

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 547 917**

(51) Int. Cl.:

C07H 19/02

(2006.01)

C07K 2/00

(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2012 E 12713128 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2694525**

(54) Título: **Grupos protectores fotolábiles que contiene un esqueleto de diarilsulfuro**

(30) Prioridad:

07.04.2011 EP 11161556

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

09.10.2015

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

STENGELE, KLAUS-PETER

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 547 917 T3

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

DESCRIPCIÓN

Grupos protectores fotolábiles que contiene un esqueleto de diarilsulfuro

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a grupos protectores fotoactivables que contienen un cromóforo de diarilsulfuro, un método para la síntesis de los mismos y su uso como grupos protectores fotoactivables utilizando la síntesis de array basada en la fotolitografía sin máscara.

10 Los grupos protectores fotolábiles (PLPG) juegan un papel importante en el bloqueo de los grupos funcionales presentes en los nucleósidos, nucleótidos, azúcares y aminoácidos, que se utilizan para la síntesis de biomoléculas, por ejemplo, ácidos nucleicos y sus derivados, proteínas, péptidos y carbohidratos. Además, los PLPG tienen la ventaja de que la desprotección del grupo funcional protegido puede realizarse simplemente a través de exposición a la luz. Por lo tanto, los PLPG proporcionan la base para la fotolitografía basada en la síntesis espacialmente resuelta de oligonucleótidos o péptidos sobre soportes sólidos. La principal ventaja de esta técnica es que pueden producirse microarrays de alta resolución. Tales microarrays de alta resolución son de gran importancia para el análisis de biomoléculas en la medicina y la investigación farmacéutica, ya que proporcionan la posibilidad de realizar análisis de alto rendimiento y coste-efectivos de múltiples muestras en una sola matriz.

20 25 30 35 40 45 50 55 60 65

El uso de PLPG para la síntesis de microarrays es bien conocido en la técnica. Los PLPG que se utilizan habitualmente en la en la síntesis de oligonucleótidos basada en fotolitografía son, por ejemplo α-metil-6-nitropiperonil-oxicarbonilo (MeNPOC) (Pease, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91 (1994) 5022-5026), 2-(2-nitrofenil)-propoxicarbonilo (NPPOC) (Hasan, et al., Tetrahedron 53 (1.997) 4247-4264). Los PLPG que se utilizan comúnmente para la síntesis de péptidos basada en fotolitografía son, por ejemplo nitroveratrilocarbonilo (NVOC) (Fodor, et al., Science 251 (1991) 767-773) y 2-nitrobenciloxicarbonilo (NBOC) (Patchornik, et al., J. Am. Chem. Soc. 92 (1970) 6333-6335).

El principal inconveniente de los PLPG en la técnica anterior es que tiene que utilizarse luz de una longitud de onda de aproximadamente 365 nm o inferior para la desprotección de los grupos funcionales protegidos. Las fuentes de luz, que son adecuadas para generar tales longitud de onda, son por ejemplo, lámparas de arco de mercurio, láser excímero, LED UV y láseres de estado sólido de frecuencia multiplicada. Estas fuentes de luz se caracterizan por los altos costos de compra, proporcionan energía luminosa limitada y tienen un tiempo de vida corto que conduce a altos costos generales de operación. Dado que algunas de las fuentes de luz antes mencionadas contienen sustancias peligrosas, por ejemplo, mercurio, las medidas apropiadas para asegurar la seguridad y la eliminación adecuada son necesarios aumentando aún más los costos.

Los dispositivos ópticos utilizados para la síntesis de oligonucleótidos o péptidos basados en fotolitografía, tales como dispositivos de microespejo (WO 03/065038), están diseñados principalmente para el rango de longitud de onda visible de aproximadamente 380 a 780 nm, es decir, estos dispositivos llevan un antirreflejo o recubrimiento antirayado protector optimizado para la transparencia de las respectivas longitudes de onda visibles. Por lo tanto, la longitud de onda UV cercana de 365 nm, necesaria para la desprotección de los grupos funcionales protegidos con el PLPG conocido en el estado de la técnica, requieren dispositivos ópticos que están optimizados para las longitudes de onda de UV cercano. Dado que la mayoría de los dispositivos ópticos están optimizados para el uso con luz visible, tal optimización a menudo comprende la eliminación de la capa destinada al uso con la luz visible de los dispositivos ópticos y / o recubriendo el dispositivo óptico con materiales destinados a ser utilizados con luz UV o UV cercana.

Además, algunas de las fuentes de luz mencionadas anteriormente producen un amplio espectro de longitudes de onda, por ejemplo, lámparas de arco de mercurio que emiten luz desde el UV a la gama-IR, los cuales tienen efectos desventajosos en relación con la síntesis de biomoléculas. La luz UV, por ejemplo, puede ser absorbida por el DNA sintetizado que conduce a roturas al azar dentro de la cadena por escisión de radicales fosfato del esqueleto, la oxidación de la base guanina y la posterior rotura de la cadena o fotodimerización, en especial de las bases de timina. Además, la luz UV puede conducir también a la destrucción de ciertos aminoácidos, tales como triptófano por oxidación del radical o cisteína y metionina por la oxidación de azufre. Como resultado los microarrays de DNA o de péptidos pueden ser de baja calidad debido a longitudes indefinidas de las cadenas de DNA y péptidos sintetizados, respectivamente.

Por contra, la luz IR conduce al calentamiento de los dispositivos ópticos que se traduce en la deformación del dispositivo óptico. En el caso de la utilización de un dispositivo de microespejo, por ejemplo, un aumento de la temperatura de 1 °C del dispositivo conduce a una deriva de la luz reflejada de aproximadamente 10 μm y por lo tanto a una pérdida de enfoque en la característica correspondiente en el microarray. En vista de la precisión necesaria en la fotolitografía basada en la síntesis de oligonucleótidos o péptidos sobre soportes sólidos, tales aberraciones darían lugar a una menor calidad de los arrays. En consecuencia, son necesarios esfuerzos y costes adicionales para eliminar las longitudes de onda de rayos UV e IR no deseados (por ejemplo, filtros) producidas por

las fuentes de luz necesarias para una desprotección a 365 nm con el fin de asegurar la calidad de los arrays de oligonucleótidos o de péptidos.

PE 1589024A1 y WO2004074300A2 también describen grupos protectores fotoescindibles.

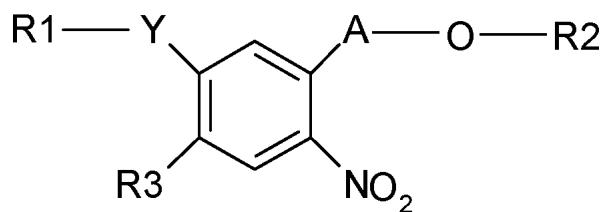
5

Por consiguiente, el objeto de la presente invención es la provisión de PLPG, que no muestran los inconvenientes de la técnica anterior mencionados anteriormente. Por lo tanto, se presentan en este documento PLPG, que son adecuadas para la desprotección de los grupos funcionales utilizando la luz visible. En consecuencia, se pueden utilizar fuentes de luz inofensivas y rentables, así como elementos ópticos habituales para la fotolitografía basada en la síntesis de oligonucleótidos y péptidos.

10 Breve descripción de la invención

15 En un primer aspecto, la invención se refiere a grupos protectores fotolábiles que contienen un cromóforo diarilsulfuro que tiene la fórmula general

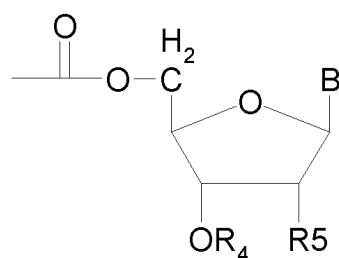
[Fórmula Ib]



20 en el que Y es S y

A se selecciona entre el grupo que consiste en -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH(CH₃)-CH₂-, y R1 es un grupo heteroarilo o arilo sustituido o no sustituido, y R3 es H, un grupo metilo o un grupo etilo, y en el que R2 es H, forma una fosforamidita, H-fosfonato o triéster fosfato, o en el que R2 es

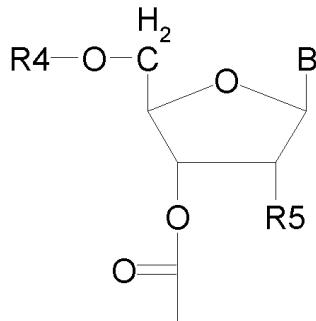
[Fórmula II]



25

o en el que R2 es

[Fórmula III]

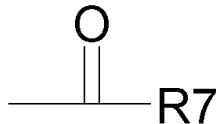


30 En el que R4 es H, o OR4 forma una fosforamidita, H-fosfonato o triéster de fosfato y en el que R5 es H, OH, un halógeno o XR6, en donde X es O o S y R6 es H, un grupo alquilo, grupo arilo, o OR6 forma una fosforamidita, fosfodiéster, fosfotriéster o H-fosfonato o una porción de acetal o de silicona, y en el que B se selecciona entre el grupo que consiste en adenina, citosina, guanina, timina, uracilo, 2,6-diaminopurina-9-ilo, hipoxantina-9-ilo, 5-

metilcitosinil-1-ilo, 1-ilo del ácido 5-amino-4-imidazolcarboxílico amida-3-ilo del ácido 5-amino-4-imidazolcarboxílico, en el que cuando B es adenina, citosina o guanina el grupo amino primario tiene opcionalmente un grupo protector o cuando B es timina o uracilo en la posición O4 es opcionalmente un grupo protector, o en el que R2 es

5

[Fórmula IV]



en el que R7 es un aminoácido natural, un aminoácido no natural o un derivado de aminoácido formando un enlace uretano con la fórmula Ib o en el que la fórmula IV representa la función carboxi de un aminoácido natural, un aminoácido no natural o un derivado de aminoácido, formando un enlace éster en la fórmula Ib.

10

R1 es preferiblemente un grupo fenilo, un grupo terc-butil-fenilo, un grupo 1- o 2-naftilo, un grupo 2-piridilo un grupo aminofenilo, un grupo N –alquilaminofenilo, un grupo N-acilaminofenilo, un grupo carboxifenilo, un éster o una amida fenilcarboxílico, y / o preferiblemente A es -CH(CH₃)-CH₂- y / o R2 es una fosforamidita o -P (OCH₂CH₂CN) (NiPr₂) y / o R4 preferiblemente es H y / o R5 es preferiblemente H y / o R7 es preferiblemente un aminoácido natural. B se selecciona entre el grupo que consiste en adenina, citosina, guanina, timina o uracilo, más preferiblemente cuando B es adenina, citosina o guanina el grupo protector es fenoxiacetilo-, 4-terc-butil-fenoxiacetilo-, 4-isopropil-fenoxiacetilo- o residuos dimetilformamidino-, cuando B es adenina el grupo protector es benzoilo o residuos p-nitrofenil-etoxi-carbonilo (p-NPOC), cuando B es guanina el grupo protector es isobutiroilo-, p-nitrofeniletilo (p -NPE) o residuos p-NPEOC y cuando B es citosina el grupo protector es benzoilo, isobutirilo- o residuos p-NPEOC-.

15

20 Los compuestos de la presente invención se pueden usar para una variedad de aplicaciones diferentes. En un aspecto, la invención se refiere al uso de los compuestos como grupos protectores fotoactivables utilizando fotolitografía sin máscara. En una realización, los compuestos se usan para la síntesis de array de DNA basado en fotolitografía sin máscara como grupo protector OH intermedios o permanentes en derivados de nucleósidos en el extremo 3'-OH o el extremo 5'-OH. Además, los compuestos se usan para la síntesis de array de péptidos basado fotolitografía sin máscara como grupo NH-protector en aminoácidos. En otra realización, los compuestos se usan para la síntesis de array de péptidos basado en fotolitografía sin máscara como grupo protector COOH- en aminoácidos y / o para la síntesis basada en la fotolitografía sin máscara de hidratos de carbono como grupo protector de OH-y / o para estrategia de grupo protector ortogonal como grupo protector SH-. En otra realización, los compuestos se usan para la fotolitografía sin máscara que tiene una longitud de onda de 374 a 405 nm, preferiblemente de 390 nm.

25

30 Los compuestos de la presente invención se pueden usar para una variedad de aplicaciones diferentes. En un aspecto, la invención se refiere al uso de los compuestos como grupos protectores fotoactivables utilizando fotolitografía sin máscara. En una realización, los compuestos se usan para la síntesis de array de DNA basado en fotolitografía sin máscara como grupo protector OH intermedios o permanentes en derivados de nucleósidos en el extremo 3'-OH o el extremo 5'-OH. Además, los compuestos se usan para la síntesis de array de péptidos basado fotolitografía sin máscara como grupo NH-protector en aminoácidos. En otra realización, los compuestos se usan para la síntesis de array de péptidos basado en fotolitografía sin máscara como grupo protector COOH- en aminoácidos y / o para la síntesis basada en la fotolitografía sin máscara de hidratos de carbono como grupo protector de OH-y / o para estrategia de grupo protector ortogonal como grupo protector SH-. En otra realización, los compuestos se usan para la fotolitografía sin máscara que tiene una longitud de onda de 374 a 405 nm, preferiblemente de 390 nm.

35

35 En otro aspecto, la invención está dirigida a un método para la síntesis de un esqueleto de diarilsulfuro que contiene un grupo protector fotolábil como se describe anteriormente que comprende los pasos de

40

- a) Provisión de p-dietilbenceno como material de partida
- b) La bromación del anillo de fenilo
- c) La nitración del compuesto obtenido en ácido sulfúrico y nítrico en la posición para- del bromo
- d) Purificación y cristalización
- e) La hidroximetilación del compuesto en la posición bencílica
- f) La conversión del grupo de bromo aromático al arilsulfuro usando tiofenol
- g) La purificación
- h) Conversión del alcohol a clorocarbonato
- i) La reacción del clorocarbonato con un nucleósido y la reacción del nucleósido con un agente de fosfitilación, o
- 55 La reacción del clorocarbonato con un derivado de aminoácido.

50

En una realización, R1 es un grupo fenilo, un grupo terc-butil-fenilo, un grupo 1- o 2-naftilo-, un grupo 2-piridilo, A es -CH(CH₃)-CH₂- y R3 es H o un grupo etilo.

55

60 Figuras

Figura 1: se muestran las vidas medias de el PLPG de acuerdo con la invención en dependencia del disolvente utilizado en una longitud de onda de 390 nm. La exposición a la luz se realizó durante 2, 4, 6 s o 2, 4, 6, 8 s o 2, 4, 6, 8, 12 s, respectivamente.

5 Figura 2: se muestran las vidas medias de el PLPG de acuerdo con la invención en dependencia del disolvente utilizado en una longitud de onda de 404 nm. La exposición a la luz se realizó durante 1, 2, 3, 4 min o 1, 2, 3, 5 min, respectivamente.

10 Figura 3: características de absorción UV de PLPG.

10 Figura 4: vías de síntesis de disulfuro-PLPG-aminoácidos.

15 Figura 5: vías de síntesis de disulfuro-PLPG-nucleótidos.

15 Figura 6: vías de síntesis de PLPG adicionales de acuerdo con la invención.

Figura 7: ruta de síntesis alternativa de PLPG sin más sustituyentes alquilo.

20 Figura 8: Exploración de microarray de una matriz de péptidos que contiene la secuencia diana de un anticuerpo anti-V5 sintetizado de acuerdo con la invención usando disulfuro-PLPG-aminoácidos.

Descripción detallada de la invención

25 Las siguientes definiciones se exponen para ilustrar y definir el significado y alcance de varios términos usados para describir la presente invención.

El término "no sustituido" se usa en el presente documento como es conocido por el experto experto en la técnica y se refiere a una cadena hidrocarbonada que consiste completamente de carbono e hidrógeno.

30 El término "sustituido" se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a un reemplazo de un grupo químico o sustituyente (típicamente H o OH) con un grupo funcional, y grupos funcionales particularmente contemplados incluyen grupos electrófilos (por ejemplo, C(O)-OR, C(X)-OH, etc.), nucleofílicos (por ejemplo, -NH2, -OH, -SH, -NC, etc.), grupos iónicos (por ejemplo, -NH3-), grupos polares (por ejemplo, -OH), grupos no polares (por ejemplo, arilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, etc.), y halógenos (por ejemplo, -F, -Cl), y combinaciones de los mismos.

35 El término "grupo protector" se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a un sustituyente, grupo funcional, ligando, o similar, que está unido (por ejemplo, a través de enlace covalente, enlace iónico, o complejo) a un grupo funcional potencialmente reactivo y evita que el grupo funcional potencialmente reactivo reaccione bajo ciertas condiciones de reacción. Grupos funcionales reactivos potenciales incluyen, por ejemplo, aminas, ácidos carboxílicos, alcoholes, dobles enlaces, y similares. Grupos de acuerdo con la invención protectores son grupos protectores fotolábiles, que incluyen, pero no se limitan a, 2-Nitrobenciloglicarbonilo-(NBOC), 2-nitrofenil-etiloxicarbonilo (NPEOC), 2-(3,4-metilendioxi-2-nitrofenil)-propiloxicarbonilo (MeNPPOC), 2-(3,4-metilendioxi-2-nitrofenil)-oxicarbonilo (MeNPOC), 2-(2-nitrofenil)-propiloxicarbonilo (NPPOC), dimetoxi-benzo-inil-oxicarbonilo (DMBOC), 2-(2-nitrofenil)-etilsulfonilo (NPES), (2-nitrofenil)-propilsulfonilo (NPPS), y similares.

40 El término "arilo" se usa en el presente documento como es conocido por el experto experto en la técnica y se refiere a un residuo aromático que consiste únicamente en átomos de hidrógeno y carbono, tales como residuos fenilo (C_6H_5-), naftilo ($C_{10}H_7-$) pirenilo- o antracenilo ($C_{14}H_9-$). El arilo puede estar sustituido o no sustituido con, por ejemplo grupos alquilo, tales como metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, o terc-butilo, o alcoxi tal como metoxi o etoxi o isopropoxi átomos de halógeno, tales como bromuro, cloruro, o fluoruro.

45 El término "heteroarilo" se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a un grupo aromático cíclico que tiene cinco o seis átomos en el anillo en el que al menos un átomo del anillo se selecciona entre el grupo constituido por oxígeno, azufre, y nitrógeno, y los átomos restantes del anillo son carbono. El anillo heteroaromático puede formar un sistema heteroaromático fusionado junto con otros anillos arilo o heteroarilo tales como benzotifeno, bencimidazol, pteridina o aloxazina.

50 El término "alquilo" se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a un residuo univalente que consiste solamente de átomos de carbono e hidrógeno. Los alquilos forman series homólogas con la fórmula general C_nH_{2n+1} . El alquilo puede ser un alquilo lineal o ramificado, por ejemplo, el alquilo puede ser un alquilo secundario que está ramificado con el átomo de carbono central unido a dos residuos de carbono o un alquilo terciario que está ramificado con el átomo de carbono central unido a tres residuos de carbono.

- 5 La letra A en el grupo -AO- representa un "enlazante de fragmentación" que comprende de 1 a 2 átomos linealmente conectados de forma covalente tales como metileno o etileno. El término "enlazante de fragmentación" se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a una porción que se utiliza como una porción en la fotoquímica que efectúa la fisión inducida por la luz del PLPG mediante la transformación del fotoproceso primario en una reacción de escisión química. Por consiguiente, en un primer aspecto el grupo divalente -A- se refiere a un grupo de unión que conecta el grupo funcional R2 con el cromóforo nitrofenilo. En una realización, la cadena de 1 a 2 átomos del grupo de unión A puede estar totalmente compuesto de átomos de hidrógeno y carbono en forma de una cadena de hidrocarburo sustituido o no sustituido, lineal o ramificado, saturado o insaturado.
- 10 10 La cadena hidrocarbonada también puede estar ramificada con uno o más grupos alquilo, donde el grupo alquilo puede ser metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, o terc-butilo.
- 15 15 Dicha cadena de hidrocarburo también puede estar sustituida por ejemplo, con átomos de halógeno. Por consiguiente, desde 1 átomo de hidrógeno a 3 átomos de hidrógeno de la cadena de hidrocarburo respectivo puede ser sustituido por ejemplo con halógeno.
- 20 20 El término "ramificado" en el contexto de la definición del grupo de enlace término se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a la presencia de una cadena lateral en la cadena principal de la molécula o porción. De acuerdo con esto, un grupo de enlace ramificado puede ser una cadena de hidrocarburo como se define anteriormente que tiene uno o más grupos alquilo como cadena lateral, en el que el grupo alquilo es metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, o de terc-butilo, preferiblemente un grupo metilo o etilo. En la cadena de hidrocarburo ramificado representado por A de uno a todos los átomos de carbono puede tener uno o más grupos alquilo como se ha definido anteriormente.
- 25 25 El término "saturado" en el contexto de la definición del grupo de enlace se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a un grupo de unión en el que todos los miembros del grupo están conectados al correspondiente átomo adyacente a través de enlaces simples. Por consiguiente, una cadena hidrocarbonada saturada está representado por la fórmula $-(CH_2)_n-$ siendo n un número entero comprendido entre 1 y 2.
- 30 30 El término "grupo funcional" se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a cualquiera de las numerosas combinaciones de átomos que forman partes de moléculas químicas, que sufren ellos mismos reacciones características, y que en muchos casos influyen en la reactividad del resto de la molécula. grupos funcionales típicos son hidroxilo, carboxilo, aldehido, carbonilo, amino, azida, alquinilo, tiol y nitrilo.
- 35 35 El término "soporte sólido" se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a cualquier material orgánico o inorgánico insoluble y rígido o semirígido, que tiene preferiblemente un área de superficie grande para que moléculas orgánicas puedan unirse a la superficie a través de la formación de enlaces o absorbidas a través de interacciones electrónicas o estáticas tales como a través de la formación de enlaces a través de un grupo funcional.
- 40 40 El término "biomolécula" se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a cualquier molécula orgánica que es producida por un organismo vivo o cualquiera de los derivados producidos artificialmente de tales compuestos, incluyendo grandes moléculas poliméricas tales como las proteínas, polisacáridos, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y oligonucleótidos, así como pequeñas moléculas tales como metabolitos primarios, metabolitos secundarios, y productos naturales.
- 45 45 El término "ácido nucleico" se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a una macromolécula compuesta de cadenas de nucleótidos monoméricos, en el que cada nucleótido consta de tres componentes: una base heterocíclica nitrogenada, que es o bien una purina o pirimidina; un azúcar pentosa; y un grupo fosfato.
- 50 50 El término "aminoácido natural" se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a uno de los 20 aminoácidos canónicos utilizados para la biosíntesis de proteínas, así como todos los aminoácidos que se pueden incorporar en las proteínas durante la traducción (incluyendo pirrolisina y selenocisteína). Los 20 aminoácidos canónicos incluyen histidina, alanina, valina, glicina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, glutamina, asparagina, treonina, arginina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, cisteína, metionina y lisina.
- 55 55 El término "aminoácido no natural" se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a compuestos orgánicos que no están entre los codificados por el código genético estándar o incorporados en las proteínas durante la traducción. Además, el término "aminoácido no natural" se refiere a compuestos orgánicos que no se producen naturalmente. Por lo tanto, los aminoácidos no naturales incluyen aminoácidos o análogos de aminoácidos, pero no se limitan a, los D-isoestereómeros de aminoácidos, citrulina, homocitrulina, homoarginina, hidroxiprolina, homoprolina, ornitina, 4-amino-fenilalanina, ciclohexilalanina, ácido α -

aminoisobutírico, N-metil-alanina, N-metil-glicina, norleucina, ácido N-metil-glutámico, tercbutilglicina, ácido α -aminobutírico, terc-butilalanina, ácido 2-aminoisobutírico, ácido α aminoisobutírico, ácido 2-aminoindano -2-carboxílico, selenometionina, deshidroalanina, lantionina, ácido γ -amino butírico, y sus derivados en el que el nitrógeno de la amina ha sido mono-o di-alquilado.

