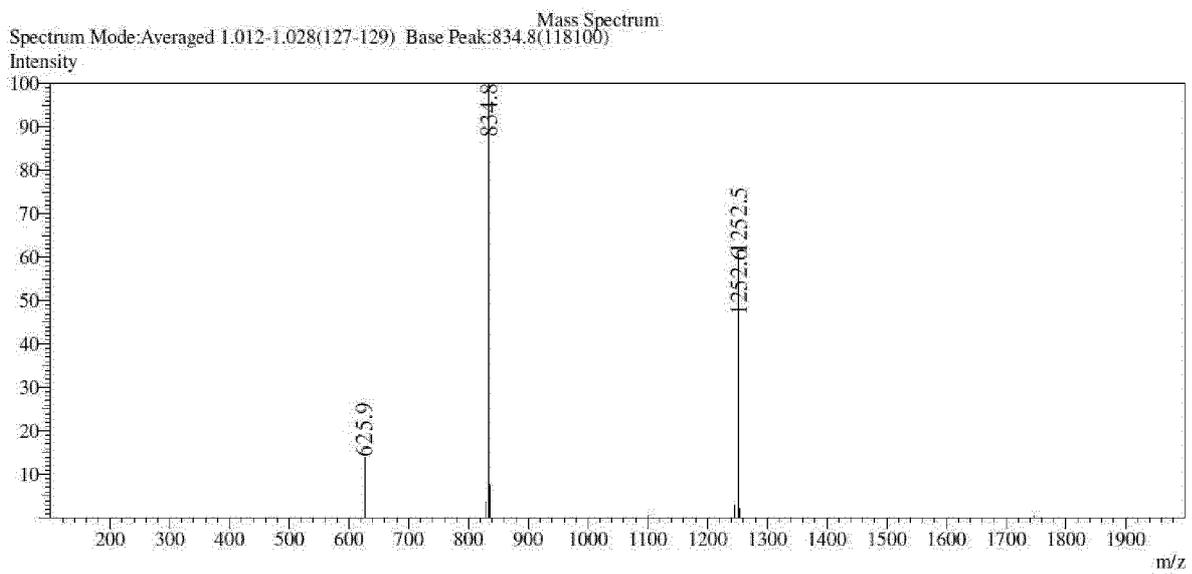
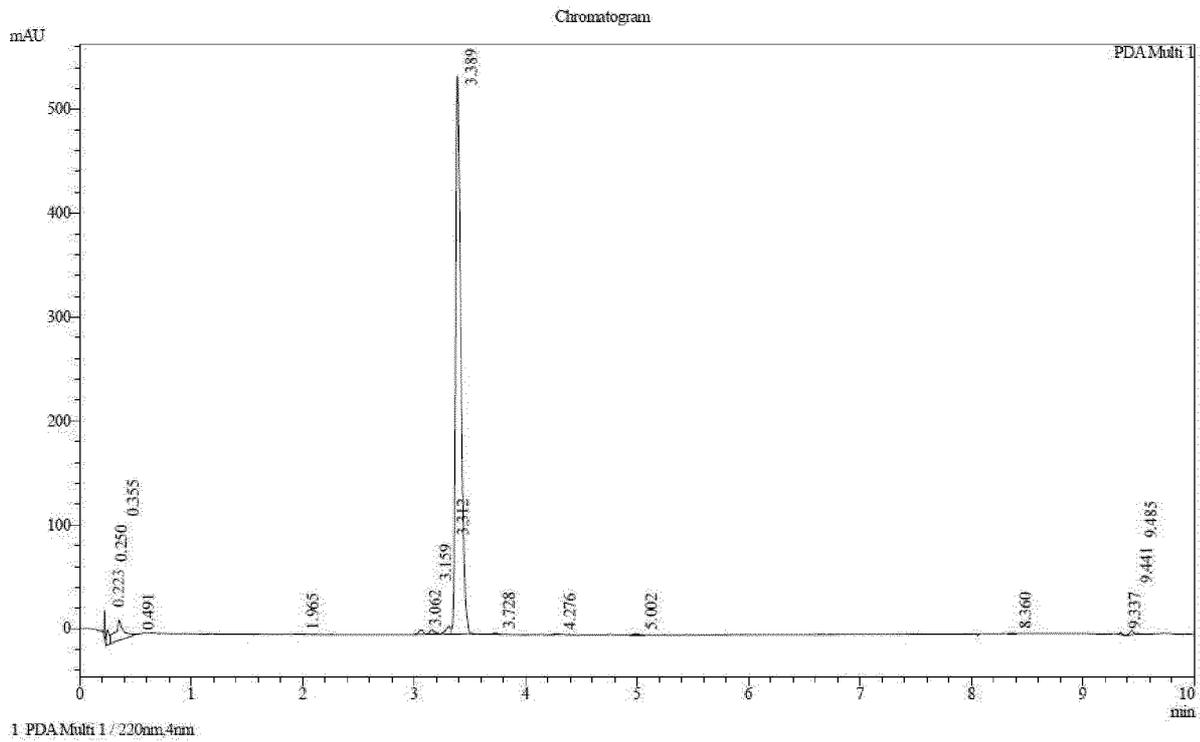


