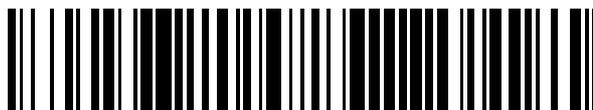


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 067**

51 Int. Cl.:

C07F 5/02 (2006.01)

C07F 5/04 (2006.01)

C07F 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2011 E 11810488 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2596000**

54 Título: **Aparato y métodos para la síntesis automática de moléculas pequeñas**

30 Prioridad:

23.07.2010 US 367176 P

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

16.09.2016

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE
UNIVERSITY OF ILLINOIS (100.0%)
352 Henry Administration Building 506 South
Wright Street
Urbana, Illinois 61801, US**

72 Inventor/es:

**BURKE, MARTIN, D.;
GILLIS, ERIC, P. y
BALLMER, STEVEN G.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

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

ES 2 583 067 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

Aparato y métodos para la síntesis automática de moléculas pequeñas

5 Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de patente de Estados Unidos n.º 61/367.176, presentada el 23 de julio de 2010.

10 Financiación gubernamental

La presente invención se ha realizado con financiación del gobierno de Estados Unidos, a través de las becas de los National Institutes of Health con números GM080436 y GM090153. El gobierno tiene determinados derechos sobre la invención.

15 Antecedentes

20 Análogamente a los péptidos, oligonucleótidos, y oligosacáridos, la mayoría de productos naturales de molécula pequeña tienen una construcción muy modular. Esto se debe, como los oligómeros anteriormente mencionados, a que la mayoría de pequeñas moléculas se biosintetizan mediante el acoplamiento secuencial de bloques de construcción bifuncionales. Específicamente, los policétidos se derivan de múltiples unidades de malonil-CoA y/o metmalonil-CoA, los péptidos no ribosómicos se construyen a partir de aminoácidos, los politerpenos se pegan entre sí a partir de bloques de construcción de pirofosfato de isopentenilo y/o pirofosfato de dimetilmetilalilo, y los ácidos grasos se preparan a partir de fragmentos de malonil-CoA. Otras clases de productos naturales modulares son el resultado del acoplamiento oxidativo de bloques de construcción comunes, tales como ácido siquímico, aminoácidos, y/o sus correspondientes derivados.

30 Con los péptidos, oligonucleótidos, y cada vez más oligosacáridos, esta modularidad inherente se aprovecha actualmente de forma rutinaria para realizar síntesis completamente automatizadas a partir de bloques de construcción bifuncionales adecuadamente protegidos (R.B. Merrifield, Science 1965, 150, 178-185; M.H. Caruthers, Science 1985, 24, 799; y O.J. Plante, M.R. Palmacci, P.H. Seeberger, Science 2001, 291, 1523). Como resultado directo de estos avances, la investigación en este campo se ha centrado principalmente en el descubrimiento y comprensión de la nueva función molecular. En marcado contraste, a pesar de los importantes avances realizados durante casi dos siglos, la síntesis de laboratorio de moléculas pequeñas sigue siendo un proceso relativamente complejo, inflexible y no sistematizado practicado casi exclusivamente por especialistas muy bien formados. (Para el desarrollo pionero en la síntesis automatizada de moléculas pequeñas a través de asistencia de polímero y/o química de flujo, véase: a) C.H. Hornung, M.R. Mackley, I.R. Baxendale y S.V. Ley y, Org. Proc. Res. Dev. 2007, 11, 399-405; b) Nikzad Nikbin, Mark Ladlow, y Steven V. Ley Org. Process Res. Dev. 2007, 11, 458-462; y c) France, S.; Bernstein, D.; Weatherwax, A.; Lectka, T. Org. Lett. 2005, 7, 3009-3012.) Por tanto, la investigación en este campo se ha desplazado en gran medida hacia la síntesis. Dadas las especiales características de muchas moléculas pequeñas, que las convierten en únicamente adecuadas para una amplia gama de aplicaciones en ciencia, ingeniería, y medicina, sería muy alentador disponer de un mayor acceso a este tipo de compuestos mediante una plataforma de síntesis generalista y automatizada que sea accesible a los no expertos. Finalmente, dicho proceso podría ayudar a desplazar el foco principal de la síntesis de las moléculas pequeñas hacia el descubrimiento y la comprensión de las importantes funciones de las moléculas pequeñas.

Sumario

50 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, obviando la necesidad de cualquier enlace covalente a un soporte sólido, la purificación de los compuestos intermedios se realiza aprovechando dos propiedades físicas notablemente generales de los boronatos de MIDA: la capacidad para capturar y liberar la cromatografía en gel de sílice; y su insolubilidad en hexanos.