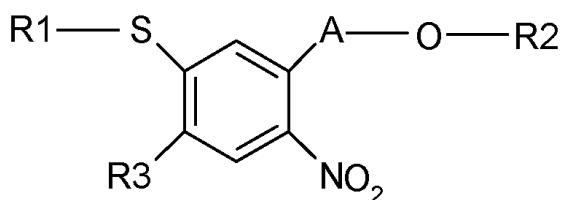
5 El término "péptido" se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a compuestos orgánicos hechos de aminoácidos dispuestos en una cadena lineal y unidos entre sí por enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de residuos de aminoácidos contiguos.

10 El término "grupo amino" se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a primario (-NH₂), secundario (-NHR₁), o terciario (-N R₁ R₂), y en forma catiónica, puede ser cuaternario (-N R₁ R₂ R₃). Ejemplos de grupos amino incluyen, pero no se limitan a, -NH₂, -NHCH₃, -NHC(CH₃)₂, -N(CH₃)₂ y -N(CH₂CH₃)₂. Los ejemplos de grupos amino cíclicos incluyen, pero no se limitan a, aziridino, azetidino, pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino, y tiomorfólico.

15 El término "fotolitografía sin máscara" se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a una técnica para la síntesis de microarrays de DNA o péptidos sin el uso de máscaras fotográficas. La fotolitografía sin máscara utiliza una matriz de elementos de conmutación ópticos que son individualmente direccionables y operables bajo el control de un programa informático. Ejemplos de tales elementos de conmutación ópticos son dispositivos de microespejos. Un dispositivo preferido de microespejo es el procesador de luz digital (DLP) de Texas Instruments, Inc.

20 La presente invención se refiere a un cromóforo diarilsulfuro que contiene PLPG que se puede utilizar para la síntesis de péptidos y oligonucleótidos basada en la fotolitografía que tiene la estructura

25 [Fórmula Ia]

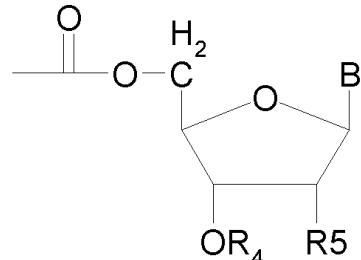


30 en el que A se selecciona entre el grupo que consiste en -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH(CH₃)-CH₂-, -CH₂-CH(alquilo, arilo) - y -CH(CH₃)-CH (alquilo, arilo)-

35 R1 es un grupo heteroarilo o arilo sustituido o no sustituido o un grupo heteroarilo o arilo condensado, y R3 es H, un grupo metilo o un grupo etilo, y

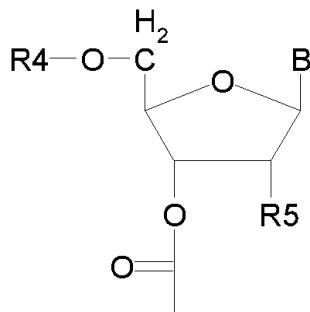
en el que R2 es

35 [Fórmula II]



o en el que R2 es

[Fórmula III]



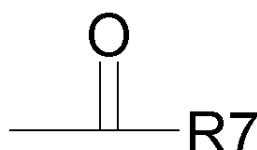
en el que R4 es H, un grupo alquilo, un grupo arilo, o OR4 forma una fosforamidita, H fosfonato o triéster de fosfato y

5 en el que R5 es H, OH, un halógeno o XR6, en donde X es O o S y R6 es un grupo alquilo, grupo arilo, o OR6 forma un grupo fosforamidita, fosfodiéster, fosfotriéster o H- fosfonato o un acetal o una porción de silicona y

10 en el que B se selecciona entre el grupo que consiste en adenina, citosina, guanina, timina, uracilo, 2,6-diaminopurina- 9-ilo, hipoxantina-9-ilo, 5-metilcitosinil-1-ilo, 1-ilo ácido 5-amino-4-imidazolcarboxílico o amida-3-ilo ácido 5-amino-4- imidazolcarboxílico, en el que cuando B es adenina, citosina o guanina el grupo amino primario tiene opcionalmente un grupo protector o cuando B es timina o uracilo en la posición O4 está opcionalmente un grupo protector,

15 o en el que R2 es

[Fórmula IV]



en el que R7 es un aminoácido natural, un aminoácido no natural o un derivado de aminoácido, incluyendo, pero no limitado a alfa- o beta-aminoácidos, formando un enlace uretano de fórmula Ia,

20 o cuando la fórmula IV representa la función carboxi de un aminoácido natural, un aminoácido no natural o un derivado de aminoácido, formando un enlace éster con la fórmula Ia, incluyendo, pero no limitado a α - o β -aminoácidos.

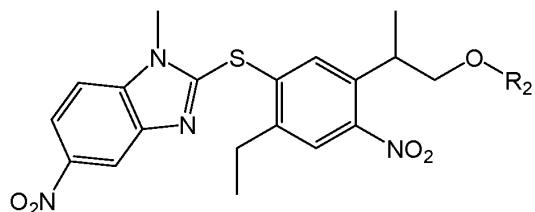
25 En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula Ia se utilizan, caracterizados porque R1 es un grupo fenilo, un grupo terc-butil-fenilo, un grupo 1- o 2-naftilo o un grupo 2- o 4-piridilo, A es $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$, R4 es H y R5 es H, R4 es H y R5 es OH o OSi(alquilo3).

30 En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula Ia se utilizan, caracterizados porque B se selecciona del grupo que consiste de adenina, citosina, guanina, timina, 5-metilcitosina o uracilo.

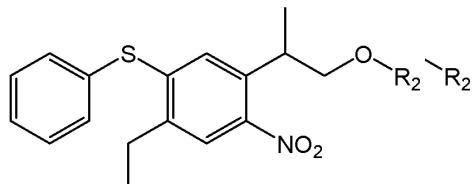
35 En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula Ia se utilizan, caracterizados porque, cuando B es adenina, citosina o guanina el grupo protector es fenoxiacetilo-, 4-terc-butil-fenoxiacetilo-, 4-isopropil-fenoxiacetilo- o residuos dimetilformamidino-, cuando B es adenina el grupo protector es un residuo benzoilo-, cuando B es guanina el grupo protector es un residuo isobutiroilo y cuando B es citosina el grupo protector es un residuo benzoilo- o isobutiroilo. En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula Ia se utilizan, caracterizados porque R7 es un aminoácido natural.

40 El cromóforo diarilsulfuro que contiene PLPG que se puede utilizar para la síntesis de oligonucleótidos y péptidos basada en fotolitografía preferentemente tienen las estructuras:

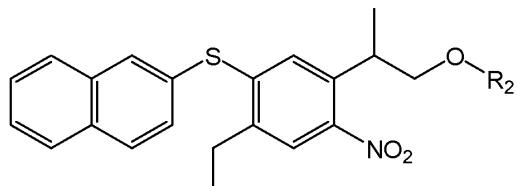
[Fórmula V]



[Fórmula VI]

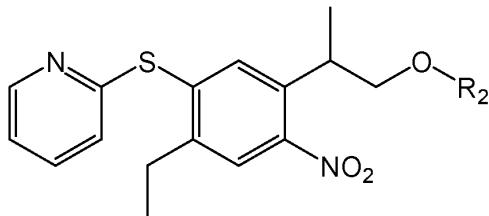


[Fórmula VII]

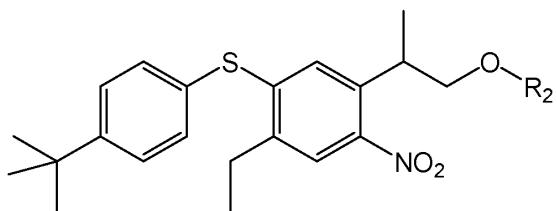


5

[Fórmula VIII]



[Fórmula IX]



10

La presente invención se refiere además al uso de los compuestos de acuerdo con la fórmula la como grupo protector fotoactivable usando fotolitografía sin máscara. En una realización de la invención se utilizan dispositivos de microespejo para realizar una exposición selectiva espacial de los microarrays de oligonucleótidos y péptidos a la luz visible con el fin de desproteger los nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, en las áreas expuestas durante el proceso de síntesis. La desprotección de los nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, conduce a la liberación del siguiente sitio de unión para el correspondiente siguiente nucleótido o aminoácido. El siguiente nucleótido o aminoácido que debe ser acoplado al sitio de enlace liberado dentro de las áreas específicas se añade simplemente por su disposición dentro de un disolvente además de un reactivo de activación que se vierte sobre la matriz. Esta estrategia se repite hasta que se obtienen los oligonucleótidos y oligopéptidos, respectivamente, de las longitudes y diseño deseadas. Con esta estrategia es posible producir microarrays de alta densidad de al menos 10.000 y preferiblemente 100.000 a 500.000 características por cm².

15

El PLPG acuerdo con la invención se puede eliminar mediante el uso de luz visible en un intervalo de 375 nm a 420 nm, preferiblemente en el intervalo desde 390 hasta 405 nm. Más preferidas para la desprotección son las longitudes de onda de 390 nm y 404 nm, respectivamente. Ambas longitudes de onda se pueden generar utilizando fuentes de luz que son mucho menos caras en comparación con fuentes de luz necesarias para llevar a cabo la

20

25

- desprotección en el rango UV cercano a aproximadamente 365 nm. Preferiblemente, los láseres de estado sólido dentro del intervalo de 375 nm a 420 nm, preferiblemente 390 nm y 404 nm, se utilizan como fuentes de luz para eliminar el PLPG acuerdo con la invención. Más preferiblemente, los LED (diodos emisores de luz) con emisión suficiente en el intervalo de 375 nm a 420 nm, preferiblemente 390 nm y 404 nm, se utilizan como fuentes de luz para eliminar el PLPG acuerdo con la invención. Especialmente los LED son productos de bajo coste, ya que se producen en cantidades altas, por ejemplo, para el uso en reproductores Blu-ray.
- En una realización adicional se utilizan dispositivos de microespejo, que están optimizados para el uso de la luz visible en el intervalo de 375 nm a 420 nm, preferiblemente en el intervalo de 390 a 410 nm, más preferiblemente entre 390 nm y 404 nm, respectivamente. En una realización adicional, el revestimiento de los dispositivos de microespejo permanecen en los dispositivos con el fin de ser utilizados con la luz visible. Los dispositivos que se utilizan para los rayos UV o cerca de la luz UV tienen que ser optimizados para ese propósito, es decir, el revestimiento sobre los elementos de microespejo tienen que eliminarse mediante pulido.
- En otra realización, las pantallas LCD o un divisor de haz se pueden utilizar como máscaras virtuales entre la fuente de luz y el área de síntesis.
- La síntesis fotolitográfica de los oligonucleótidos y péptidos, respectivamente, se puede realizar sobre un soporte, preferiblemente un soporte sólido. El soporte puede estar hecho de cualquier material conocido por la persona experta utilizado para tal propósito, preferiblemente, el soporte está hecho de plástico, silicio, carbono de diamante o vidrio. Más preferiblemente, se utiliza plástico o vidrio como un soporte, mucho más preferido como material es la poliolefina de calidad óptica o portaobjetos de vidrio de calidad para microscopio óptico. El soporte se puede proporcionar en cualquier forma, tal como perlas, geles, membranas, placas, portaobjetos o chips preferiblemente. El soporte puede ser transparente o no transparente, preferiblemente el soporte presenta al menos un 30%, preferiblemente al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 90% de transmisión de luz a una longitud de onda de entre 375 nm y 410 nm.
- El PLPG de acuerdo con la invención se puede utilizar en cualquier proceso para la síntesis de oligonucleótidos conocido por la persona experta en donde son necesarios nucleósidos o nucleótidos protegidos. Preferiblemente, los PLPG-nucleótidos como se describe aquí pueden ser utilizados para la síntesis de oligonucleótidos en solución, más preferiblemente los PLPG-nucleótidos como se describe aquí se puede utilizar para la síntesis de oligonucleótidos en un soporte sólido. La síntesis se puede realizar por cualquier método estándar conocido en el estado de la técnica. Más preferiblemente, la síntesis se puede realizar mediante el uso de técnicas fotolitográficas, tales como técnicas sin máscara en el que un dispositivo de microespejo se utiliza para exponer a la luz características espaciales seleccionadas en un microarray como se explicó anteriormente.
- Disolventes conocidos por el experto en la materia se pueden utilizar durante la síntesis de oligonucleótidos, tal como acetonitrilo.
- El PLPG asociado a los nucleósidos o nucleótidos para la síntesis de oligonucleótidos se puede utilizar en una concentración dentro de los disolventes de 1 mmol/L a 100 mmol/L. Preferiblemente, en una concentración de 10 mmol/L a 40 mmol/L. Más preferiblemente, los PLPG-nucleótidos se pueden utilizar en una concentración de 25 mmol/L.
- El PLPG asociado a los nucleósidos o nucleótidos puede ser utilizado en conexión con agentes sensibilizadores conocidos por el experto en la materia, que aumentan la eficacia de la reacción de desprotección. Como agentes sensibilizantes pueden ser especialmente utilizados benzofenona, derivados de tioxantona y xantona, como por ejemplo, tioxanten-9-ona, alquiltioxanten-9-onas, como por ejemplo isopropiltioxanten-9-ona, 2-etyltiltioxanten-9-ona, 2-cloro-tioxanten-9-ona, 1,4-dimetoxitioxanten-9-ona.
- Los microarrays de oligonucleótidos se pueden utilizar para una variedad de propósitos, incluyendo pero no limitado a la captura de secuencias, la hibridación genómica comparativa (CGH), análisis de CHIP-chip, el análisis de la metilación del DNA, el análisis de la expresión génica y la secuenciación comparativa del genoma.
- En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula la se utilizan en la síntesis de array de DNA basado en fotolitografía sin máscara como grupo protector OH intermedio o permanente en derivados de nucleósidos en el extremo 3'-OH o el extremo 5'-OH como éster de carbono, en el que la síntesis se puede realizar en dirección 3'-5' o en dirección 5'-3'.
- Si el PLPG se encuentra en el extremo 5', el nucleótido lleva un grupo fosforamidita en su extremo 3', que puede hacerse reaccionar con un grupo -OH libre en el soporte sólido para formar un oligonucleótido alargado estable. Despues de sintetizar todos los oligonucleótidos, todos los PLPG se eliminan y el oligonucleótido todavía unido al soporte sólido tiene un 5'-OH libre.
- Sin embargo, si el PLPG se encuentra localizada en el extremo 3', el nucleótido lleva un grupo fosforamidita en su extremo 5', que puede hacerse reaccionar con cualquier grupo -OH libre en el soporte sólido para formar un

oligonucleótido alargado estable. Después de todo se sintetizan todos los oligonucleótidos, todos los PLPG se eliminan y el oligonucleótido todavía unido al soporte sólido tiene un 3'-OH libre.

5 Mientras que ambos tipos de inmovilización permiten los ensayos basados en la hibridación, sólo los oligonucleótidos que exhiben un 3'-OH libre pueden ser utilizados en reacciones enzimáticas para la detección, el etiquetado, tapado o elongamiento por ligación o polimerización enzimática. El PLPG de acuerdo con la invención

10 además puede utilizarse en cualquier proceso para la síntesis de péptidos conocida por la persona experta en donde son necesarios aminoácidos protegidos. Los aminoácidos utilizados pueden ser aminoácidos no naturales, derivados de aminoácidos y los aminoácidos preferentemente naturales. Preferiblemente, el PLPG como se describe aquí se

15 puede utilizar para la síntesis de oligopéptidos en solución, más preferiblemente el PLPG como se describe en el

presente documento pueden ser utilizado para la síntesis de oligopéptidos sobre un soporte sólido. La síntesis se

puede realizar por cualquier método estándar conocido en el estado de la técnica. Más preferiblemente, la síntesis se

puede realizar mediante el uso de técnicas fotolitográficas, tales como técnicas donde se utiliza un dispositivo de

microespejo para exponer a la luz visible características espaciales seleccionadas en un microarray como se explicó

anteriormente.

Se ha demostrado que la reacción de desprotección depende del disolvente utilizado durante el proceso de síntesis de péptidos. Los disolventes conocidos por el experto en la materia se pueden utilizar durante la síntesis de péptidos. Preferiblemente, los disolventes polares como dimetilsulfóxido (DMSO), N-metil-pirrolidona (NMP), acetonitrilo (MeCN) o isopropanol pueden ser utilizados. Dichos disolventes pueden contener ciertos aditivos, preferiblemente imidazol, hidroxilamina y agua. El imidazol se puede añadir a concentraciones de 0,1% a 3% (v/v), preferiblemente de 0,5% a 1,5% (v/v), el imidazol se puede añadir más preferiblemente a una concentración de 1% (v/v). La hidroxilamina se puede añadir a concentraciones de 0,1% a 3% (v/v), preferiblemente de 0,2% a 1% (v/v), más preferiblemente de hidroxilamina se puede añadir a una concentración de 1% (v/v). Se puede añadir agua a concentraciones de 0,1% a 20% (v/v), preferiblemente de 1% a 17% (v/v), más preferiblemente se puede añadir agua a una concentración de 1% (v/v). Los más preferidos como disolventes son DMSO, DMSO + 1% imidazol, NMP + 0,5% de hidroxilamina, MeCN + 1% H₂O, MeCN + 1% H₂O + 1% imidazol, isopropanol + 1% imidazol, isopropanol + 12% H₂O + 1% imidazol.

30 El PLPG asociado a los aminoácidos para la síntesis de péptidos se puede utilizar en una concentración dentro de los disolventes de 0,1 mmol/L a 0,5 mmol/L. Preferiblemente, en una concentración de 0,2 mmol/L a 0,4 mmol/L. Más preferiblemente, el PLPG se puede utilizar en una concentración de 0,3 mmol/L.

35 El PLPG asociado a los aminoácidos se puede utilizar en conexión con agentes sensibilizadores conocidos por el experto en la materia, que aumentan la eficacia de la reacción de desprotección.

40 Los microarrays de oligopéptidos se pueden utilizar para una variedad de propósitos, incluyendo pero no limitado a la selección de bibliotecas de anticuerpos, análisis cuantitativo o cualitativo de muestras biológicas, el descubrimiento de biomarcadores, el enriquecimiento de proteínas escasas, el agotamiento de las proteínas muy abundantes, el análisis de interacciones proteína-proteína, análisis de interacciones DNA-proteína o interacciones RNA-proteína.

45 En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula la se utilizan para la síntesis de arrays de péptido basado en fotolitografía sin máscara como el grupo NH-protector en aminoácidos como uretano. El PLPG se utiliza como ácido libre NH bloqueado, éster activado, halogenuro de ácido, anhídrido, intermolecular o intramolecular como N-carboxi-anhídrido (NCA).

50 En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula la se utilizan para la síntesis de arrays de péptido basado en fotolitografía sin máscara como grupo COOH-protector en aminoácidos como éster para la síntesis en dirección inversa.

55 El PLPG según la invención puede además utilizarse en cualquier proceso conocido por el experto en la materia en donde son necesarios azúcares protegidos. Los azúcares utilizados pueden ser compuestos, tales como aldohexosas y aldopentosas. Preferiblemente, el PLPG como se describe aquí se puede utilizar para la síntesis de hidratos de carbono, glicoproteínas y proteoglicanos en solución, más preferiblemente el PLPG como se describe en el presente documento puede ser utilizados para la síntesis de hidratos de carbono, glicoproteínas y proteoglicanos sobre un soporte sólido. La síntesis se puede realizar por cualquier método estándar conocido en el estado de la técnica. Más preferiblemente, la síntesis se puede realizar mediante el uso de técnicas fotolitográficas, tales como técnicas donde se utiliza un dispositivo de microespejo para exponer a la luz visible características espaciales seleccionadas en un microarray como se explicó anteriormente.

60 Los microarrays de hidratos de carbono se pueden utilizar para una variedad de propósitos, incluyendo pero no limitados a análisis de interacciones sacáridos-proteína, análisis de alto rendimiento de proteínas y células, análisis de glicanos y sus interacciones moleculares,

En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula Ia se utilizan para la síntesis basada en la fotolitografía sin máscara de hidratos de carbono, glicoproteínas, proteoglicanos, y similares, como el grupo protector de OH como éter.

5 En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula Ia se utilizan como grupo SH-protector para estrategias ortogonales como éter, éster o tiocarbonato.

10 En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula Ia se utilizan como grupos fotoactivables para la liberación de la protección de una estructura biológicamente activa para la iniciación de una reacción de la 15 polimerasa o una conversión bioquímica dependiente de ATP.

La presente invención se refiere además al uso del compuesto según la fórmula Ia, caracterizado por el hecho de que la luz se utiliza para la fotolitografía sin máscara que tiene una longitud de onda de 375 a 405 nm, preferiblemente de 390 nm.

15 La presente invención se refiere además a un método para producir el esqueleto diarilsulfuro que contiene PLPG que se puede utilizar para la síntesis de oligonucleótido y péptido basado en de fotolitografía, en el que el método comprende los siguientes pasos:

20 a) proporcionar como material de partida p-dietilbenceno.
b) La bromación del anillo de fenilo en una posición por la acción de bromo molecular y la purificación por destilación.

c) La nitración del compuesto obtenido en ácido sulfúrico y nítrico en la posición para- del bromo y el aislamiento y la purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice y cristalización.