FIG. 32

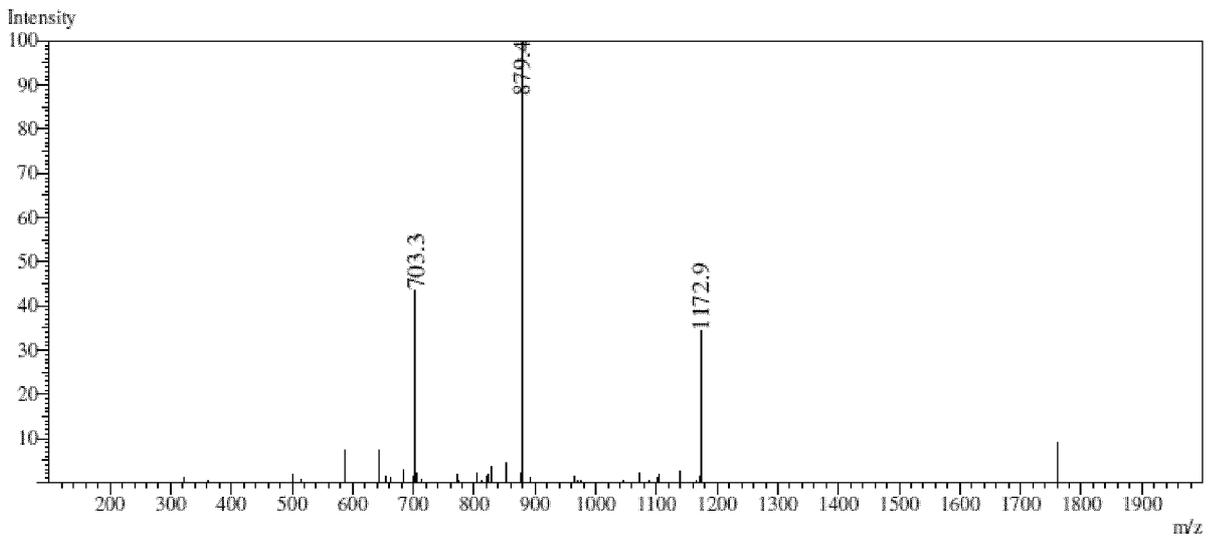
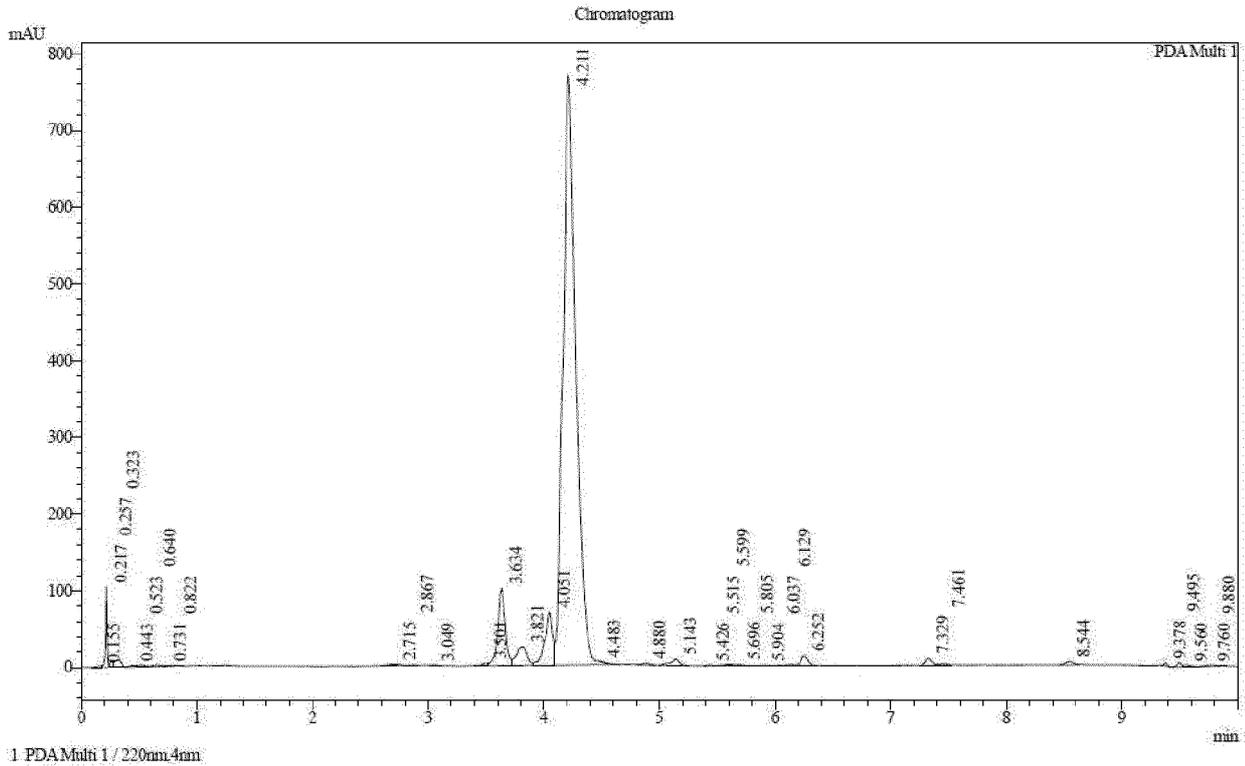


FIG. 33