55 Específicamente, la invención actualmente reivindicada proporciona un método para purificar un boronato del ácido N-metiliminodiacético (MIDA) a partir de una solución, que comprende las etapas de diluir la solución con hexano, precipitando selectivamente, de esta forma, el boronato de MIDA; y aislar el boronato de MIDA precipitado, en la que la solución que comprende el boronato de MIDA es una solución de THF. Las realizaciones y ventajas adicionales de la invención se describen con más detalle a continuación.

60 Breve descripción de las figuras

La Figura 1A representa gráficamente estrategias análogas para la síntesis de péptidos y moléculas pequeñas.

65 La Figura 1B es una representación esquemática de los ciclos iterativos ilustrativos de desprotección, acoplamiento cruzado, y purificación con una etapa final de acoplamiento cruzado con liberación directa, en el que, en cada acoplamiento, se utilizan aproximadamente 3 equivalentes de ácido borónico con respecto a cada haluro.

- La Figura 1C representa gráficamente dos estrategias diferentes para purificar compuestos intermedios de boronato de MIDA. La primera estrategia es una "purificación mediante captura y liberación" y aprovecha la alta afinidad de los boronatos de MIDA por el gel de sílice. Específicamente, una mezcla de producto crudo se carga sobre un lecho de gel de sílice, que a continuación se lava con Et₂O/MeOH. Aunque todos los subproductos se eluyen rápidamente en esta mezcla de disolventes polares, los boronatos de MIDA muestran especialmente una retención infinita. De forma notable, el fenómeno de "captura" es general para cualquier compuesto que contiene el grupo funcional de boronato de MIDA. El mero cambio del disolvente al tetrahidrofurano (THF), sin embargo, "libera" el boronato de MIDA en forma de una solución adecuada para su uso en la reacción de desprotección posterior. La segunda estrategia es una "purificación por precipitación" y aprovecha la insolubilidad general de los boronatos de MIDA en hexanos. Específicamente, una mezcla de reacción bruta en THF se transfiere a una cámara que contiene hexanos. El boronato de MIDA precipita, y se separa de los subproductos de reacción solubles mediante filtración. Un recipiente de purificación híbrido personalizado se puede utilizar para aprovechar ambos procesos de purificación en serie, proporcionando de esta forma un método general y muy sólido para la purificación automatizada de compuestos intermedios de boronato de MIDA sin necesidad de su unión covalente a un soporte sólido.
- La Figura 1D representa gráficamente una fotografía de una realización de un sintetizador de moléculas pequeñas completamente automatizado que comprende módulos para la (i) desprotección, (ii) acoplamiento cruzado, y (iii) purificación, todos ellos bajo el control de un ordenador equipado con un programa informático diseñado por el usuario.
- La Figura 2 representa gráficamente ejemplos de reacciones que se pueden llevar a cabo en un sintetizador, en la que D representa una etapa de desprotección, CC representa una etapa de acoplamiento cruzado, P representa una etapa de purificación, y RCC representa una etapa de acoplamiento cruzado con liberación *in situ* lenta o rápida del éster de ácido borónico/borónico.
- La Figura 3 representa gráficamente bloques de construcción seleccionados, incluyendo bloques de construcción de ácido haloborónico bifuncional como los correspondientes boronatos de ácido N-metiliminodiacético (MIDA), y compuestos que se pueden preparar a partir de dichos bloques de construcción.
- La Figura 4 representa gráficamente bloques de construcción seleccionados, incluyendo bloques de construcción de ácido haloborónico bifuncional como los correspondientes boronatos de ácido N-metiliminodiacético (MIDA), y compuestos que se pueden preparar a partir de dichos bloques de construcción.
- La Figura 5 representa gráficamente (parte superior) un diseño esquemático de una realización de un sintetizador automatizado de moléculas pequeñas y (parte inferior) un ejemplo de la conectividad de las diferentes bombas, válvulas, puertos y tubos; en la que (1) denota depósitos de disolventes; (2) denota una tabla de secado y desgasificación; (3) denota un bloque de calentamiento y una placa de agitación; (4) denota válvulas solenoides y colectores de gases; (5) denota una tabla de desprotección; (6) denota una tabla de purificación; (7) denota un módulo de válvula (donde un ejemplo de un mapa de válvulas mostrado en la Figura 7); (8) denota bombas de jeringa principales; (9) denota una bomba de jeringa para la purificación; y (10) denota una bomba de jeringa para reacciones acuosas.
- La Figura 6 representa gráficamente fotografías de tubos de reacción ilustrativos, conducciones y accesorios.
- La Figura 7 representa gráficamente un ejemplo de un mapa de válvulas.
- La Figura 8 representa gráficamente un ejemplo de un tubo de reacción.
- La Figura 9 es un esquema de un ejemplo de un módulo de desprotección acuoso.
- La Figura 10 representa gráficamente un ejemplo de una cámara de precipitación y una columna de sílice.
- La Figura 11 representa gráficamente un ejemplo de un tubo de secado y desgasificación.
- La Figura 12 es un par de espectros de RMN ¹H correspondientes a (i) una mezcla de reacción simulada que comprende un boronato de MIDA, y (ii) el boronato de MIDA tras su purificación de la mezcla.
- La Figura 13 es un par de espectros de RMN ¹H correspondientes a (i) una mezcla de reacción simulada que comprende un boronato de MIDA, y (ii) el boronato de MIDA tras su purificación de la mezcla.
- La Figura 14 es un par de espectros de RMN ¹H correspondientes a (i) una mezcla de reacción simulada que comprende un boronato de MIDA, y (ii) el boronato de MIDA tras su purificación de la mezcla.
- La Figura 15 es un par de espectros de RMN ¹H correspondientes a (i) una mezcla de reacción simulada que comprende un boronato de MIDA, y (ii) el boronato de MIDA tras su purificación de la mezcla.