25 d) La hidroximetilación del compuesto por la acción de para-formaldehído en DMSO y Tritón B en la posición bencílica.

e) La conversión del grupo bromo aromático al sulfuro de arilo por acción del tiofenol apropiado, tionaftol etc carbonato de potasio en DMF y cantidades catalíticas de sal de cobre (II) y la purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice.

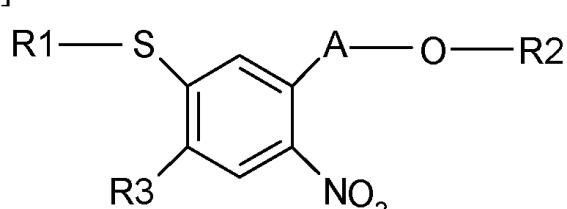
30 f) Conversión del alcohol anterior a clorocarbonato por la acción de trifosgeno en THF y trietilamina.
g) La reacción del clorocarbonato con el nucleósido adecuado y haciendo reaccionar adicionalmente el nucleósido con un agente de fosfilitación en la fosforamidita apropiada, o reacción del clorocarbonato con el derivado de aminoácido apropiado.

35 [Los siguientes ejemplos se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos expuestos sin apartarse del espíritu de la invención.

Otras formas de realización se incluyen los siguientes elementos:

40 1. Un compuesto de la fórmula

[Fórmula Ia]



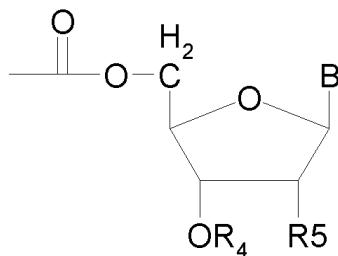
45 en el que A se selecciona entre el grupo que consiste en -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH(CH₃)-CH₂-, y

R1 es un grupo heteroarilo o arilo sustituido o no sustituido, y R3 es H, un grupo metilo o un grupo etilo, y

en el que R2 es

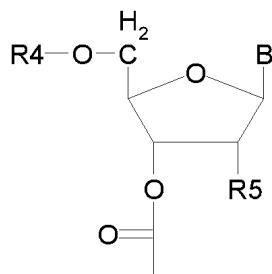
50

[Fórmula II]



o en el que R2 es

[Fórmula III]



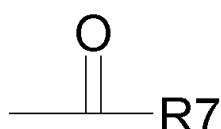
5

el que R4 es H, forma una fosforamidita, H fosfonato o triéster de fosfato y

- 10 en el que R5 es H, OH, un halógeno o XR6, en donde X es O o S y R6 es H, un grupo alquilo, grupo arilo, o OR6 forma una porción fosforamidita, fosfodiéster, fosfotriéster, H-fosfonato o un acetal o porción de silicona y
- 15 en el que B se selecciona entre el grupo que consiste en adenina, citosina, guanina, timina, uracilo, 2,6-diaminopurina-9-ilo, hipoxantina-9-ilo, 5-metilcitosinil-1-ilo, 1-ilo ácido 5-amino-4-imidazolcarboxílico o amida-3-ilo ácido 5-amino-4-imidazolcarboxílico, en el que cuando B es adenina, citosina o guanina el grupo amino primario tiene opcionalmente un grupo protector o cuando B es timina o uracilo en la posición O4 está opcionalmente un grupo protector,

o en el que R2 es

[Fórmula IV]



20

en el que R7 es un aminoácido natural, un aminoácido no natural o un derivado de aminoácido formando un enlace uretano de fórmula Ia, o

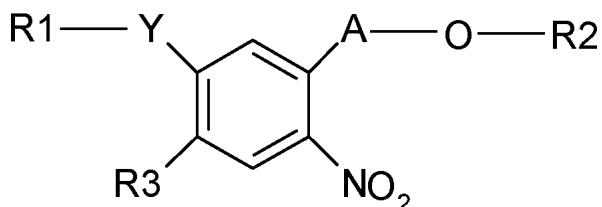
- 25 cuando la fórmula IV representa la función carboxi de un aminoácido natural, un aminoácido no natural o un derivado de aminoácido, formando un enlace éster con la fórmula Ia.
- 30 2. El compuesto de acuerdo con el punto 1, que se caracteriza en que R1 es un grupo fenilo, un grupo terc-butilfenilo, un grupo 1- o 2-naftilo o un grupo 2-piridilo.
3. El compuesto de acuerdo con el punto 1 ó 2, que se caracteriza en que A es -CH(CH3)-CH2-.
4. El compuesto de acuerdo con los puntos 1 a 3, que se caracteriza en que R3 es H o un grupo etilo.
- 35 5. El compuesto de acuerdo con los puntos 1 a 4, que se caracteriza en que R4 es H y R5 es H.
6. El compuesto de acuerdo con los puntos 1 a 5, que se caracteriza en que B se selecciona del grupo que consiste de adenina, citosina, guanina, timina o uracilo.

7. El compuesto de acuerdo con los puntos 1 a 6, caracterizado porque, cuando B es adenina, citosina o guanina el grupo protector es fenoxiacetilo-, 4-terc-butil-fenoxiacetilo-, residuos 4-isopropil-fenoxiacetilo- o dimetilformamidino-, cuando B es adenina el grupo protector es benzoilo o residuos p-nitro-fenil-etoxy-carbonilo (p-NPPOC), cuando B es guanina el grupo protector es isobutiroilo-, p-nitrofeniletilo (p-NPE) o residuos p-NPEOC- y cuando B es citosina el grupo protector es benzoilo, isobutirilo- o residuos p-NPEOC.
8. El compuesto de acuerdo con los puntos 1 a 4, que se caracteriza en que R7 es un aminoácido natural.
10. El uso del compuesto de acuerdo con los puntos 1 a 8 como grupo protector fotoactivable utilizando fotolitografía sin máscara.
15. 10. El uso del compuesto de acuerdo con el punto 7 para la síntesis de array de DNA basado en fotolitografía sin máscara como grupo protector de OH intermedio o permanente en derivados de nucleósidos en el extremo 3'-OH o el extremo 5'-OH.
11. El uso del compuesto de acuerdo con el punto 8 para la síntesis de array de péptidos basado en fotolitografía sin máscara como el grupo NH-protector en aminoácidos.
20. 12. El uso del compuesto de acuerdo con el punto 8 para la síntesis de array de péptidos basado en fotolitografía sin máscara como el grupo COOH-protector en aminoácidos.
25. 13. El uso del compuesto de acuerdo con el punto 8 para la síntesis basada en la fotolitografía sin máscara de hidratos de carbono como el grupo protector de OH.
30. 14. El uso del compuesto de acuerdo con el punto 8 para protectores ortogonales estrategia de grupo como grupo SH-protector.
35. 15. El uso del compuesto de acuerdo con los puntos 8 a 13, caracterizado en que la luz se utiliza para la fotolitografía sin máscara que tiene una longitud de onda de 374 a 405 nm, preferiblemente de 390 nm.
40. 16. Un método para preparar un esqueleto diarilsulfuro que contiene un grupo protector fotolábil de acuerdo con uno de los puntos 1 a 8, que comprende los pasos de
- a) Provisión de p-dietilbenceno como material de partida
- b) La bromación del anillo de fenilo
- c) La nitración del compuesto obtenido en ácido sulfúrico y nítrico en la posición para- del Bromo
- d) Purificación y cristalización
- e) La hidroximetilación del compuesto en la posición bencílica
- f) La conversión del grupo bromo aromático al arilsulfuro usando tiofenol
- g) Purificación
- h) Conversión del alcohol en clorocarbonato
- i) La reacción del clorocarbonato con un nucleósido y la reacción del nucleósido con un agente de fosfitilación, o reacción del clorocarbonato con un derivado de aminoácido.
45. 17. El método de acuerdo con el punto 16, que se caracteriza en que R1 es un grupo fenilo, un grupo terc-butilfenilo, un grupo 1- o 2-naftilo o un grupo 2-piridilo.
50. 18. El método de acuerdo con el punto 16 o 17, que se caracteriza en que A es $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$.
19. El método de acuerdo con el punto 16 a 18, que se caracteriza en que R3 es H o un grupo etilo.

La presente descripción se refiere además a un cromóforo de diarilsulfuro que contiene PLPG que se puede utilizar para la síntesis de péptidos y oligonucleótido basada en la fotolitografía y que tiene la estructura

55

[Fórmula Ib]



en la que Y es S y

A se selecciona entre el grupo que consiste en -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH(CH₃)-CH₂-, -CH₂-CH(alquilo, arbolo)- y -CH(CH₃)-CH(alquilo, arbolo)-

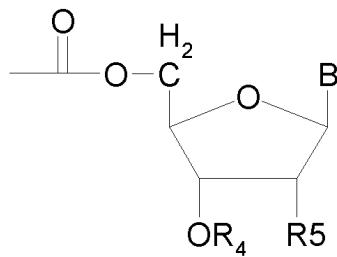
5

R1 es un grupo heteroarilo o arilo sustituido o no sustituido o un grupo heteroarilo o arilo condensado, y R3 es H, un grupo metilo o un grupo etilo, y en el que R2 es H, forma una fosforamidita, H-fosfonato o triéster fosfato, o

en el que R2 es

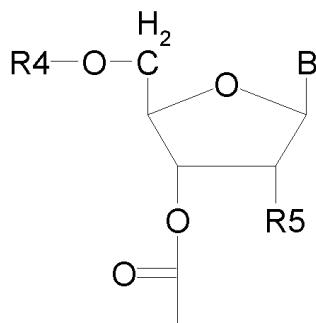
10

[Fórmula II]



o en el que R2 es

[Fórmula III]



15

En el que R4 es H, un grupo alquilo, grupo arilo, o OR4 forma una fosforamidita, H-fosfonato o triéster de fosfato y

20

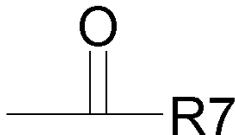
en el que R5 es H, OH, un halógeno o XR6, en el que X es O o S y R6 es un grupo alquilo, un grupo arilo, o OR6 forma una fosforamidita, fosfodiéster, fosfotriéster o H-fosfonato o una porción de acetal o de silicona, y

25

en el que B se selecciona entre el grupo que consiste en adenina, citosina, guanina, timina, uracilo, 2,6-diaminopurina-9-ilo, hipoxantina-9-ilo, 5- metilcitosinil-1-ilo, 1-ilo del ácido 5-amino-4-imidazolcarboxílico amida-3-ilo del ácido 5-amino-4-imidazolcarboxílico, en el que cuando B es adenina, citosina o guanina el grupo amino primario tiene opcionalmente un grupo protector o cuando B es timina o uracilo en la posición O4 es opcionalmente un grupo protector,

o en el que R2 es

[Fórmula IV]



30

en el que R7 es un aminoácido natural, un aminoácido no natural o un derivado de aminoácido, incluyendo pero no limitado a, alfa- o beta- aminoácidos, formando un enlace uretano de fórmula Ib,

o en el que la fórmula IV representa la función carboxi de un aminoácido natural, un aminoácido no natural o un derivado de aminoácido, formando un enlace éster con la fórmula Ib, incluyendo, pero no limitado a, alfa- o beta-aminoácidos.

5 En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula Ib se utilizan, caracterizados porque R1 es un grupo fenilo, un grupo terc-butilo-fenilo, un grupo 1- o 2-naftilo, un grupo aminofenilo, un grupo N-alquilaminofenilo, un grupo N-acilaminofenilo, un grupo carboxifenilo, un éster fenilcarboxílico, una amida o un grupo 2- o 4-piridilo-, A es -CH₂(CH₃)-CH₂-, R2 es una fosforamidita o -P(OCH₂CH₂CN)(N-IPR₂), R3 es H o un grupo etilo, R4 es H y R5 es H, R4 es H y R5 es OH o OSi(Alquilo₃).

10 En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula Ib se utilizan, caracterizados porque B se selecciona del grupo que consiste de adenina, citosina, guanina, timina, 5-metilcitosina o uracilo.

15 En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula Ib se utilizan, caracterizados porque, cuando B es adenina, citosina o guanina el grupo protector es fenoxyacetilo-, 4-terc-butilo-fenoxyacetilo-, 4-isopropilo-fenoxyacetilo- o residuos dimetilformamidino-, cuando B es adenina el grupo protector es un residuo benzoilo, cuando B es guanina el grupo protector es un residuo isobutiroilo y cuando B es citosina el grupo protector es un residuo benzoilo o isobutiroilo.

20 En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula Ib se utilizan, caracterizados porque R7 es un aminoácido natural.

25 La presente descripción se refiere además al uso de los compuestos de acuerdo con la fórmula Ib como grupos protectores fotoactivables utilizando fotolitografía sin máscara. En una realización de la descripción se utilizan dispositivos de microespejo para realizar una exposición selectiva espacial de los microarrays de oligonucleótidos y péptidos a la luz visible con el fin de desproteger los nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, en las áreas expuestas durante el proceso de síntesis. La desprotección de los nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, conduce a la liberación del siguiente sitio de unión para el correspondiente siguiente nucleótido o aminoácido. El siguiente nucleótido o aminoácido que debe ser acoplado al sitio de enlace liberado dentro de las áreas específicas se añade simplemente por su disposición dentro de un disolvente además de un reactivo de activación que se vierte sobre la matriz. Esta estrategia se repite hasta que se obtienen los oligonucleótidos y oligopéptidos, respectivamente, de las longitudes y diseño deseadas. Con esta estrategia es posible producir microarrays de alta densidad de al menos 10.000 y preferiblemente 100.000 a 500.000 características por cm².

35 El PLPG acuerdo con la invención se puede eliminar mediante el uso de luz visible en un intervalo de 375 nm a 420 nm, preferiblemente en el intervalo de 390 a 405 nm. Más preferidos para la desprotección son las longitudes de onda de 390 nm y 404 nm, respectivamente. Ambas longitudes de onda se pueden generar utilizando fuentes de luz que son mucho menos caras en comparación con las fuentes de luz necesarias para llevar a cabo la desprotección en el rango UV cercano a aproximadamente 365 nm. Preferiblemente, se utilizan los láseres de estado sólido dentro del intervalo de 375 nm a 420 nm, preferiblemente 390 nm y 404 nm, como fuentes de luz para eliminar el PLPG de acuerdo con la descripción. Más preferiblemente, los LED (diodos emisores de luz) con emisión suficiente en el intervalo de 375 nm a 420 nm, preferiblemente 390 nm y 404 nm, se utilizan como fuentes de luz para eliminar el PLPG de acuerdo con la descripción. Especialmente los LED son productos de bajo coste, ya que se producen en cantidades altas, por ejemplo, para el uso en reproductores Blu-ray.

45 En una realización adicional se utilizan dispositivos de microespejo, que están optimizados para el uso de la luz visible en el intervalo de 375 nm a 420 nm, preferiblemente en el intervalo de 390 a 410 nm, más preferiblemente a 390 nm y 404 nm, respectivamente. En una realización adicional, el revestimiento de los dispositivos de microespejo permanecen en los dispositivos con el fin de ser utilizados con la luz visible. Los dispositivos que se utilizan para los rayos UV o cerca de la luz UV tienen que ser optimizados para ese propósito, es decir, el revestimiento sobre los elementos de microespejo tienen que eliminarse mediante pulido.

55 En otra realización, las pantallas LCD o un divisor de haz se pueden utilizar como máscaras virtuales entre la fuente de luz y el área de síntesis.

60 La síntesis fotolitográfica de los oligonucleótidos y péptidos, respectivamente, se puede realizar sobre un soporte, preferiblemente un soporte sólido. El soporte puede estar hecho de cualquier material conocido por el experto en la materia utilizada para tal propósito, preferiblemente, el soporte está hecho de plástico, silicio, carbono de diamante o vidrio. Más preferiblemente, se utiliza plástico o vidrio como un soporte, mucho más preferido como material de es la poliolefina de calidad óptica o un portaobjetos de vidrio de calidad para microscopio óptico. El soporte se puede proporcionar en cualquier forma, tal como perlas, geles, membranas, placas, portaobjetos o chips preferiblemente. El soporte puede ser transparente o no transparente, preferiblemente el soporte presenta al menos 30%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 90% de transmisión de luz a una longitud de onda entre 375 nm a 410 nm.

65

- El PLPG de acuerdo con la invención se puede utilizar en cualquier proceso para la síntesis de oligonucleótidos conocido por el experto en la materia en donde son necesarios nucleósidos o nucleótidos protegidos. Preferiblemente, los PLPG-nucleótidos como se describe aquí pueden ser utilizados para la síntesis de oligonucleótidos en solución, más preferiblemente los PLPG-nucleótidos como se describe aquí se puede utilizar para la síntesis de oligonucleótidos en un soporte sólido. La síntesis se puede realizar por cualquier método estándar conocido en el estado de la técnica. Más preferiblemente, la síntesis se puede realizar mediante el uso de técnicas fotolitográficas, tales como técnicas sin máscara en el que un dispositivo de microespejo se utiliza para exponer a la luz características espaciales seleccionadas en un microarray como se explicó anteriormente.
- 5 Los disolventes conocidos por el experto en la materia se pueden utilizar durante la síntesis de oligonucleótidos, tal como acetonitrilo.
- 10 El PLPG asociado a los nucleósidos o nucleótidos para la síntesis de oligonucleótidos se puede utilizar en una concentración dentro de los disolventes de 1 mmol/L a 100 mmol/L. Preferiblemente, en una concentración de 10 mmol/L a 40 mmol/L. Más preferiblemente, los PLPG-nucleótidos se pueden utilizar en una concentración de 25 mmol/L.
- 15 El PLPG asociado a los nucleósidos o nucleótidos puede ser utilizado en conexión con agentes sensibilizadores conocidos por el experto en la materia, que aumentan la eficacia de la reacción de desprotección. Como agentes sensibilizantes pueden ser especialmente utilizados benzofenona, derivados de xantona y tioxantona, como por ejemplo, tioxanten-9-ona, alquiltioxanten-9-onas, como por ejemplo isopropiltioxanten-9-ona, 2-etyltoxanten-9-ona, 2-cloro-tioxanten-9-ona, 1,4-dimetoxitioxanthen-9-ona.
- 20 Los microarrays de oligonucleótidos se pueden utilizar para una variedad de propósitos, incluyendo pero no limitado a la captura de secuencias, la hibridación genómica comparativa (CGH), análisis de CHIP-chip, el análisis de la metilación del DNA, el análisis de la expresión génica y la secuenciación comparativa del genoma.
- 25 En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula Ib se utilizan en la síntesis de array de DNA basado en fotolitografía sin máscara como producto grupo protector OH intermedio o permanente en derivados de nucleósidos en el extremo 3'-OH o el extremo 5'-OH como éster de carbono, en el que la síntesis se puede realizar en dirección 3'-5' o en dirección 5'-3'.
- 30 Si el PLPG se encuentra en el extremo 5', el nucleótido lleva un grupo fosforamidita en su extremo 3', que puede hacerse reaccionar con un grupo -OH libre en el soporte sólido para formar un oligonucleótido elongado estable. Después se sintetizan todos los oligonucleótidos, todos los PLPG se eliminan y el oligonucleótido todavía unido al soporte sólido tiene un 5'-OH libre.
- 35 Sin embargo, si el PLPG se encuentra en el extremo 3', el nucleótido lleva un grupo fosforamidita en su extremo 5', que puede hacerse reaccionar con cualquier grupo -OH libre en el soporte sólido para formar un oligonucleótido elongado estable. Después se sintetizan todos los oligonucleótidos, todos los PLPG se eliminan y el oligonucleótido todavía unido al soporte sólido tiene un 3'-OH libre.
- 40 Mientras que ambos tipos de inmovilización permiten los ensayos basados en la hibridación, sólo los oligonucleótidos que exhiben un 3'-OH libre pueden ser utilizados para reacciones enzimáticas para la detección, el etiquetado, tapado o elongamiento por ligación o polimerización enzimática.
- 45 El PLPG de acuerdo con la invención puede además utilizarse en cualquier proceso para la síntesis de péptidos conocida por el experto en la materia en donde son necesarios aminoácidos protegidos. Los aminoácidos utilizados pueden ser aminoácidos no naturales, derivados de aminoácidos y los aminoácidos preferentemente naturales. Preferiblemente, el PLPG como se describe aquí se puede utilizar para la síntesis de oligopéptidos en solución, más preferiblemente el PLPG como se describe en el presente documento puede ser utilizados para la síntesis de oligopéptidos sobre un soporte sólido. La síntesis se puede realizar por cualquier método estándar conocido en el estado de la técnica. Más preferiblemente, la síntesis se puede realizar mediante el uso de técnicas fotolitográficas, tales como técnicas donde se utiliza un dispositivo de microespejo para exponer a la luz visible características espaciales seleccionadas en un microarray como se explicó anteriormente.
- 50 Se ha demostrado que la reacción de desprotección depende del disolvente utilizado durante el proceso de síntesis de péptidos. Los disolventes conocidos por el experto en la materia se pueden utilizar durante la síntesis de péptidos. Preferiblemente, los disolventes polares como dimetilsulfóxido (DMSO), N-metil-pirrolidona (NMP), acetonitrilo (MeCN) o isopropanol pueden ser utilizados. Dichos disolventes pueden contener ciertos aditivos, preferiblemente imidazol, hidroxilamina y agua. El imidazol se puede añadir a concentraciones de 0,1% a 3% (v/v), preferiblemente de 0,5% a 1,5% (v/v), el imidazol se puede añadir más preferiblemente a una concentración de 1% (v/v). La hidroxilamina se puede añadir a concentraciones de 0,1% a 3% (v/v), preferiblemente de 0,2% a 1% (v/v), más preferiblemente de hidroxilamina se puede añadir a una concentración de 1% (v/v). Se puede añadir agua a concentraciones de 0,1% a 20% (v/v), preferiblemente de 1% a 17% (v/v), más preferiblemente se puede añadir agua a una concentración de 1% (v/v). Los más preferidos como disolventes son DMSO, DMSO + 1% imidazol, NMP

+ 0,5% de hidroxilamina, MeCN + 1% H₂O, MeCN + 1% H₂O + 1% imidazol, isopropanol + 1% imidazol, isopropanol + 12% H₂O + 1% imidazol .

5 El PLPG asociado a los aminoácidos para la síntesis de péptidos se puede utilizar en una concentración dentro de los disolventes de 0,1 mmol/L a 0,5 mmol/L. Preferiblemente, en una concentración de 0,2 mmol/L a 0,4 mmol/L. Más preferiblemente, el PLPG se puede utilizar en una concentración de 0,3 mmol/L.

10 El PLPG asociado a los aminoácidos se puede utilizar en conexión con agentes sensibilizadores conocidos por el experto en la materia, que aumentan la eficacia de la reacción de desprotección.

15 Los microarrays de oligopéptidos se pueden utilizar para una variedad de propósitos, incluyendo pero no limitado a la selección de bibliotecas de anticuerpos, análisis cuantitativo o cualitativo de muestras biológicas, el descubrimiento de biomarcadores, el enriquecimiento de proteínas escasas, el agotamiento de las proteínas muy abundantes, el análisis de interacciones proteína-proteína-, análisis de interacciones DNA-proteína- o interacciones RNA-proteína.

20 En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula Ib se utilizan para la síntesis de array de péptidos sin basado en fotolitografía sin máscara como el grupo NH-protector en aminoácidos como uretano. El PLPG se utiliza como ácido bloqueado-NH libre, éster activado, halogenuro de ácido, anhídrido, intermolecular o intramolecular como N-carboxi-anhídrido (NCA).

25 En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula Ib se utilizan para la síntesis de array de péptidos basado en fotolitografía sin máscara como el grupo COOH-protector en aminoácidos como éster de la dirección inversa de síntesis.

30 25 El PLPG acuerdo con la invención puede además utilizarse en cualquier proceso conocido por el experto en la materia en donde son necesarios azúcares protegidos. Los azúcares utilizados pueden ser compuestos, tales como aldohexosas y aldopentosas. Preferiblemente, el PLPG como se describe aquí se puede utilizar para la síntesis de hidratos de carbono, glicoproteínas y proteoglicanos en solución, más preferiblemente el PLPG como se describe en el presente documento pueden ser utilizado para la síntesis de hidratos de carbono, glicoproteínas y proteoglicanos sobre un soporte sólido. La síntesis se puede realizar por cualquier método estándar conocido en el estado de la técnica. Más preferiblemente, la síntesis se puede realizar mediante el uso de técnicas fotolitográficas, tales como técnicas donde se utiliza un dispositivo de microespejo para exponer a la luz visible características espaciales seleccionadas en un microarray como se explicó anteriormente.

35 35 Los microarrays de hidratos de carbono se pueden utilizar para una variedad de propósitos, incluyendo pero no limitados a análisis de interacciones sacáridos-proteína-, análisis de alto rendimiento de las proteínas y células, análisis de glicanos y sus interacciones moleculares,

40 40 En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula Ib se utilizan para la síntesis basada en la fotolitografía sin máscara de hidratos de carbono, glicoproteínas, proteoglicanos, y similares, como el grupo protector de OH como éter.

45 45 En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula Ib se utilizan como grupo SH-protector para estrategias ortogonales como éter, éster o tiocarbonato.

50 50 En otra realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula Ib se utilizan como grupos fotoactivables para la liberación de la protección de una estructura biológicamente activa para la iniciación de una reacción de la polimerasa o una conversión bioquímica dependiente de ATP.

55 55 La presente descripción se refiere además al uso del compuesto de acuerdo con la fórmula Ib, que se caracteriza en que la luz se utiliza para la fotolitografía sin máscara que tiene una longitud de onda de 375 a 405 nm, preferiblemente de 390 nm.

60 55 La presente descripción se refiere además a un método para producir el esqueleto diarilsulfuro que contiene PLPG que se puede utilizar para la síntesis de oligonucleótidos y péptidos basada en fotolitografía, en el que el método comprende las siguientes etapas:

65 a) proporcionar como material de partida p-dietilbenceno.

b) La bromación del anillo de fenilo en una posición por la acción de bromo molecular y la purificación por destilación.

c) La nitración del compuesto obtenido en ácido sulfúrico y nítrico en la posición para- del bromo y el aislamiento y la purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice y cristalización.

d) La hidroximetilación del compuesto por la acción de para-formaldehído en DMSO y Tritón B en la posición bencílica.

e) La conversión del grupo bromo aromático al sulfuro de arilo por acción del tiofenol apropiado, tionaftol etc carbonato de potasio en DMF y cantidades catalíticas de sal de cobre (II) y la purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice.

f) Conversión del alcohol anterior a clorocarbonato por la acción de trifosgeno en THF y trietilamina.

5 g) La reacción del clorocarbonato con el nucleósido adecuado y haciendo reaccionar adicionalmente el nucleósido con un agente de fosfamilación en la fosforamidita apropiada, o reacción del clorocarbonato con el derivado de aminoácido apropiado.

10 Ejemplo 1:

Evaluación de la vida media de 5PyS4EtNPPOC-timidina en dependencia del disolvente a una longitud de onda de 390 nm y 404 nm

15 Para evaluar la vida media de PLPG, se disolvió 5PyS4EtNPPOC-timidina en una concentración de $c = 0,3 \text{ mmol/L}$ en los disolventes indicados en las Figs. 1 y 2. Como disolventes se utilizaron dimetilsulfóxido (DMSO), n-metilpirrolidona (NMP), acetonitrilo (MeCN) e isopropanol. Imidazol, hidroxilamina o agua se añadieron a los disolventes como se representa en la tabla. En caso de una longitud de onda de irradiación de 390 nm (Fig. 1), se realizó exposición a la luz durante 2, 4, 6 s o 2, 4, 6, 8 s o 2, 4, 6, 8, 12 s, respectivamente, para inducir la desprotección de treonina. En caso de una longitud de onda de irradiación de 404 nm (Fig. 2), se realizó la exposición de luz para 1, 2, 20 3, 4 min o 1, 2, 3, 5 min, respectivamente, para inducir la desprotección de timidina. Posteriormente, la solución se analizó por HPLC con el fin de evaluar el período de tiempo necesario para desproteger el 50% de la cantidad inicial de la timidina protegida. Las vidas medias fueron extrapolados de las duraciones resultantes de los tiempos de exposición. Como se puede extraer de las Figs. 1 y 2, en caso de una longitud de onda de 390 nm, la desprotección más rápida se logró con DMSO (2,1 s), NMP + 0,5% de hidroxilamina (1,8 s), MeCN + 1% H_2O (2 S) e isopropanol + 12% H_2O + 1% imidazol (2,2 s). En caso de una longitud de onda de 404 nm, la desprotección más rápida se logró con DMSO + 1% imidazol (2,5 min), NMP + 0,5% de hidroxilamina (1,8 min), MeCN + 1% H_2O + 1% imidazol (2,6 min) e isopropanol + 12% H_2O + 1% imidazol (3,8 min). En cuanto a las diferencias de tiempo significativas entre los 25 390 nm (segundos) y 404 nm (minutos), tiene que tenerse en cuenta que en el primer caso la salida de potencia de la lámpara era de 15 W, mientras que en el último caso la potencia de salida de la lámpara fue de 0,08 W.

30 Ejemplo 2:

Características de absorción UV de PLPG

35 La absorción UV para diferentes PLPG en las longitudes de onda más frecuentemente utilizadas se representa en la Fig. 3. Los derivados adecuados de la fenilalanina con el PLPG acuerdo con la invención se disolvieron a una concentración de 1 mg/ml en metanol de calidad UV. Se registraron espectros UV en un fotómetro de escaneo y los valores de absorción se tomaron a las longitudes de onda determinadas. Los coeficientes de extinción molar se calcularon a partir del peso molecular utilizando la ley de Lambert Beers. La velocidad de desprotección de cualquier 40 PLPG es aproximadamente el producto del coeficiente de extinción molar por tres veces el rendimiento cuántico. Se puede pues, estimar, que PHS-fenilalanina desprotege 15 veces más eficientemente que BTA-fenilalanina y alrededor de 25 veces más eficiente que NPPOC-fenilalanina en una longitud de onda de irradiación de 390 nm.

45 Ejemplo 3:

45 Síntesis de un array de péptido que contiene la secuencia diana de un anticuerpo anti-V5 usando disulfuro-PLPG-aminoácidos

50 Epítopo diana: (H)G KIPPNPLGLDS T-(OH)

50 Las características del péptido en el array fueron sintetizadas en un patrón de densidad variable en un sintetizador de arrays sin máscara Roche Nimblegen de acuerdo con el esquema de síntesis en la figura 8, a una dosis de luz de:

55 Área 1: 2,5 s irradiación a 190 mW / cm^2 [365 nm]

Área 2: 3,5 s irradiación a 190 mW / cm^2 [365 nm]

Área 3: 4,5 s irradiación a 190 mW / cm^2 [365 nm]

60 La exposición fue en NMP / hidroxilamina (1%). El tiempo de irradiación estándar para los aminoácidos NPPOC en esta intensidad de la lámpara habría sido de 50 s. Todas las características del array contenían la misma secuencia de antígeno V-5. El acoplamiento fue bajo condiciones estándar, aminoácido 30 mM, activador 30 mM (HBTU y HOBT) y 60 mM de base Hünig en DMF de calidad peptídica secuencialmente acoplado a un portaobjetos de microscopio Greiner funcionalizado-3D-Amino. El lavado entre los ciclos y entre el acoplamiento y la irradiación realizada con NMP. La desprotección final del array se logró mediante la inmersión en ácido trifluoroacético, agua, triisopropilsilano 97,5:2:0,5 durante 1 h. Después de un lavado a fondo con agua, el array se incubó con el anticuerpo anti-V5 (marcado con tinción fluorescente Cy-3), obtenido de Sigma en el sistema de tampón

recomendado por el fabricante en dilución 1:10.000 (0,1 µg/mL) durante la noche a temperatura ambiente. Después de lavar con tampón y secar el array se escaneó en el ajuste del filtro apropiado en un escáner de fluorescencia Roche Nimblegen MS 200 con una resolución de 2 µm. Las imágenes fueron analizadas con el paquete de programas NimbleScan y Genepix (Molecular Dynamics).

- 5 Los resultados muestran excelente intensidad de la señal en las tres dosis como se muestra en la Fig. 8b, lo que indica fotodesprotección completa a menos de 500 mW*s, mientras que los NPPOC-aminoácidos requerirían aproximadamente 10.000 mW*s para lograr el mismo resultado.
- 10 Además, el mismo experimento se llevó a cabo en un sintetizador de arrays sin máscara Nimblegen de Roche de acuerdo con el esquema de síntesis en la Fig. 8a, a una dosis de luz de:

Área 1-30: 1-30 s irradiación a 90 mW/cm² [390 nm]

- 15 La incubación, tinción y el lavado se realizaron como se ha mencionado anteriormente.

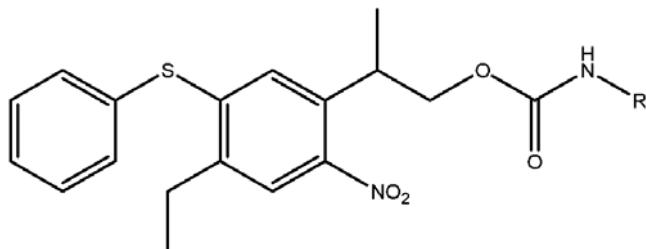
Los resultados muestran una intensidad de señal excelente, con un máximo a aproximadamente 21 s de irradiación a 390 nm como se muestra en la Fig. 8c, indicando fotoprotección completa a menos de 2.000 mW*s, mientras que los NPPOC-ácidos amino están insuficientemente desprotegidos a 390 nm y no dan señales atribuibles a los péptidos realizados.

Ejemplo 4:

Síntesis de disulfuro-PLPG-aminoácidos

- 25 Las vías de síntesis se representan en las figuras correspondientes tal como se indica a continuación.

La fórmula general de los fenil-tio-NPPOC-aminoácidos



- 30 a) 2-(2-nitro-4-ethyl-5-tiofenilo-fenil) propanol ("PhSNPPOH")

35	1,4-dietilbenceno	1902,6 g	14,18 mol	1 Eq.
	bromo	2288 g	14,32 mol	1,01 Eq.
	hierro (polvo)	26 g		

40 La vía de síntesis correspondiente se representa en la Fig. 4a. Unas pocas gotas de bromo se añaden a una mezcla de 1.902,6 g de 1,4-dietilbenceno y 26 g de polvo de hierro. La mezcla se agita a temperatura ambiente hasta que se inicia la evolución de HBr. A continuación, la mezcla se enfria en un baño de hielo y 2.288 g de bromo se añaden bajo agitación vigorosa durante un período de aproximadamente 5 h. A continuación, se retira el baño de hielo y la mezcla se agita durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lava con agua, solución saturada de NaHCO₃ y de nuevo con agua. El producto bruto se diluye con tolueno, se concentra y se destila al vacío (aproximadamente 5 mbar / 82 a 84 °C).

45 Se obtienen 2740 g de 2,5-dietil-bromobenceno, un líquido incoloro, (rendimiento: 90% de la teoría).

¹H-RMN (300 MHz, DMSO):

50 7,37 ppm (d, 1H, Ar-H); 7,20 ppm (d, 1H, Ar-H); 7,12 ppm (dd, 1H, Ar-H); 2,65 ppm (q, 2H, Ar-CH₂-CH₃); 2,56 ppm (q, 2H, Ar-CH₂-CH₃), 1,20 hasta 1,15 ppm (m, 6H, 2x CH₃).

b) 2,5-dietil-4-nitro-bromobenceno

55	2,5-dietil-bromobenceno	426 g	2 mol
	HNO ₃ (65%)	202 ml	
	H ₂ SO ₄ conc.	241 ml	

La vía de síntesis correspondiente se representa en la Fig. 4b. Bajo enfriamiento de hielo 241 ml de H_2SO_4 conc. se añaden lentamente a 202 ml de HNO_3 (65%). Bajo enfriamiento con hielo y agitación vigorosa esta mezcla se deja caer lentamente en 426 g de 2,5-dietil-bromobenceno (tiempo de dosificación de 2 h). La mezcla de reacción se agita durante la noche a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se vierte en hielo, se diluye con diclorometano, se lava dos veces con agua y finalmente con solución saturada de $NaHCO_3$. La fase orgánica se diluye con tolueno, se concentra al vacío y se purifica mediante filtración rápida (gel de sílice, fase de iso-hexano móvil).

Se obtienen 217 g de un aceite ligeramente amarillo (rendimiento: 42% del teórico).

1H-RMN (300 MHz, DMSO):

7,74 ppm (s, 2H, Ar-H); 4,72 ppm (t, 1H, OH); 3,54-3,48 ppm (m, 2H, HO-CH₂), 3,26 a 3,14 ppm (m, 1H, HO-CH₂-CH); 2,74 ppm (q, 2H, Ar-CH₂-CH₃); 1,25-1,15 ppm (m, 6H, 2x CH₃).

c) 2- (2-nitro-4-etil-5-bromofenil) propan-1-ol ("BrEtNPPOH")

2,5-dietil-4-nitro-bromobenceno	1.000 g	3,87 mol	1 Eq
paraformaldehído	418,8 g	4,65 mol	1,2 Eq
Triton B (40% en metanol)	1.090 ml		
DMSO	5,2 L		
Ácido acético	400 ml		

La vía de síntesis correspondiente se representa en la Fig. 4c. Una mezcla de 1.000 g de 2,5-dietil-4-nitro-bromobenceno, 418,8 g de paraformaldehído, 1.090 ml de Triton B (40% en metanol) y 5,2 L de DMSO se calientan durante 2 h entre 80 y 90 °C. La calefacción se apaga y la mezcla se agita durante 4 h. Se añaden 400 ml de ácido acético. La mezcla se diluye con agua hasta un volumen de aproximadamente 15 L y se extrae dos veces con 2 L de tolueno. El extracto de tolueno se lava dos veces con 1 L de agua y después se concentra a vacío. El producto bruto se purifica mediante cromatografía (gel de sílice, gradiente: iso-hexano para iso-hexano / EtOAc 30%).

Rendimiento: 521 g de 2- (2-nitro-4-etil-5-bromofenil) propan-1-ol como un aceite marrón (46% de la teoría) más 77 g de menor pureza.

1H-RMN (300 MHz, DMSO): 7,74 ppm (s, 2H, Ar-H); 4,72 ppm (t, 1H, OH); 3,54-3,48 ppm (m, 2H, HO-CH₂), 3,26 a 3,14 ppm (m, 1H, HO-CH₂-CH); 2,74 ppm (q, 2H, Ar-CH₂-CH₃); 1,25-1,15 ppm (m, 6H, 2x CH₃).

d) 2- (2-nitro-4-etil-5-tiofenilfenil) propanol (PhSNPPOH)

BrEtNPPOH	450 g	1,56 mol	1 Eq
Tiofenol	172 g	156 mol	1 Eq
K ₂ CO ₃	324 g	2,34 mol	1,5 Eq
DMF	2 L		

La vía de síntesis correspondiente se representa en la Fig. 4d. Una mezcla de los reactivos y DMF se agitó a 140-160 °C durante 5 h. Después de enfriar a 110 °C, el disolvente se eliminó por destilación a vacío. El residuo se trató con aproximadamente 2,5 l de agua y se extrajo con aproximadamente 1 L de diclorometano. La fase orgánica se lavó con NaOH diluido y agua, después se evaporó al vacío hasta la sequedad, se destiló adicionalmente con una mezcla azeotrópica de tolueno / etanol y se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice en 5 a 30% acetato de etilo en hexanos.

Rendimiento: 352 g de aceite claro, amarillo (71%)

e) clorocarbonato de 2-(2-nitro-4-etil-5-tiofenilfenil) propanol ("PHSNPPOC-Cl")

PhSNPPOH	352 g	1,11 mol	1 Eq
Trietilamina	112,2 g	1,11 mol	1 Eq
Trifosgeno	219,4 g	2,22 mol	fosgeno 2 Eq
THF	ca. 1,7 L		

La vía de síntesis correspondiente se representa en la Fig. 4e. 219,4 g de trifosgeno se disolvieron en 1 L de THF seco bajo agitación durante 30 min. Bajo enfriamiento con hielo, se añadió una solución de 352 g PhSNPPOH y 112,2 g de NEt₃ en 700 ml de THF seco lentamente durante un período de 3 h. Después de reposar durante la noche, el baño de hielo fue reemplazado por un baño de agua a 40 °C y el exceso de fosgeno y aproximadamente 1 L de THF se eliminó a vacío. La suspensión se filtró, se lavó el residuo con un poco de THF y los filtrados se evaporaron al vacío hasta la sequedad.

Rendimiento: 410,3 g de cristales de color amarillo (97%)

El material es puro para su uso posterior sin purificación.

5 f) PhSNPPCO-glicina-OH

Glicina	5,81 g	0,0774 mol	1 Eq
PhSNPPCO-Cl	29,4 g	0,0774 mol	1 Eq
Na ₂ CO ₃	18,1 g	0,1703 mol	2,2 Eq
Agua	190 ml		
THF	150 ml		

10 La vía de síntesis correspondiente se representa en la Fig. 4f. 5,81 g de glicina y 18,1 g de Na₂CO₃ se disuelven en 190 ml de agua y 60 ml de THF. La solución se agitó en un baño de hielo y se trató gota a gota con una solución de 29,4 g de PhSNPPCO-Cl en 90 ml de THF. La agitación continuó durante 20 min. El THF se evaporó y la solución se ajustó a pH 11. La solución se extrajo dos veces con aproximadamente 500 ml de hexano / acetato de etilo 1:1, se ajustó el pH a 2,5 con HCl diluido y se extrajo con aproximadamente 500 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con aproximadamente 500 ml de agua y se evapora hasta la sequedad. El producto se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con metanol en diclorometano (0 a 3%).

20 Rendimiento: 21 g de espuma pálida amorfó de color amarillo (65%)

25 g) PhSNPPCO-prolina-OH

Prolina	8,6 g	0,075 moles	1 Eq
PhSNPPCO-Cl	28,5 g	0,075 mol	1 Eq
Na ₂ CO ₃	17,5 g	0,165 mol	2,2 Eq
Agua	1000 ml		
THF	1200 ml		

30 La vía de síntesis correspondiente se representa en la Fig. 4g. 8,6 g de prolina y 17,5 g de Na₂CO₃ se disuelven en 1.000 ml de agua y 1.000 ml de THF. La solución se agitó en un baño de hielo y se trató gota a gota con una solución de 28,5 g de PhSNPPCO-Cl en 200 ml de THF. La agitación continuó durante 20 min. El THF se evaporó y la solución se ajustó a pH 11. La solución se extrae dos veces con aproximadamente 500 ml de acetato de etilo, se ajusta el pH a 2,5 con HCl diluido y se extrae con aproximadamente 500 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con aproximadamente 500 ml de agua y se evapora hasta la sequedad. El producto se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con metanol en diclorometano (0 a 2%).

40 Rendimiento: 21,7 g de espuma pálida amorfó de color amarillo (63%)

45 h) PhSNPPCO-isoleucina-OH

Isoleucina	9,97 g	0,076 mol	1 Eq
PhSNPPCO-Cl	28,9 g	0,076 mol	1 Eq
Na ₂ CO ₃	26,8 g	0,25 mol	3,3 Eq
Agua	300 ml		
THF	300 ml		

50 La vía de síntesis correspondiente se representa en la Fig. 4h. 9,97 g de isoleucina y 26,8 g de Na₂CO₃ se disuelven en 300 ml de agua y 200 ml de THF. La solución se agitó en un baño de hielo y se trató gota a gota con una solución de 28,9 g PhSNPPCO-Cl en 90 ml de THF. La agitación continuó durante 20 min. El THF se evaporó y el pH de la solución se ajustó a 9,5.

55 La solución se extrajo dos veces con aproximadamente 500 ml de hexano / acetato de etilo 1:1, se ajustó el pH a 3,2 con HCl diluido y se extrajo con aproximadamente 500 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con aproximadamente 500 ml de agua y se evapora hasta la sequedad. El producto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con metanol en diclorometano (0 a 2%).

60 Rendimiento: 15 g de aceite de color amarillo pálido (42%)

65 i) PhSNPPCO-ácido aspártico-OH

Aspartato	10,5 g	0,0789 mol	1 Eq
PhSNPPCO-Cl	30,0 g	0,0789 mol	1 Eq
Na ₂ CO ₃	23,0 g	0,22 mol	2,8 Eq
Agua	1000 ml		

THF 1200 ml

La vía de síntesis correspondiente se representa en la Fig. 4i. 10,5 g de aspartato y 23 g de Na_2CO_3 se disuelven en 1.000 ml de agua y 1.000 ml de THF. La solución se agitó en un baño de hielo y se trató gota a gota con una solución de 30 g de PhSNPOC-Cl en 200 ml de THF. La agitación continuó durante 20 min. El THF se evaporó. La solución se extrajo dos veces con aproximadamente 500 ml de hexano / acetato de etilo 1:1, el pH se ajustó a 2 con HCl diluido y se extrajo con aproximadamente 500 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con aproximadamente 500 ml de agua y se evaporó hasta la sequedad. El producto se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con metanol en diclorometano (0 a 2%).

Rendimiento: 28 g de espuma pálida amarilla (74%)

j) PhSNPOC-asparagina-OH

Asparagina	12,7 g	0,0848 mol	1 Eq
PhSNPOC-Cl	32,2 g	0,0848 mol	1 Eq
Na_2CO_3	19,8 g	0,1866 mol	2,2 Eq
Aqua	1.000 ml		
THF	1.200 ml		

La vía de síntesis correspondiente se representa en la Fig. 4j. 12,7 g de asparagina y 19,8 g de Na_2CO_3 se disuelven en 1.000 ml de agua y 1.000 ml de THF. La solución se agitó en un baño de hielo y se trató gota a gota con una solución de 32,2 g de PhSNPOC-Cl en 200 ml de THF. La agitación continuó durante 20 min. El THF se evaporó. La solución se extrajo dos veces con aproximadamente 500 ml de éter, el pH se ajustó a 2 con HCl diluido y se extrajo con aproximadamente 500 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con aproximadamente 500 ml de agua y se evaporó hasta la sequedad. El producto se purifica mediante cristalización a partir de acetato de etilo.

Rendimiento: 28 g de cristales amarillos pálidos (73%)

k) PhSNPOC-leucina-OH

Leucina	12,1 g	0,092 mol	1 Eq
PhSNPOC-Cl	35,0 g	0,092 mol	1 Eq
Na_2CO_3	21,5 g	0,202 mol	2,2 Eq
Aqua	250 ml		
THF	250 ml		

La vía de síntesis correspondiente se representa en la Fig. 4k. 12,1 g de leucina y 21,5 g de Na_2CO_3 se disuelven en 250 ml de agua y 200 ml de THF. La solución se agitó en un baño de hielo y se trató gota a gota con una solución de 35 g de PhSNPOC-Cl en 50 ml de THF. La agitación continuó durante 20 min. El THF se evaporó. La solución se extrajo dos veces con aproximadamente 300 ml de hexano / acetato de etilo 1:1, el pH se ajustó a 3 con HCl diluido y se extrajo con aproximadamente 500 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con aproximadamente 500 ml de agua y se evaporó hasta la sequedad. El producto se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con metanol en diclorometano (0 a 3%).

Rendimiento: 40 g de aceite de color amarillo (91%)

l) PhSNPOC-C₆-Espaciador

ácido 6-amino-hexanoico	3,45 g	0,0263 mol	1 Eq
PhSNPOC-Cl	10,0 g	0,0263 mol	1 Eq
Na_2CO_3	6,1 g	0,0579 mol	2,2 Eq
Aqua	300 ml		
THF	200 ml		

La vía de síntesis correspondiente se representa en la Fig. 4l. 3,45 g de ácido 6-amino-hexanoico y 6,1 g de Na_2CO_3 se disuelven en 300 ml de agua y 120 ml de THF. La solución se agitó en un baño de hielo y se trató gota a gota con una solución de 10 g de PhSNPOC-Cl en 80 ml de THF. La agitación continuó durante 20 min. El THF se evaporó. El pH se ajustó a 10,5. La solución se extrajo dos veces con aproximadamente 300 ml de éter, se ajusta el pH a 2,3 con HCl diluido y se extrajo con aproximadamente 500 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con aproximadamente 500 ml de agua y se evaporó hasta la sequedad. El producto se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con metanol en diclorometano (0 a 5% y ácido acético 0,5%).

Rendimiento: 10,4 g de aceite de color amarillo pálido (83%)

m) PhSNPOC-Lisina (Boc) -OH

	Fmoc-Lisina (Boc)-OH	37,0 g	0,079 mol	1 Eq
	Piperidina	33,6 g	0,395 mol	5 Eq
	THF	1,400 ml		
5	Na ₂ CO ₃	18,4 g	0,174 mol	2,2 Eq
	PhSNPPC-Cl	30,0 g	0,079 mol	1 Eq

37,0 g de Fmoc-lisina (Boc)-OH se disuelven en 400 ml de THF y se trataron con 33,6 g de piperidina durante 3 h bajo agitación con una pala de agitador mecánico. La TLC indicó la eliminación de FMOC completa después de ese período. Se añadió agua (aproximadamente 2 L) y se agitó durante otros 30 min. El precipitado se filtró con succión. El filtrado transparente se cargó con 18,4 g de Na₂CO₃ y se evaporó hasta la sequedad. La evaporación continuó hasta que se eliminó toda la piperidina, mediante adición repetida de agua y destilación. El residuo se disolvió en aproximadamente 1 l de agua y se trató con 800 ml de THF. La solución se agitó en un baño de hielo y se trató gota a gota con una solución de 30 g de PhSNPPC-Cl en 200 ml de THF. La agitación continuó durante 20 min. El THF se evaporó. El pH se ajustó a 2 con HCl diluido y se extrajo con aproximadamente 500 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con aproximadamente 500 ml de agua y se evaporó hasta la sequedad. El producto se purifica mediante chromatografía en columna sobre gel de sílice con metanol en diclorometano (0 a 1%).

Rendimiento: 28,3 g de espuma amorfá color naranja pálido (60%)

n) PhSNPPC-serina (t-Bu) -OH

	Fmoc-serina (t-Bu)-OH	30,3 g	0,079 mol	1 Eq
	Piperidina	33,6 g	0,395 mol	5 Eq
	THF	1,600 ml		
25	Na ₂ CO ₃	18,4 g	0,174 mol	2,2 Eq
	PhSNPPC-Cl	30,0 g	0,079 mol	1 Eq

30,3 g de Fmoc-serina (Boc) -OH se disuelven en 600 ml de THF y se tratan con 33,6 g de piperidina durante 3 h bajo agitación con una pala de agitador mecánico. La TLC indicó la eliminación de FMOC completa después de ese período. Se añadió agua (aproximadamente 2 L) y se agitó durante otros 60 min. El precipitado se filtró con succión. El filtrado transparente se cargó con 18,4 g de Na₂CO₃ y se evaporó hasta la sequedad. La evaporación continuó hasta que se eliminó toda la piperidina, por adición repetida de agua y destilación. El residuo se disolvió en aproximadamente 600 ml de agua, se filtró y se trató con 800 ml de THF. La solución se agitó en un baño de hielo y se trató gota a gota con una solución de 30 g de PhSNPPC-Cl en THF 200ml. La agitación continuó durante 20 min. El THF se evaporó. El pH se ajustó a 2 con HCl diluido y se extrajo con aproximadamente 500 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con aproximadamente 500 ml de agua y se evaporó hasta la sequedad. El producto se purifica mediante chromatografía en columna sobre gel de sílice con 1% de metanol en diclorometano.

40 Rendimiento: 30,9 g espuma amorfá amarilla pálida (77%)

o) PhSNPPC-Treonina (t-Bu)-OH

	Fmoc-Thr (t-Bu)-OH	31,4 g	0,079 mol	1 Eq
	Piperidina	33,6 g	0,395 mol	5 Eq
	THF	1,300 ml		
45	Na ₂ CO ₃	18,4 g	0,174 mol	2,2 Eq
	PhSNPPC-Cl	30,0 g	0,079 mol	1 Eq

50 31,4 g de Fmoc-Thr (t-Bu)-OH se disuelven en 600 ml de THF y se tratan con 33,6 g de piperidina durante 4 h bajo agitación con una pala de agitador mecánico. La TLC indicó la eliminación FMOC completa después de ese período. Se añadió agua (aproximadamente 3 L) y se agitó durante otros 30 min. El precipitado se filtró con succión. El filtrado transparente se cargó con 18,4 g de Na₂CO₃ y se evaporó hasta la sequedad. La evaporación continuó hasta que se eliminó todo piperidina, por adición repetida de agua y destilación. El residuo se disolvió en aproximadamente 600 ml de agua, se filtró y se trató con 600 ml de THF. La solución se agitó en un baño de hielo y se trató gota a gota con una solución de 30 g de PhSNPPC-Cl en 100 ml de THF. La agitación continuó durante 20 min. El THF se evaporó. El pH se ajustó a 2 con HCl diluido y se extrajo con aproximadamente 500 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua de aproximadamente 500 ml y se evaporó hasta la sequedad. El producto se purifica mediante chromatografía en columna sobre gel de sílice con 1% de metanol en diclorometano.

60 Rendimiento: 30,9 g de espuma amorfá de color amarillo pálido (69%)

Dear Sirs,

65 Thank you for your e-mail with the attached files, entrusting us with the national phase entry of the above-

mentioned European Patent in Spain.

We will take the necessary steps by the deadline of 24-09-2015 and report to you in due course.

5 Sincerely yours,

Paso 1:

10	Fmoc-His (Trt)-OH	100 g	0,161 mol	1 Eq
	Piperidina	140 g	1,614 mol	10 Eq
	THF	2.000 ml		

15 100 g de Fmoc-His (Trt)-OH se disuelven en 2.000 ml de THF y se tratan con 140 g de piperidina durante 2 h bajo agitación con una pala de agitador mecánico. La TLC indicó la eliminación FMOC completa después de ese período.

20 Se añadió agua (aproximadamente 4 L) y se agitó durante otros 30 minutos. El precipitado se filtró con succión. El filtrado transparente se concentró para eliminar todo el THF. El pH se ajustó a 2,5 con HCl diluido y la mezcla se agitó durante la noche.

25 La filtración produjo 53 g de cristales incoloros (83%), que se secaron al aire durante la noche.

Paso 2:

25	H-His (Trt)-OH	20,9 g	0,0526 mol	1 Eq
	PhSNPPOC-Cl	20,0 g	0,0526 mol	1 Eq
	Na ₂ CO ₃	12,3 g	0,116 mol	2.2 Eq
	THF	800 ml		

30 35 Los cristales anteriores, 20 g, y 12,3 g de Na₂CO₃ se disolvieron en aproximadamente 800 ml de agua y 700 ml de THF. La solución se agitó en un baño de hielo y se trató gota a gota con una solución de 20 g de PhSNPPOC-Cl en 100 ml de THF. La agitación continuó durante 20 min. El THF se evaporó. El pH se ajustó a 1,5 con HCl diluido y se extrajo con aproximadamente 500 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con aproximadamente 500 ml de agua y se evaporó hasta la sequedad. El producto se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con 0-1% de metanol en diclorometano y ácido acético (0,01%).

Rendimiento: 10 g de espuma amorfa pálida (26%)

Ejemplo 5:

40 Síntesis de disulfuro-PLPG-nucleótidos

5-PhSNPPOC-dB-3'-PA

45 a) 5'-PhSNPPOC-dT

50	timidina	19,1 g	0,0789 mol	1 Eq
	PhSNPPOC-Cl	30,0 g	0,0789 mol	1 Eq
	piridina	300 ml		
	diclorometano	50 ml		

Una solución de 19,1 g de timidina en 300 ml de piridina seca se agita en un baño de hielo. Gota a gota, una solución de 30,0 g de PhSNPPOC-Cl en 50 ml de diclorometano se añade.

55 Despues de 10 min continuó la agitación, la solución se lavó dos veces con 800 ml de agua y se evaporó hasta la sequedad. El residuo se coevaporó con una mezcla de tolueno / etanol. La purificación se realizó por cromatografía en columna sobre gel de sílice en metanol (0 a 2.5%) en diclorometano.

60 Rendimiento: 28 g de espuma amorfa de color amarillento pálido (60%)

b) 5'-PhSNPPOC-dT-3'-PA

65	5'-PhSNPPOC-dT	27,1 g	0,0463 mol	1 Eq
	DCI	2,7 g	0,0232 mol	0,5 Eq
	P-Reactivos	13,5 g	0,0449 mol	0,97 Eq

Diclorometano 300 ml

Una mezcla de los reactivos, se secó vigorosamente y con exclusión de humedad, se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió hexano hasta que una ligera turbidez permanece. Después de 10 min de agitación, el precipitado se filtra por succión y el producto bruto se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con un gradiente de 65% a 80% acetato de etilo en hexano.

Rendimiento: 29,7 g de una espuma amorfa de color amarillento pálido (81%)

10 P-RMN: 144,4 (m) ppm, 94% puro

c) 5'-PhSNPPOC-dC^{Ac}

DC ^{Ac}	28,3 g	0,105 mol	1 Eq
PhSNPPOC-Cl	40 g	0,105 mol	1 Eq
piridina	650 ml		
Diclorometano	100 ml		

Una solución de 28,3 g de N-(acetil)-2'-desoxi-citidina se coevaporó dos veces con 200 ml de piridina, se disolvió en 250 ml de piridina en seco y se agitó en un baño de hielo. Gota a gota, una solución de 40,0 g de PhSNPPOC-Cl en 100 ml de diclorometano se añadió. Después de 10 min continuó la agitación, la solución se lavó dos veces con 800 ml de agua y se evaporó hasta la sequedad. El residuo se coevaporó con una mezcla de tolueno / etanol. La purificación se realizó por cromatografía en columna sobre gel de sílice en metanol (0 a 2.5%) en diclorometano.

25 Rendimiento: 31 g de una espuma amorfa amarillenta pálida (48%)

d) 5'-PhSNPPOC-dC^{Ac}-3'-PA

5'-PhSNPPOC-dC ^{Ac}	29,0 g	0,0473 mol	1 Eq
DCI	2,8 g	0,0237 mol	0,5 Eq
P-Reactivos	13,8 g	0,0459 mol	0,97 Eq
Diclorometano	300 ml		

Una mezcla de los reactivos, se secó vigorosamente y con exclusión de humedad, se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió hexano hasta que una ligera turbidez permanece. El producto bruto se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con un gradiente de 65% a 80% acetato de etilo en hexano.

Rendimiento: 21,5 g de espuma amorfa de color amarillento pálido (56%)

40 P-RMN: 144,6 (m) ppm, 99% puro

e) 5'-PhSNPPOC-dA^{tac}

dA ^{tac}	46,3 g	0,105 mol	1 Eq
PhSNPPOC-Cl	40 g	0,105 mol	1 Eq
Piridina	650 ml		
Diclorometano	100 ml		

Una solución de 46,3 g de N-(terc-butil-fenoxiacetilo)-2'-desoxi-adenosina se coevaporó dos veces con 200 ml de piridina, se disolvió en 250 ml de piridina en seco y se agitó en un baño de hielo. Gota a gota, una solución de 40,0 g de PhSNPPOC-Cl en 100 ml de diclorometano se añadió. Después de 10 min continuó la agitación, la solución se lavó dos veces con solución de bicarbonato de sodio y 800 ml de agua y se evaporó hasta la sequedad. El residuo se coevaporó con una mezcla de tolueno / etanol. La purificación se realizó por cromatografía en columna sobre gel de sílice en metanol (0 a 1.5%) en diclorometano.

55 Rendimiento: 35 g de espuma amorfa de color amarillento pálido (42%)

f) 5'-PhSNPPOC-dA^{tac}-3'-PA

5'-PhSNPPOC- dA ^{tac}	32,3 g	0,0412 mol	1 Eq
DCI	2,4 g	0,0206 mol	0,5 Eq
P-Reactivos	12,0 g	0,0399 mol	0,97 Eq
Diclorometano	300 ml		

65 Una mezcla de los reactivos, se secó vigorosamente y con exclusión de humedad, se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió hexano hasta que una ligera turbidez permanece. Después de 10 min de

agitación, el precipitado se filtra por succión y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con un gradiente de 50% a 65% acetato de etilo en hexano.

Rendimiento: 32 g de espuma amorfa de color amarillento pálido (79%)

5

P-RMN: 144,3 (m) ppm, 99% puro

g) 5'-PhSNPPOC-dG^{tac}

10	dG ^{tac}	48,2 g	0,105 mol	1 Eq
	PhSNPPOC-Cl	40 g	0,105 mol	1 eq
	Piridina	800 ml		
	Diclorometano	60 ml		

15 Una solución de 48,2 g de N-(terc-butil-fenoxiacetilo)-2'-desoxi-guanosina se coevaporó dos veces con 200 ml de piridina, se disolvió en 400 ml de piridina seca y se agitó en un baño de hielo. Gota a gota, una solución de 40,0 g de PhSNPPOC-Cl en 600 ml de diclorometano se añadió. Después de 10 min continuó la agitación, la solución se lavó dos veces con 800 ml de agua y se evaporó hasta la sequedad. El residuo se coevaporó con una mezcla de tolueno / etanol. La purificación se realizó por cromatografía en columna sobre gel de sílice en metanol (0 a 5%) en diclorometano.

20

Rendimiento: 35 g de espuma amorfa de color amarillento pálido (42%)

h) 5'-PhSNPPOC-dG^{tac}-3'-PA

25	5'-PhSNPPOC-dG ^{tac}	34,0 g	0,0425 mol	1 Eq
	DCI	2,5 g	0,0212 mol	0,5 Eq
	P-Reactivo	12,4 g	0,0412 mol	0,97 Eq
	Diclorometano	500 ml		

30

Una mezcla de los reactivos, se secó vigorosamente y con exclusión de humedad, se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió hexano hasta que una ligera turbidez permanece. El producto bruto se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con un gradiente de 50% a 65% acetato de etilo en hexano.

35

Rendimiento: 24,5 g de espuma amorfa amarillenta pálida (58%)

P-RMN: 144,5 (m) ppm, 98% puro

Ejemplo 6:

40

Síntesis de diarilsulfuro PLPG adicional de acuerdo con la invención

a) 5-(t-butilfenil-tio)-4-etil-2-nitrofenil-2'-propan-1'-ol (t-butiltio-NPPOH)

45	4-t-Bu-Tiofenol	25,0 g	0,150 mol	1,1 Eq
	BrEt-NPPOH	39,0 g	0,135 mol	1 Eq
	K ₂ CO ₃	31,1 g	0,225 mol	1,7 Eq
	DMF	200 ml		

50 Una mezcla de los reactivos se agitó a 100 °C durante 3 h. DMF se separó por destilación al vacío. El residuo se disolvió en diclorometano, se lavó dos veces con agua y se evaporó hasta la sequedad a vacío. El residuo obtenido se suspendió en hexanos, se agitó durante la noche y se filtró por succión. Los cristales se secaron.

Rendimiento: 43 g de polvo de color amarillo pálido (85%)

55

¹H-RMN (300 MHz, DMSO):

7,72ppm (s, 1H, Nitro-Ar-H); 7,50ppm (m, 2H, Ar-H t-Bu-Ph); 7,38ppm (m, 2H, Ar-H t-Bu-Ph); 6,88ppm (s, 1H, Nitro-Ar-H); 4,67ppm (s, 1H, OH); 3,25- 3,21ppm (m, 3H, Ar-CH (Me) -CH₂-OH); 2,73ppm (q, 2H, Ar-CH₂-CH₃); 1,29ppm (s, 9H, CH₃ t-Bu); 1,20ppm (t, 3H, Ar-CH₂-CH₃; 0,95ppm (d, 3H, Ar-CH (CH₃) -CH₂-OH)

60

b) naftil-tio-NPPOH

65	BrEt-NPPOH	20,6 g	0,0715 mol	1 Eq
	2-tionaftol	11,5 g	0,0715 mol	1 Eq
	Carbonato potásico	14,8 g	0,107 mol	1,5 Eq

5 DMF 100 ml

Una mezcla de los reactivos se sometió a reflujo durante 1,5 h y se agitó adicionalmente durante la noche a temperatura ambiente. El residuo se diluyó con 1,5 l de agua y se extrajo con diclorometano. El extracto orgánico se lavó dos veces con agua, se evaporó hasta la sequedad a vacío y se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con acetato de etilo (0 - 30%) en hexano.

10 Rendimiento: 9,0 g de aceite amarillo (34%)

15 ^1H -RMN (300 MHz, DMSO):

8,07ppm (m, 1H, naftil-H); 8,00 - 7,90ppm (m, 3H, naftil-H); 7,77ppm (s, 1H, nitroaromáticos-H); 7,61-7,54ppm (m, 2H, naftil-H); 7,47-7,41ppm (m, 1H, naftil-H); 7,11ppm (s, 1H, nitroaromáticos-H); 4,65ppm (t, 1H, OH); 3,30-3,15ppm (m, 3H, Ar-CH (CH_3)- CH_2 -OH); 2,77ppm (q, 2H, Ar- CH_2 - CH_3); 1,21ppm (t, 3H, Ar- CH_2 - CH_3); 0,92ppm (d, Ar-CH (CH_3)- CH_2 -OH)

15 c) Nitrobenzimidazol-S-NPPOH

BrEt-NPPOH	6,0 g	0,0208 mol	1 Eq
2-Mercapto-5-nitro-bencimidazol	4,06 g	0,0208 mol	1 Eq
Carbonato potásico	4,3 g	0,0312 mol	1,5 Eq
DMF	50 ml		

Una mezcla de los reactivos se sometió a reflujo durante 3 h y se agitó adicionalmente durante la noche a temperatura ambiente. El residuo se diluyó con 0,5 l de agua y se extrajo con diclorometano. El extracto orgánico se lavó dos veces con agua, se evaporó hasta la sequedad al vacío y se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con acetato de etilo (0 - 30%) en hexano.

20 Rendimiento: 5,8 g de aceite amarillo (69%)

25 ^1H -RMN (300 MHz, DMSO):

13,35ppm (s, 1H, NH); 8,35ppm (dd, 1H, nitrobenzimidazol-H); 7,95ppm (s, 1H, nitroaromáticos-H); 7,75ppm (s, 1H, nitroaromáticos-H); 7,63ppm (1H, d, nitrobenzimidazol-H); 4,71ppm (s, 1H, OH); 3,47ppm (d, 2H, HO- CH_2); 3,19ppm (m, 1H, Ar-CH(CH_3)- CH_2 -OH); 2,79ppm (q, 2H, Ar- CH_2 - CH_3), 1,21-1,15ppm (m, 6H, 2 x CH_3)

30 d) piridil-S-NPPOH

BrEt-NPPOH	133,5 g	0,463 mol	1 Eq
2-Mercaptopiridina	51,5 g	0,463 mol	1 Eq
Carbonato potásico	96,0 g	0,695 mol	1,5 Eq
DMF	600 ml		

Una mezcla de los reactivos se agitó a 140 °C durante 4 h. El DMF se separó por destilación a vacío. El residuo se disolvió en diclorometano, se lavó dos veces con agua y se evaporó hasta un aceite al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con acetato de etilo (0 - 30%) en hexano.

35 Rendimiento: 87,9 g de aceite amarillo claro (60%)

40 ^1H -RMN (300 MHz, DMSO):

8,43ppm (m, 1H, Py-H); 7,82ppm (s, 1H, Nitroaromático); 7,70ppm (m, 1H, Py-H); 7,65ppm (s, 1H, Py-H), 7,21ppm (m, 1H, Py-H); 4,75ppm (t, 1H, OH); 3,47ppm (t, 2H, HO- CH_2); 3,20ppm (m, 1H, HO- CH_2 - CHCH_3); 2,72ppm (q, 1H, CH_2 -bencílico); 1,15 (m, 6H, 2 x CH_3)

45 e) 2,5-dietil-4-fenoxi-nitrobenceno

Fenol	8,0 g	0,085 mol	1,1 Eq
NaH (60% en Parafina)	3,4 g	0,085 mol	1,1 Eq
4-Bromo-2,5-dietil-nitrobenceno	20,0 g	0,078 mol	1 Eq
DMF	60 ml		

55 Bajo agitación vigorosa 3,4 g de NaH (60% en parafina) se añadió cuidadosamente a una solución de 8,0 g fenol en 60 ml de DMF. Cuando se terminó la evolución de gas, se añadieron 20,0 g de 4-bromo-2,5-dietil-nitrobenceno a la mezcla. La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 horas a 170 °C. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en 600 ml de agua. La emulsión resultante se extrajo con hexano. El hexano se

separó por destilación y el residuo de la destilación se secó durante la noche al vacío. El residuo de destilación se disolvió en hexano y se purificó por cromatografía en columna (sílice / hexano).

Rendimiento: 2,2 g de aceite ligeramente coloreado

5 ¹H-RMN (DMSO):
10 7,96ppm (s, 1H, Ar-H); 7,48 - 7,40ppm (m, 2H, Ph-H); 7,25-7,18ppm (m, 1H, Ph-H); 7,09-7,03ppm (m, 2H, Ph-H);
15 6,78ppm (s, 1H, Ar-H); 2,72ppm (q, 2H, ArCH₂-CH₃); 2,68ppm (q, 2H, Ar-CH₂-CH₃); 1,18ppm (t, 3H, Ar-CH₂-CH₃);
20 1,07ppm (t, 3H, Ar-CH₂-CH₃),

Ejemplo 7

Síntesis alternativa del diarilsulfuro-PLPG con R3 = H [Fórmula I]

15 a) 3-acetamido-etilbenzol

20 3-etil-anilina 550 g 4,54 mol
anhídrido acético 1100 ml

25 Dentro de aproximadamente 4 h, se añadieron 550 g de 3-etil-anilina con anhídrido acético. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente (hexano de control de DC / EtOAc 1:1) .La mezcla de reacción se evaporó hasta la sequedad al vacío. El residuo de destilación se destila en alto vacío (Temp.: 210 °C, Temp cabeza: 145 °C).

30 Rendimiento: 710 g de aceite amarillo (96%).

b) 3-acetamido-6-nitro-etilbenzol

35 3-acetamido- etilbenzol 237,0 g 1,452 mol
H₂SO₄ conc. 622 ml
HNO₃ conc. 91,0 g

40 Se añadieron 237,0 g de 3-acetamido-etilbenzol gota a gota a 622 ml de H₂SO₄ conc. en que la temperatura de la mezcla no superó los 20 °C. La mezcla se enfrió a -30 °C. Posteriormente, 91,0 g de HNO₃ conc. se añadieron gota a gota, en el que la temperatura interna de la mezcla no excediese de -20 °C. La mezcla se descongeló a -10 °C y se vertió en 1800 g de hielo. La fase acuosa se separó y se extrajo con 2 x 200 ml de éter. El precipitado de 3-nitro-acetamido- 6-etilbenzol se combinó con los extractos de éter y se disolvió en el mismo. La solución de éter se lavó con 100 ml de agua y se evaporó.

45 c) bromuro de 3-etil-4-nitro-anilinio

50 3-acetamido-6-nitro-etilbenzol (producto bruto) aproximadamente 1,45 mol
ácido bromhídrico (48%) 400 ml

55 El producto en bruto se suspendió en 400 ml de ácido bromhídrico (48%) y se calentó durante 0,5 h hasta ebullición (3 bromuro de 3-etil-4-nitro-anilinio comienza a cristalizar, que se asocia con un aumento significativo del volumen de reacción) . La mezcla se enfrió a temperatura ambiente con agitación y posteriormente se enfrió a 5 °C en hielo. La suspensión se eliminó por aspiración, se resuspendieron en 200 ml de ácido bromhídrico en frío (48%) y se filtró de nuevo, seguido por lavado en el filtro de nutsch con aproximadamente 50 ml de ácido bromhídrico en frío (48%).

60 Rendimiento: 450 g de producto húmedo

d) 3-Bromo-6-nitro-3-etilbenzol

65 bromuro de 3-etil-4-nitro-anilinio aproximadamente 450 g 1,45 mol (producto bruto, húmedo)
ácido bromhídrico (48%) 250 ml
Aqua 400 ml
NaNO₂ 107,6 g
Aqua 550 ml

70 El producto húmedo de la aproximación anterior se suspendió en una solución de 250 ml de ácido bromhídrico (48%) en 400 ml de agua. Se añadió una solución de 107,6 g de NaNO₂ gota a gota a 550 ml de agua en hielo, en que la temperatura de la mezcla no superó los 12 °C. La mezcla se agitó durante 30 min a 0 °C y se filtró.

75 Conversión Sandmayer:

solución sal de diazonio	aproximadamente 1,45 mol
polvo de cobre	84,9 g
CuSO ₄ x 5H ₂ O	212,3 g
ácido bromhídrico (48%)	670 mL

5 Se añadió la solución de sal de diazonio gota a gota a una mezcla de 84,9 g de polvo de cobre, 212,3 g CuSO₄ x 5H₂O y 670 ml de ácido bromhídrico (48%) en hielo, en que la temperatura de la mezcla no superó los 15 °C. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente, se filtró y la fase orgánica se separó. La fase acuosa se extrajo con diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se filtraron en condiciones de uso de una capa delgada de gel de sílice y después se evaporó hasta la sequedad al vacío. Se produjo 167,8 g de producto crudo. El residuo de destilación se destila en alto vacío (Temp.: 155 °C, Temp. cabeza: 85 °C). Rendimiento: 144,3 g de aceite de color amarillo (43% a través de 4 pasos).

10 e) 2-(2-Nitro-5-bromo-fenil) propanol

3-bromo-6-nitro-etilbenzol	309,6 g	1,346 mol	1 Eq
Paraformaldehído	42,4 g	1,413 mol	1,05 Eq
terc-butilato de potasio	37,8 g	0,337 mol	0,25 Eq
DMSO	900 ml		

15 20 A una solución de 309,6 g de 3-bromo-6-nitro- etilbenzol y 42,4 g de paraformaldehído en 300 ml de DMSO, se añadieron 37,8 g de terc-butilato de potasio en pequeñas porciones, en que la temperatura aumentó a 40-50 °C. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió a la mezcla 900 ml de tolueno y se lavó con 3x 450 ml de NaOH acuoso (10%) y posteriormente con 450 ml de agua. La fase orgánica se evaporó hasta la sequedad al vacío. Proporcionó 319 g de producto en bruto, que luego se purificó usando cromatografía: Columna: 700 g de gel de sílice, diámetro 8,5 cm, equilibrada con n-hexano. El producto en bruto se disolvió en 100 ml de tolueno y se cargó en la columna. La elución se realizó utilizando el siguiente gradiente: 2,5 L de n-hexano,

Acetato de etilo / n-hexano	1:100	1 L
	1:50	1,5 L
	1:20	1 L
	1:6	2 L
	1:5	1,5 L

35 Rendimiento: 236,06 g de 2-(2-Nitro-5-bromo-fenil) propanol (67%).

f) PhSNPPOH sin grupo etilo

Br-NPPOH	5,0 g	0,0192 mol	1 Eq
Ph-SH	2,3 g	0,0211 mol	1,1 Eq
K ₂ CO ₃	4,5 g	0,0326 mol	1,7 Eq
DMF	50 ml		

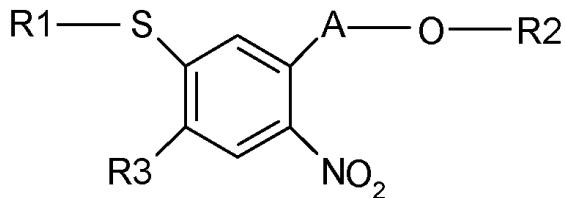
40 45 Una mezcla de los componentes enumerados anteriormente se mezclaron 3 horas a 120 °C y luego durante la noche a 70 °C. La mezcla de reacción se evaporó hasta la sequedad al vacío. Se añadió diclorometano al residuo de destilación y se lavó con agua, con hidróxido de sodio diluido y de nuevo con agua. La fase orgánica se evaporó y se purificó usando cromatografía (fase estacionaria: gel de sílice equilibrada con iso-hexano; Gradiente: iso-hexano / acetato de etilo 5% de iso-hexano / 20% acetato de etilo).

50 Rendimiento: 2,7 g de aceite rojo-marrón (48%)

REIVINDICACIONES

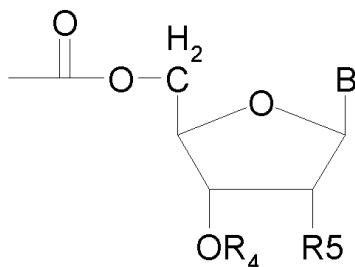
1. Un compuesto con la fórmula

[Fórmula Ia]



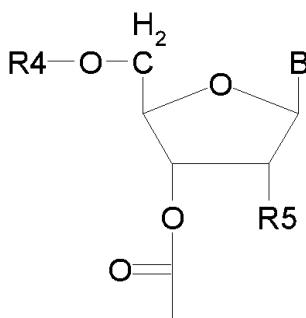
10 R1 es un grupo heteroarilo o arilo sustituido o no sustituido, y R3 es H, un grupo metilo o un grupo etilo, y en el que R2 es

[Fórmula II]



15 o en el que R2 es

[Fórmula III]



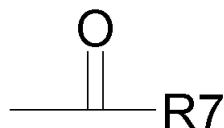
20 en el que R4 es H, forma una fosforamidita, H fosfonato o triéster de fosfato y

en el que R5 es H, OH, un halógeno o XR₆, en el que X es O o S y R6 es H, un grupo alquilo, grupo arilo, o OR₆ forma una porción fosforamidita, fosfodiéster, fosfotriéster, H-fosfonato o un acetal o porción de silicona y

25 en el que B se selecciona entre el grupo que consiste en adenina, citosina, guanina, timina, uracilo, 2,6-diaminopurina-9-ilo, hipoxantina-9-ilo, 5-metilcitosinil-1-ilo, 1-ilo ácido 5-amino-4-imidazolcarboxílico o amida-3-ilo ácido 5-amino-4-imidazolcarboxílico, en el que cuando B es adenina, citosina o guanina el grupo amino primario tiene opcionalmente un grupo protector o cuando B es timina o uracilo en la posición O⁴ es opcionalmente un grupo protector, o

30 en el que R₂ es

[Fórmula IV]



en el que R7 es un aminoácido natural, un aminoácido no natural o un derivado de aminoácido formando un enlace uretano de fórmula Ia, o

- 5 cuando la fórmula IV representa la función carboxi de un aminoácido natural, un aminoácido no natural o un derivado de aminoácido, formando un enlace éster con la fórmula Ia.
- 10 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza en que R1 es un grupo fenilo, un grupo terc-butil-fenilo, un grupo 1- o 2-naftilo o un grupo 2-piridilo.
- 15 3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que se caracteriza en que A es $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$.
- 15 4. El compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, que se caracteriza en que R3 es H o un grupo etilo.
- 15 5. El compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, que se caracteriza en que R4 es H y R5 es H.
- 20 6. El compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, que se caracteriza en que B se selecciona del grupo que consiste de adenina, citosina, guanina, timina o uracilo.
- 20 7. El compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque, cuando B es adenina, citosina o guanina el grupo protector es fenoxiacetilo-, 4-terc-butil-fenoxiacetilo-, residuos 4-isopropil-fenoxiacetilo- o dimetilformamidino-, cuando B es adenina el grupo protector es benzoilo o residuos p-nitro-fenil-etoxi-carbonilo (p-NPOC), cuando B es guanina el grupo protector es isobutiroilo-, p-nitrofeniletilo (p-NPE) o residuos p-NPEOC- y cuando B es citosina el grupo protector es benzoilo, isobutirilo- o residuos p-NPEOC.
- 25 8. El compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, que se caracteriza en que R7 es un aminoácido natural.
- 30 9. El uso del compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 como grupo protector fotoactivable utilizando fotolitografía sin máscara.
- 35 10. El uso del compuesto de acuerdo con la reivindicación 7 para la síntesis de array de DNA basado en fotolitografía sin máscara como grupo protector de OH intermedio o permanente en derivados de nucleósidos en el extremo 3'-OH o el extremo 5'-OH.
- 35 11. El uso del compuesto de acuerdo con la reivindicación 8 para la síntesis de array de péptidos basado en fotolitografía sin máscara como el grupo NH-protector en aminoácidos.
- 40 12. El uso del compuesto de acuerdo con la reivindicación 8 para la síntesis de array de péptidos basado en fotolitografía sin máscara como el grupo COOH-protector en aminoácidos.
- 45 13. El uso del compuesto de acuerdo con la reivindicación 8 para la síntesis basada en la fotolitografía sin máscara de hidratos de carbono como el grupo protector de OH.
- 45 14. El uso del compuesto de acuerdo con la reivindicación 8 para protectores ortogonales estrategia de grupo como grupo SH-protector.
- 50 15. El uso del compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 8 a 13, caracterizado en que la luz se utiliza para la fotolitografía sin máscara que tiene una longitud de onda de 374 a 405 nm, preferiblemente de 390 nm.
- 50 16. Un método para preparar un esqueleto diarilsulfuro que contiene un grupo protector fotolábil de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende los pasos de
- 55 a) Provisión de p-dietilbenceno como material de partida
- 55 b) La bromación del anillo de fenilo
- 55 c) La nitración del compuesto obtenido en ácido sulfúrico y nítrico en la posición para- del Bromo
- 55 d) Purificación y cristalización
- 55 e) La hidroximetilación del compuesto en la posición bencílica
- 55 f) La conversión del grupo bromo aromático al arilsulfuro usando tiofenol

g) Purificación

h) Conversión del alcohol en clorocarbonato

i) La reacción del clorocarbonato con un nucleósido y la reacción del nucleósido con un agente de fosfitilación, o reacción del clorocarbonato con un derivado de aminoácido.

5

17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, que se caracteriza en que R1 es un grupo fenilo, un grupo terc-butilo-fenilo, un grupo 1- o 2-naftilo o un grupo 2-piridilo.

10

18. El método de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, que se caracteriza en que A es $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 16 a 18, que se caracteriza en que R3 es H o un grupo etilo.

Fig. 1

Solvente	Vida media	Long. onda irradiación	Experimento N°	Series	Tiempo exposición
DMSO	2.1 s	390 nm	SB10-132	1324	2,4,6,8,12 s
DMSO	2.4 s	390 nm	SB10-132A	1341	2,4,6 s
DMSO + 1 % Imidazol	3.7 s	390 nm	SB10-132	1325	2,4,6,8,12 s
NMP	2.6 s	390 nm	SB10-132	1326	2,4,6,8,12 s
NMP + 0.5 % Hidroxilamina	1.8 s	390 nm	SB10-132	1327	2,4,6,8,12 s
MeCN	2.2 s	390 nm	SB10-132	1328	2,4,6,8,12 s
MeCN + 1 % H ₂ O	2.0 s	390 nm	SB10-132	1329	2,4,6,8,12 s
MeCN + 1 % H ₂ O + 1 % Imidazol	2.1 s	390 nm	SB10-132	1330	2,4,6,8,12 s
MeCN + 16.3 % H ₂ O	2.9 s	390 nm	SB10-132A	1335	2,4,6,8 s
MeCN + 16.3 % H ₂ O + 1 % Imidazol	2.3 s	390 nm	SB10-132A	1336	2,4,6,8 s
Isopropanol	4.1 s	390 nm	SB10-132A	1337	2,4,6,8 s
Isopropanol + 1 % Imidazol	3.3 s	390 nm	SB10-132A	1338	2,4,6,8 s
Isopropanol + 12 % H ₂ O	4.3 s	390 nm	SB10-132A	1339	2,4,6,8 s
Isopropanol + 12 % H ₂ O + 1 % Imidazol	2.2 s	390 nm	SB10-132A	1340	2,4,6,8 s

Fig. 2

Solvente	Vida media	Long. onda irradiación	Experimento N°	Series	Tiempo exposición
DMSO	3.3 min	404 nm	SB10-128		1,2,3,4 min
DMSO + 1 % Imidazol	2.5 min	404 nm	SB10-128		1,2,3,4 min
DMSO	3.8 min	404 nm	SB10-130		1,2,3,5 min
DMSO + 1 % Imidazol	2.9 min	404 nm	SB10-130		1,2,3,5 min
NMP	2.1 min	404 nm	SB10-130		1,2,3,5 min
NMP + 0.5 % Hidroxilamina	1.8 min	404 nm	SB10-130		1,2,3,5 min
MeCN	3.0 min	404 nm	SB10-130		1,2,3,5 min
MeCN + 1 % H ₂ O	3.1 min	404 nm	SB10-130		1,2,3,5 min
MeCN + 1 % H ₂ O + 1 % Imidazol	2.6 min	404 nm	SB10-130		1,2,3,5 min
Isopropanol	5.6 min	404 nm	SB10-139		1,2,3,5 min
Isopropanol + 1 % Imidazol	3.8 min	404 nm	SB10-139		1,2,3,5 min

Fig. 3

Compuesto	PM	M1 365 nm	M2 365 nm	M1 390 nm	M2 390 nm	M1 404 nm	M2 404 nm	$\epsilon(365 \text{ nm})$	$\epsilon(390 \text{ nm})$	$\epsilon(404 \text{ nm})$
NPPOC-Phe	449,49	0,066	0,069	0,014	0,016	0,003	0,004	302,4	67,0	16,3
BTs-Phe	553,53	0,095	0,094	0,019	0,019	0,005	0,005	522,4	104,4	26,7
NaphS-Phe	635,68	0,869	0,858	0,334	0,330	0,133	0,131	5489,3	2111,1	839,5
Phs-Phe	585,63	0,771	0,765	0,263	0,262	0,094	0,094	4497,8	1536,5	551,3
PyS-Phe	586,61	0,346	0,340	0,090	0,088	0,026	0,026	2014,0	522,6	151,8

Fig. 4a) 2-(2-nitro-4-etil-5-tiofenil-fenil)propanol ("PhSNPPOH")

2,5-Dietil-bromobenceno

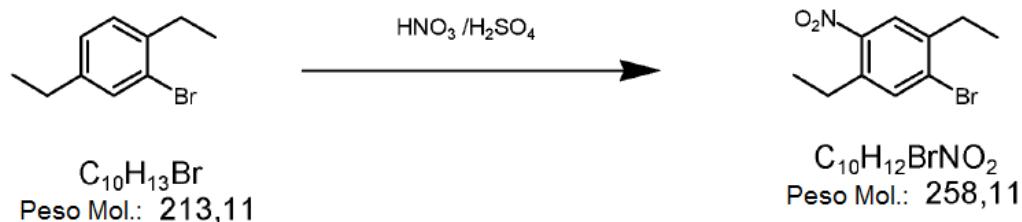
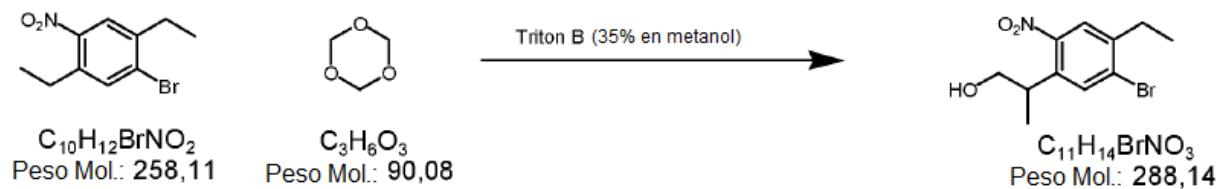
b) 2,5-Dietil-4-nitro-bromobencenoc) 2-(2-Nitro-4-etil-5-bromofenil)propan-1-ol ("BrEtNPPOH")

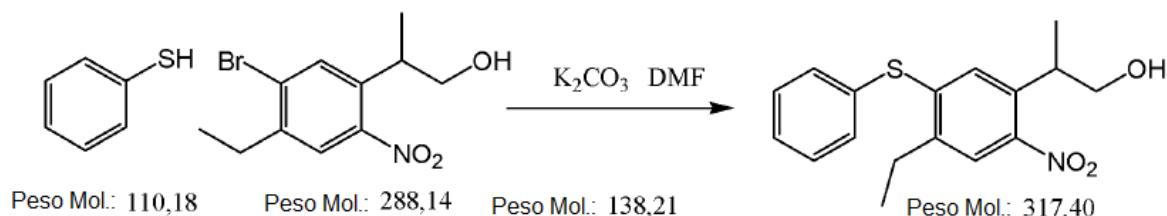
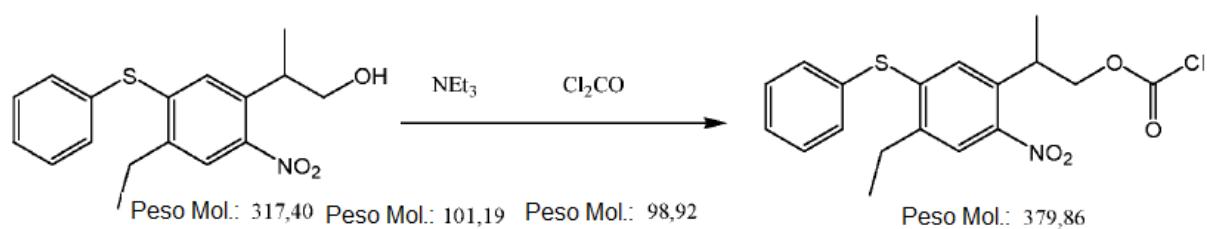
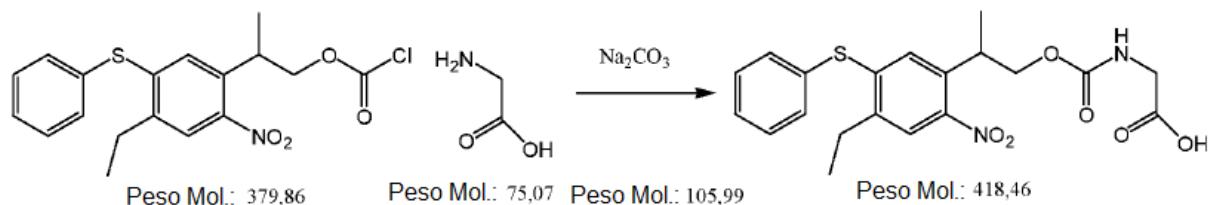
Fig. 4 cont.d) 2-(2-Nitro-4-ethyl-5-tiofenilfenil)propanol (PhSNPPOH)e) Clorocarbonato de 2-(2-Nitro-4-ethyl-5-tiofenilfenil)propanol ("PhSNPPOC-Cl")f) PhSNPPOC-Glicina-OH

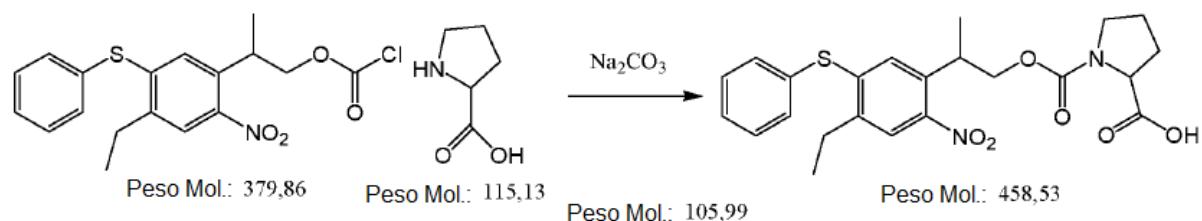
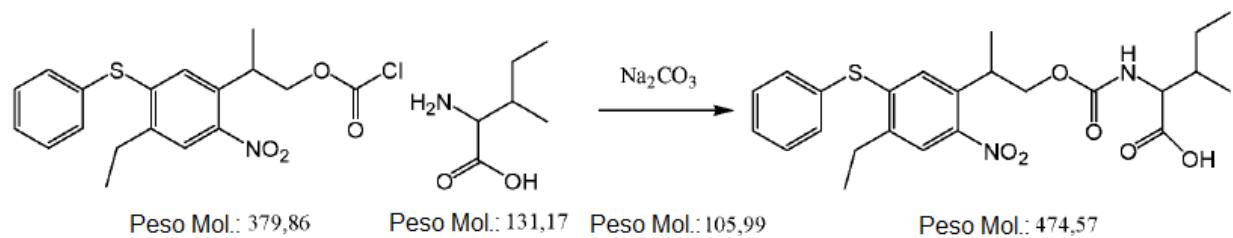
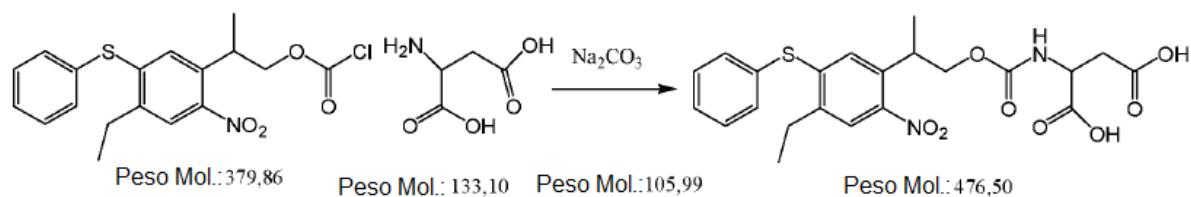
Fig. 4 cont.g) PhSNPPOC-Prolina-OHh) PhSNPPOC-Isoleucina-OHi) PhSNPPOC-Ácido aspártico-OH

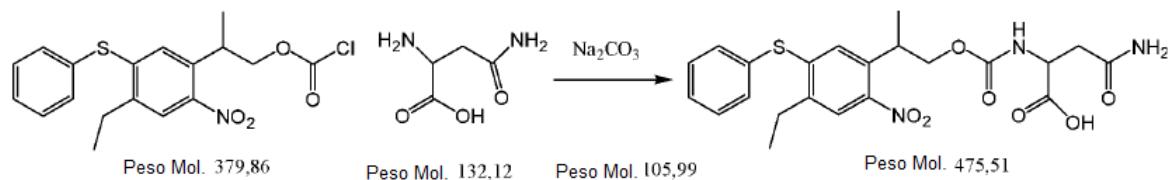
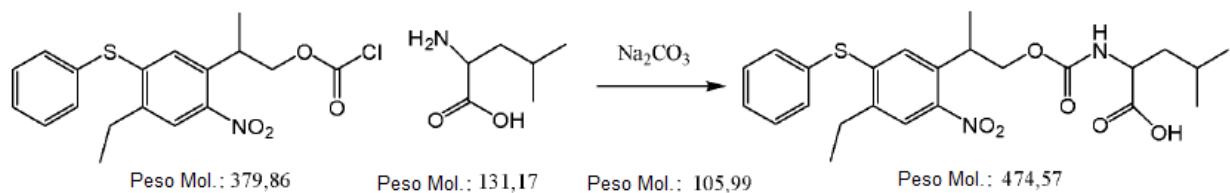
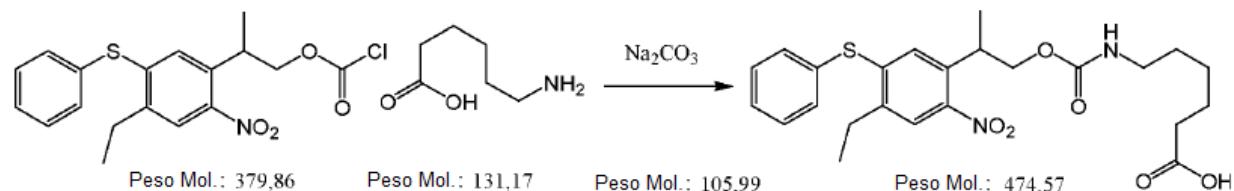
Fig. 4 cont.j) PhSNPPOC-Asparagina-OHk) PhSNPPOC-Leucina-OHl) PhSNPPOC-C₆-Espaciador

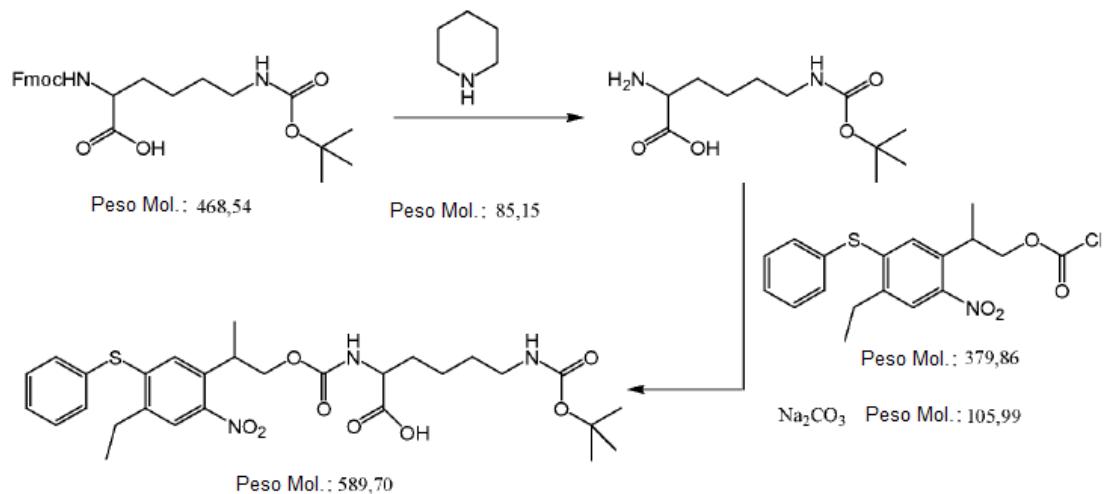
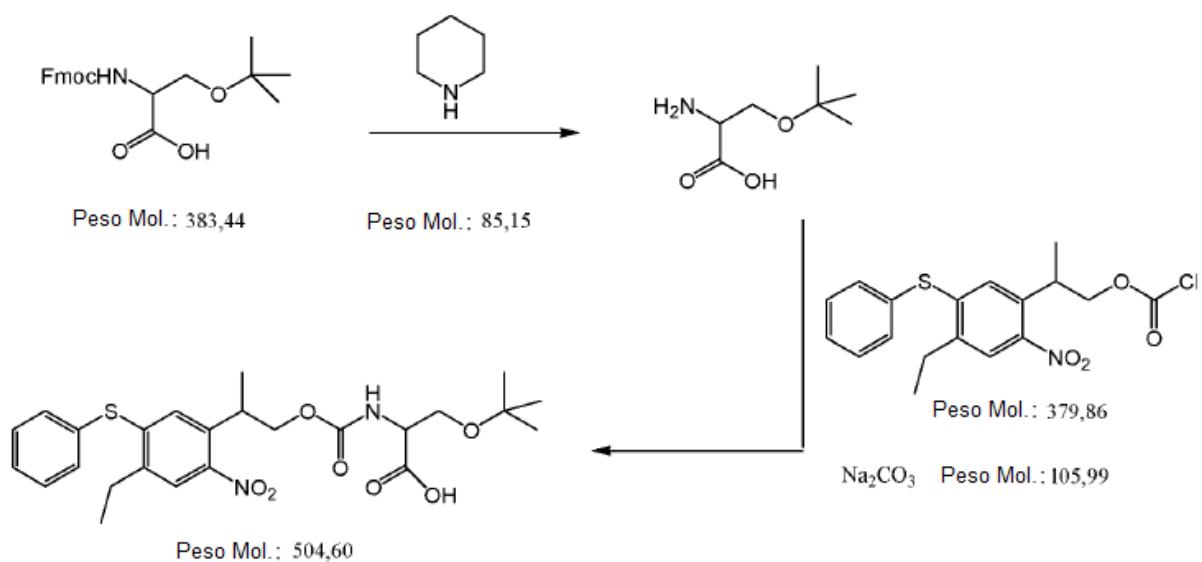
Fig. 4 cont.m) PhSNPPOC-Lisina(Boc)-OHn) PhSNPPOC-Serina(t-Bu)-OH

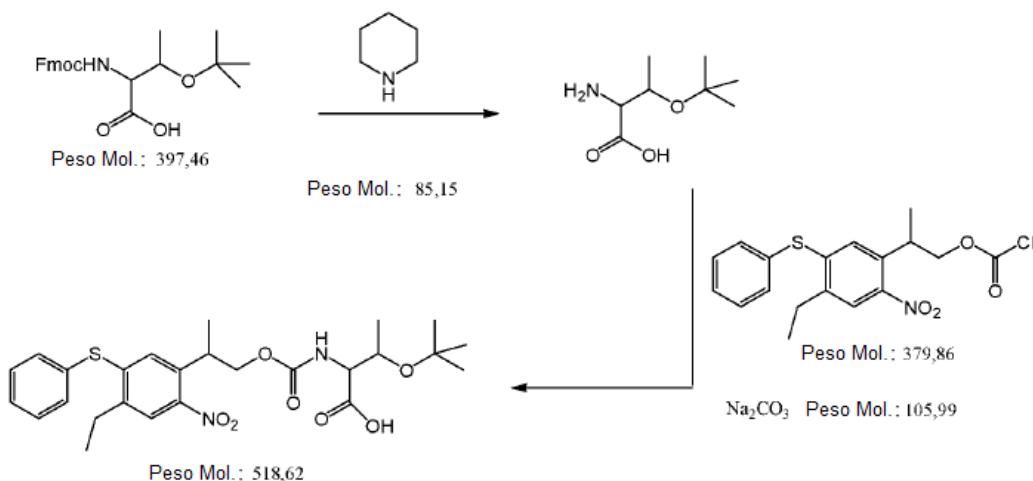
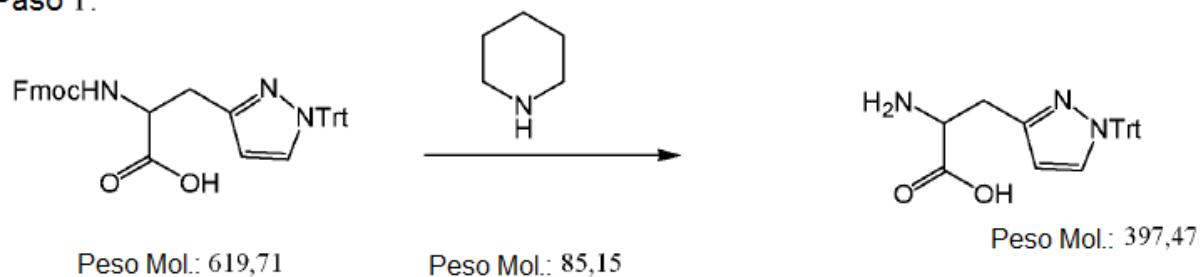
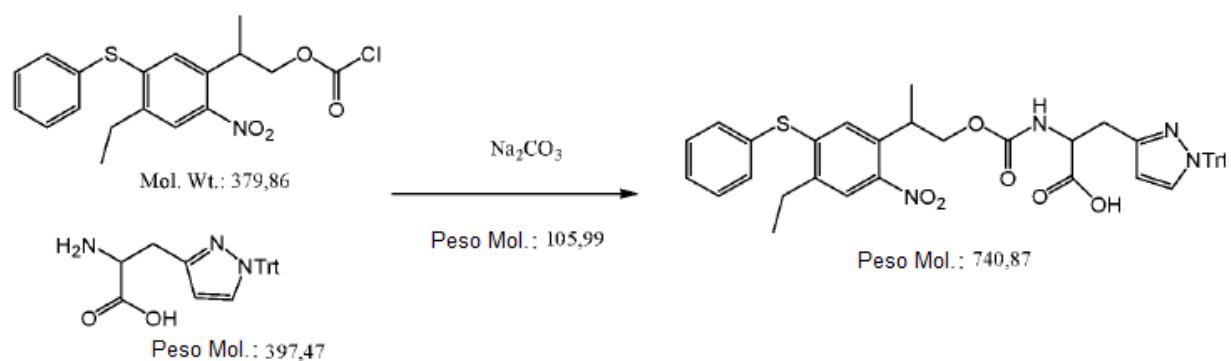
Fig. 4 cont.o) PhSNPPOC-Treonina(t-Bu)-OHp) PhSNPPOC-Histidina(Trt)-OH**Paso 1:****Paso 2:**

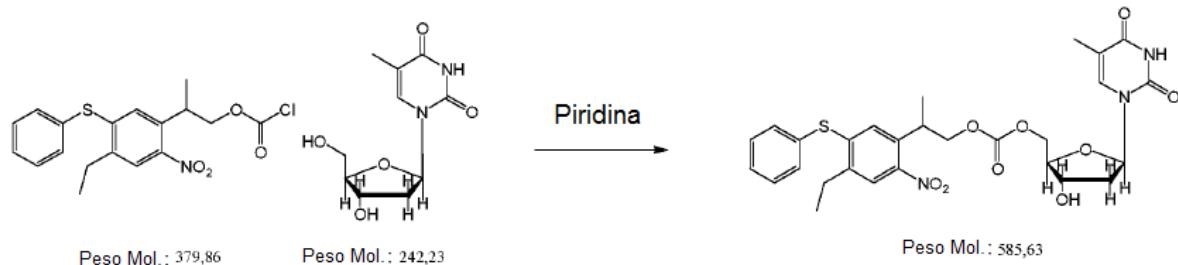
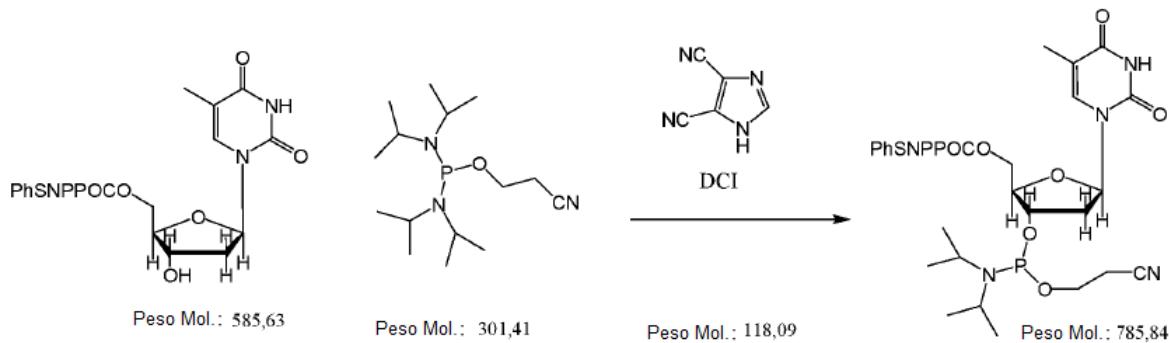
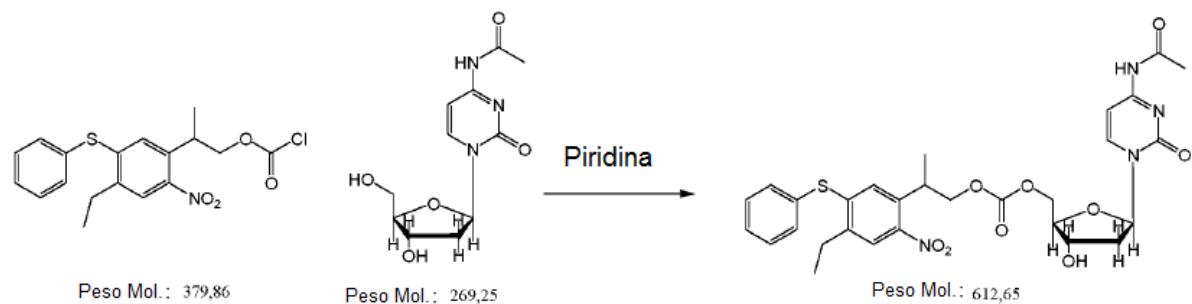
Fig. 5a) 5'-PhSNPPOC-dTb) 5'-PhSNPPOC-dT-3'-PAc) 5'-PhSNPPOC-dC^{Ac}

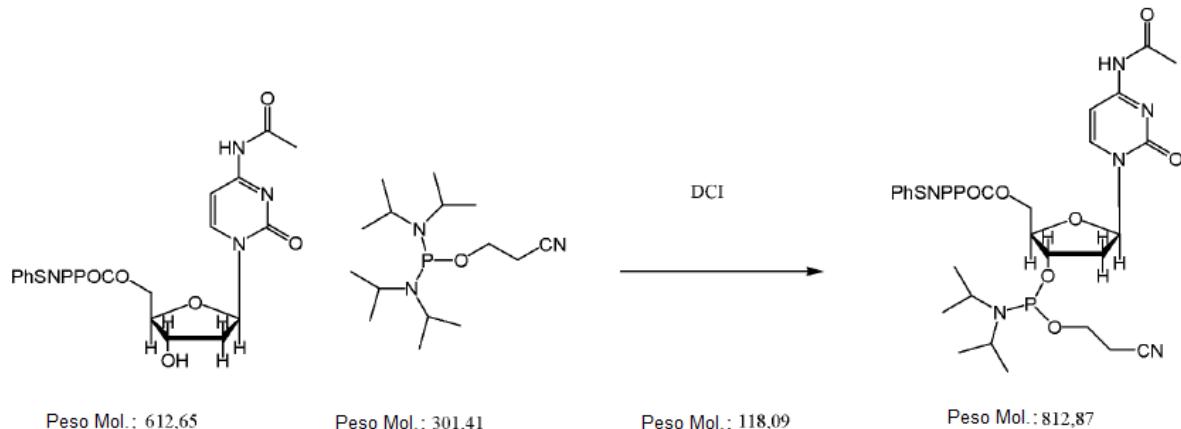
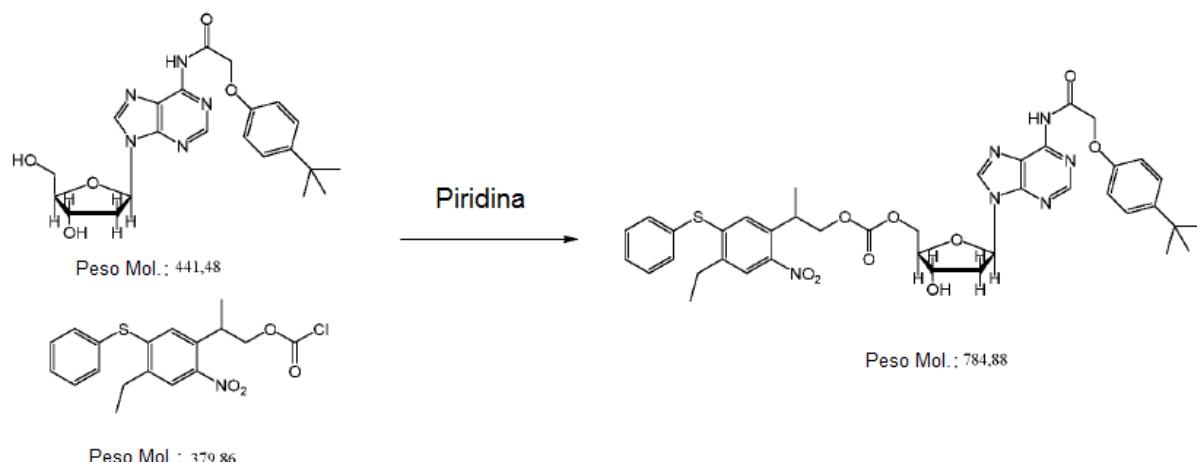
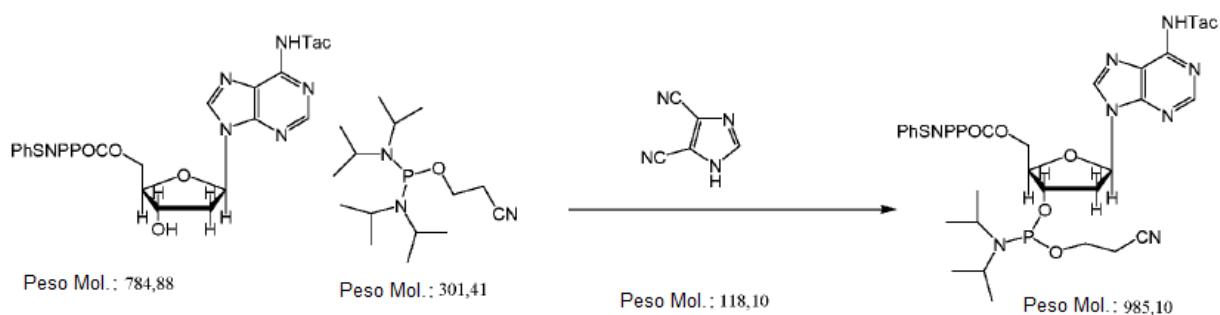
Fig. 5 cont.d) 5'-PhSNPPOC-dC^{Ac}-3'-PAe) 5'-PhSNPPOC-dA^{tac}f) 5'-PhSNPPOC-dA^{tac}-3'-PA

Fig. 5 cont.

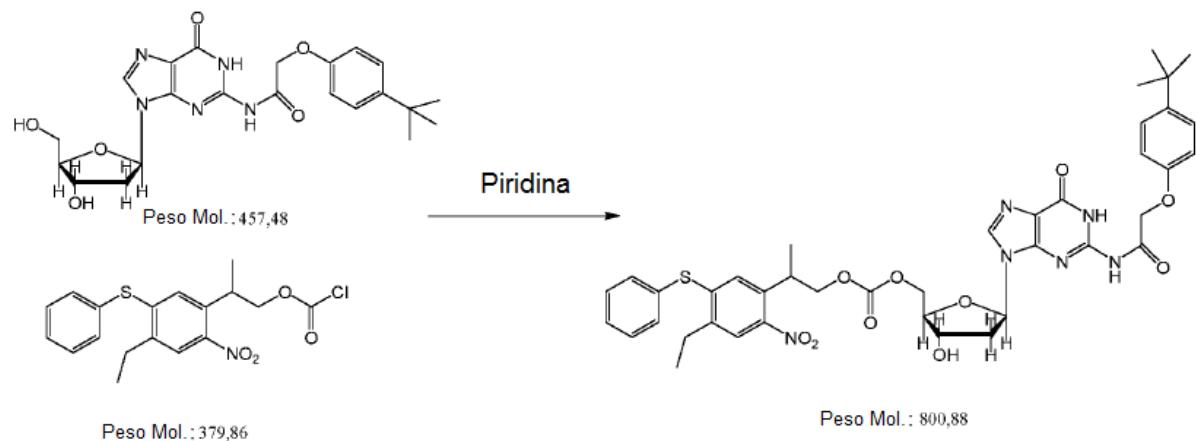
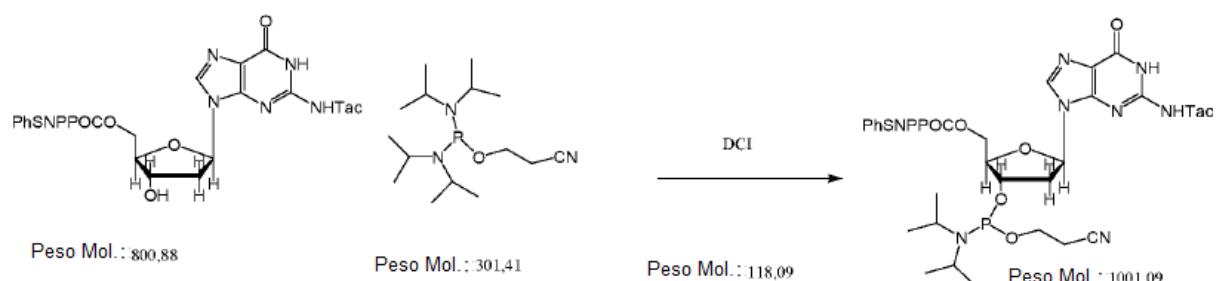
g) 5'-PhSNPPOC-dG^{tac}h) 5'-PhSNPPOC-dG^{tac}-3'-PA

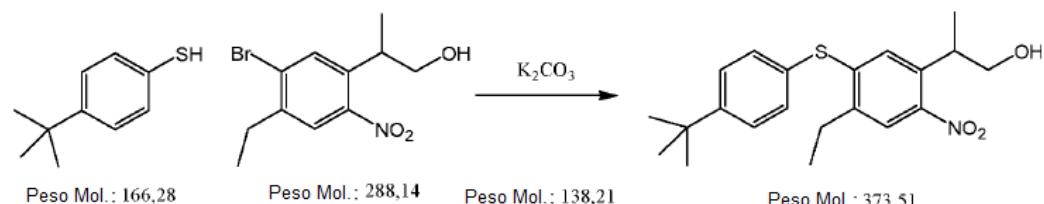
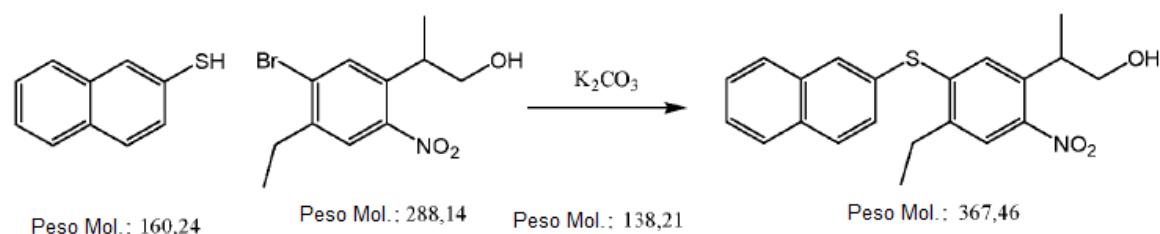
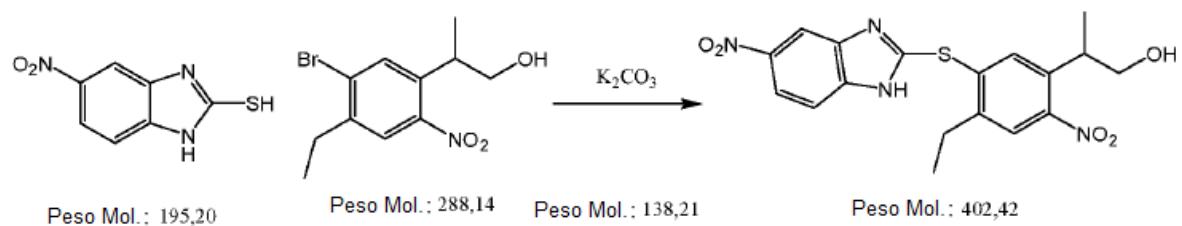
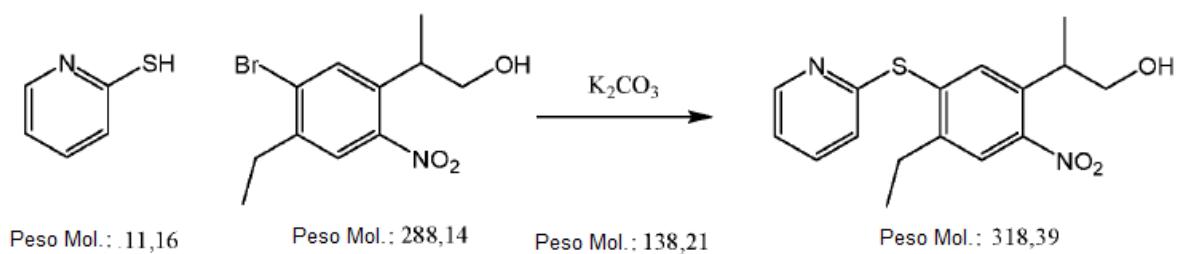
Fig. 6**a) 5-(t-Butilfenil-tio)-4-etil-2-nitrofenil-2'-propan-1'-ol (t-butiltio-NPPOH)****b) Naftil-tio-NPPOH****c) Nitrobencimidazol-S-NPPOH****d) Piridil-S-NPPOH**

Fig. 6 cont.

e) 2,5-Dietil-4-fenoxi-nitrobenceno

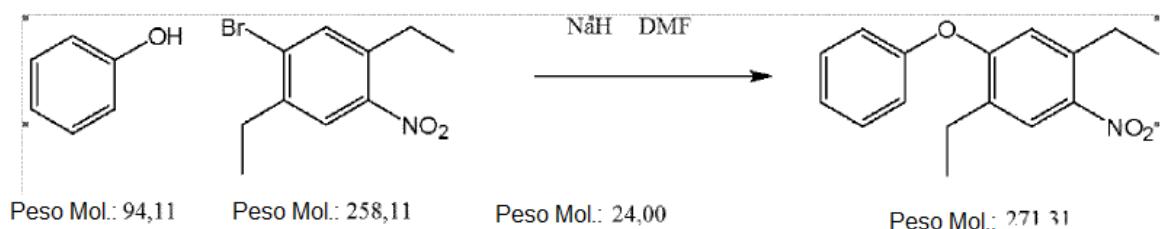


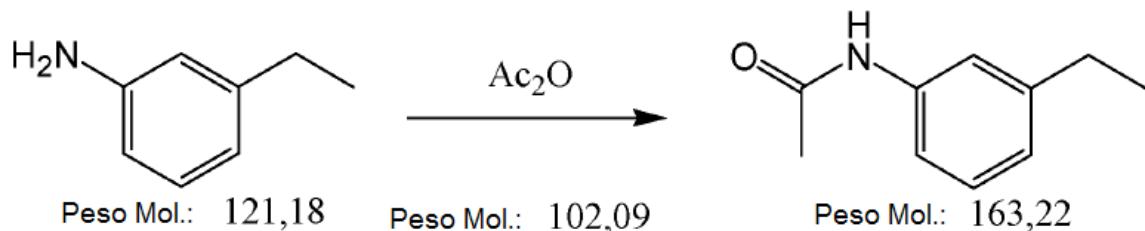
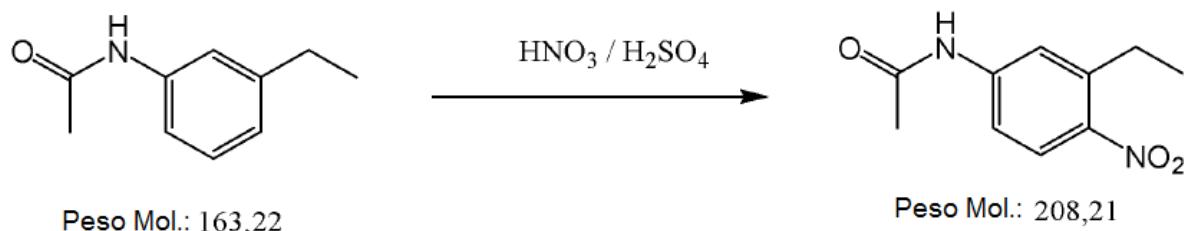
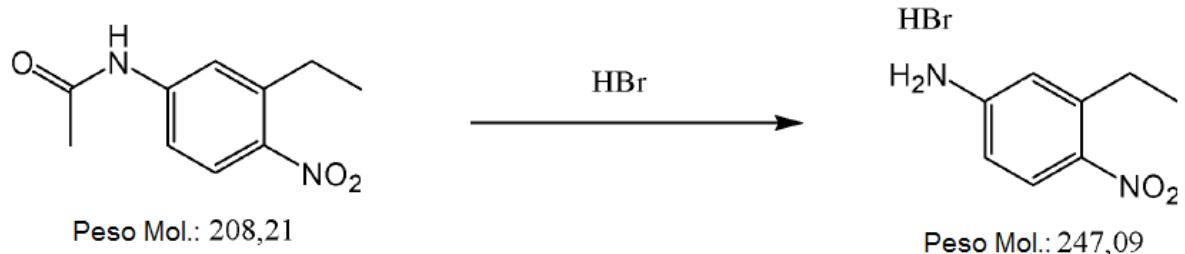
Fig. 7a) 3-Acetamido-ethylbenzolb) 3-Acetamido-6-nitro-ethylbenzolc) Bromuro de 3-ethyl-4-nitro-anilinio

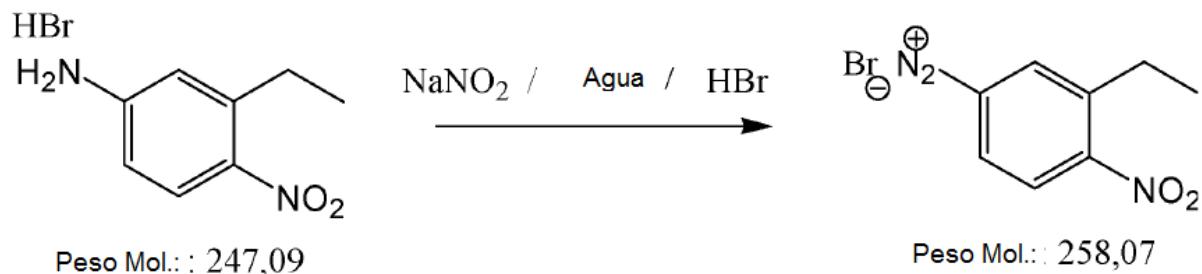
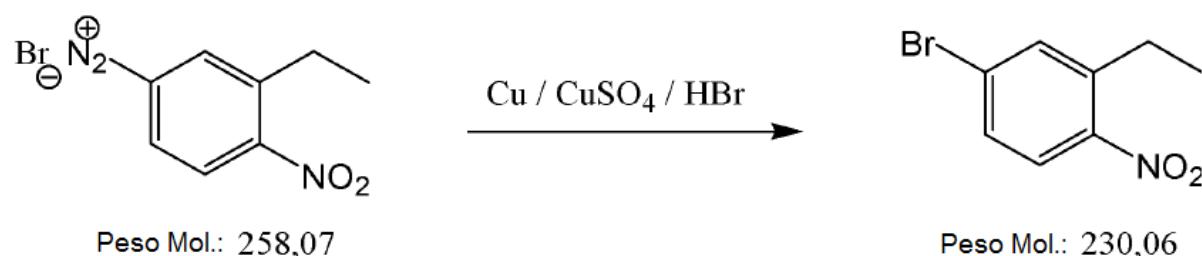
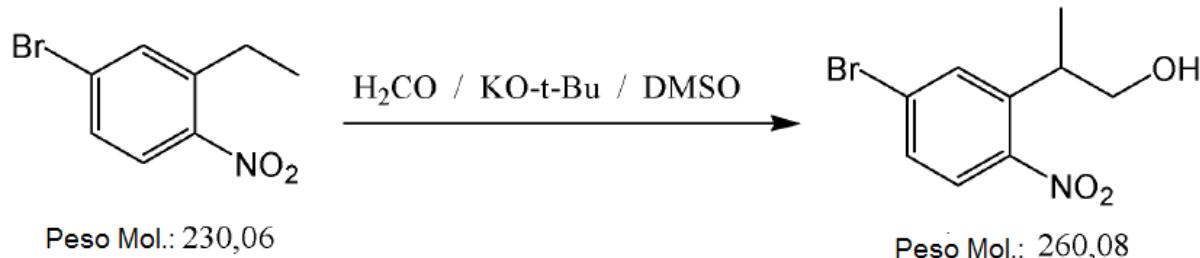
Fig. 7 cont.d) 3-Bromo-6-nitro-etilbenzolReacción de Sandmayere) 2-(2-Nitro-5-bromo-fenil)propanol

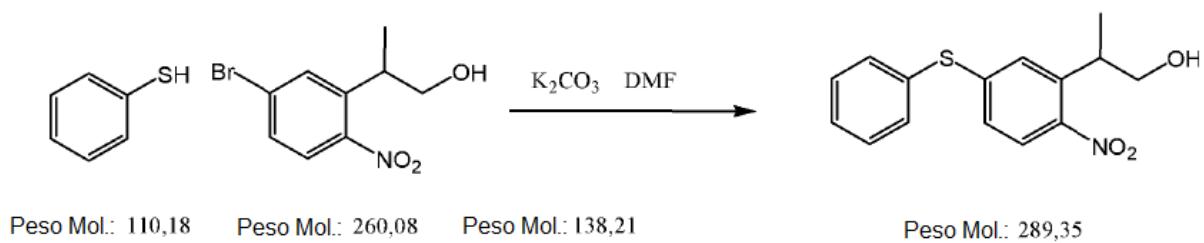
Fig. 7 cont.f) PhS-NPPOH

Fig. 8

a)

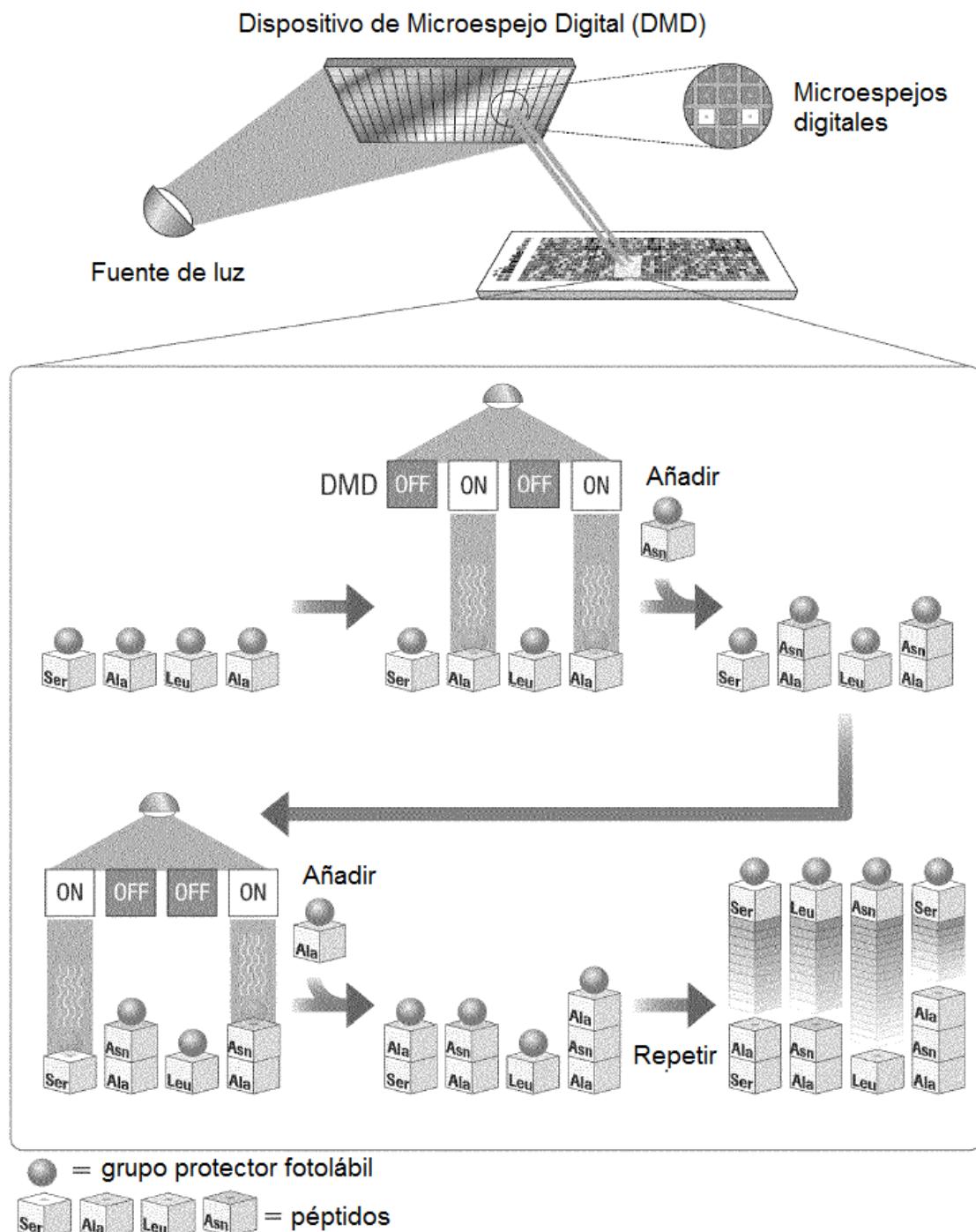


Fig. 8 cont.

b)

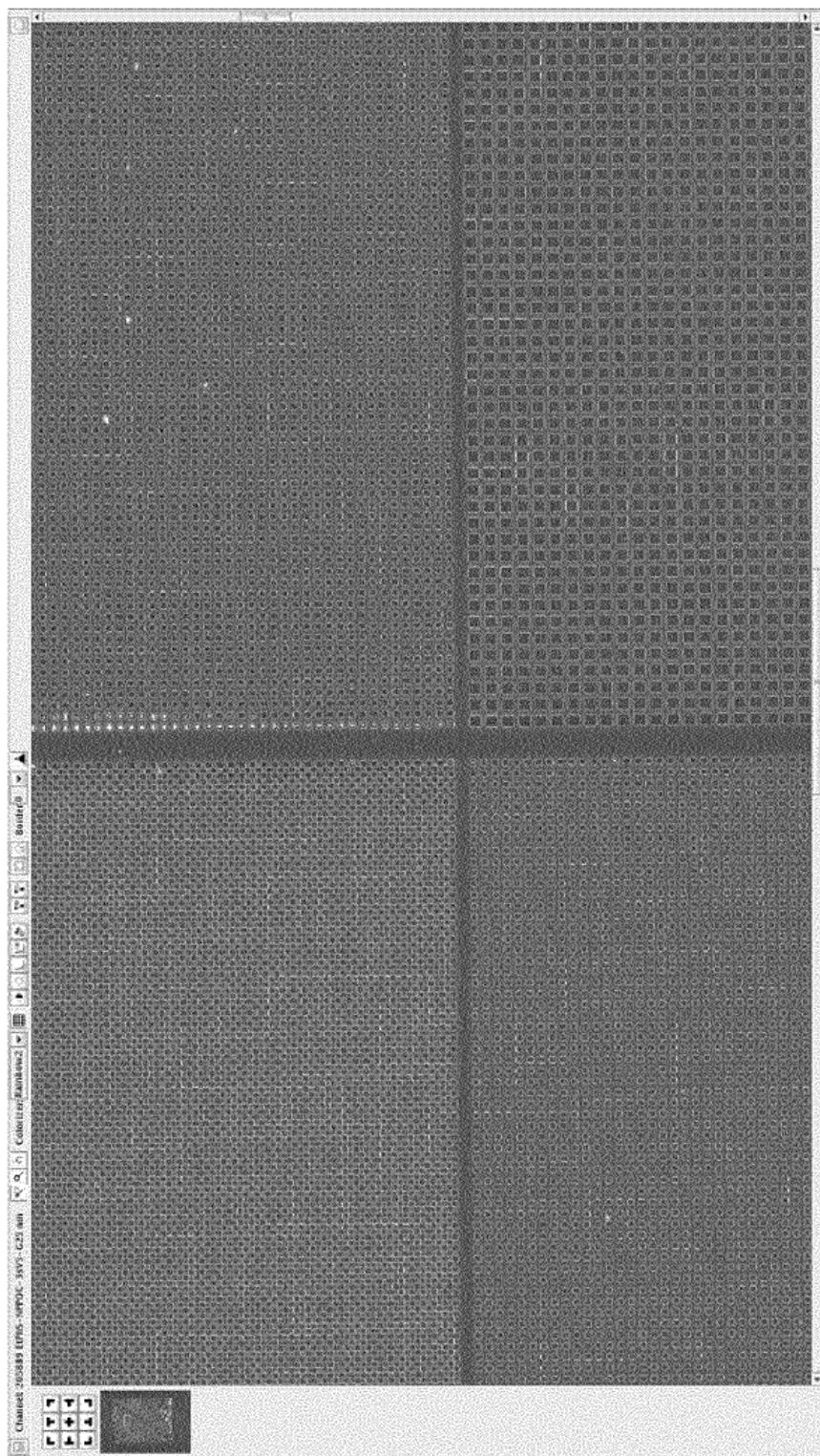


Fig. 8 cont.

c)