La Figura 16 es un par de espectros de RMN ^1H correspondientes a (i) una mezcla de reacción simulada que comprende un boronato de MIDA, y (ii) el boronato de MIDA tras su purificación de la mezcla.

5 La Figura 17 es un par de espectros de RMN ^1H correspondientes a (i) una mezcla de reacción simulada que comprende un boronato de MIDA, y (ii) el boronato de MIDA tras su purificación de la mezcla.

La Figura 18 es un par de espectros de RMN ^1H correspondientes a (i) una mezcla de reacción simulada que comprende un boronato de MIDA, y (ii) el boronato de MIDA tras su purificación de la mezcla.

10 La Figura 19 es un par de espectros de RMN ^1H correspondientes a (i) una mezcla de reacción simulada que comprende un boronato de MIDA, y (ii) el boronato de MIDA tras su purificación de la mezcla.

La Figura 20 es un par de espectros de RMN ^1H correspondientes a (i) una mezcla de reacción simulada que comprende un boronato de MIDA, y (ii) el boronato de MIDA tras su purificación de la mezcla.

15 La Figura 21 es un par de espectros de RMN ^1H correspondientes a (i) una mezcla de reacción simulada que comprende un boronato de MIDA, y (ii) el boronato de MIDA tras su purificación de la mezcla.

20 La Figura 22 es un par de espectros de RMN ^1H correspondientes a (i) una mezcla de reacción simulada que comprende un boronato de MIDA, y (ii) el boronato de MIDA tras su purificación de la mezcla.

La Figura 23 es un par de espectros de RMN ^1H correspondientes a (i) una mezcla de reacción simulada que comprende un boronato de MIDA, y (ii) el boronato de MIDA tras su purificación de la mezcla.

25 La Figura 24 es un par de espectros de RMN ^1H correspondientes a (i) una mezcla de reacción simulada que comprende un boronato de MIDA, y (ii) el boronato de MIDA tras su purificación de la mezcla.

La Figura 25 es un par de espectros de RMN ^1H correspondientes a (i) una mezcla de reacción simulada que comprende un boronato de MIDA, y (ii) el boronato de MIDA tras su purificación de la mezcla.

30 La Figura 26 es un par de espectros de RMN ^1H correspondientes a (i) una mezcla de reacción simulada que comprende un boronato de MIDA, y (ii) el boronato de MIDA tras su purificación de la mezcla.

35 La Figura 27 es un par de espectros de RMN ^1H correspondientes a (i) una mezcla de reacción simulada que comprende un boronato de MIDA, y (ii) el boronato de MIDA tras su purificación de la mezcla.

La Figura 28 representa gráficamente (A) la desprotección automatizada en medio acuoso de fenil boronato de MIDA y el posterior acoplamiento cruzado automatizado del ácido fenilborónico con un bloque de construcción bifuncional de yoduro de vinilo; (B), la desprotección automatizada en medio acuoso de trienilboronato de MIDA y el posterior acoplamiento cruzado automatizado del ácido trienilborónico con un bloque de construcción bifuncional de yoduro de vinilo; y (C) la desprotección automatizada en medio acuoso de butenilboronato de MIDA y el posterior acoplamiento cruzado automatizado del ácido butenilborónico con una mezcla isomérica de bloques de construcción bifuncionales de yoduro de dienilvinilo.

45 La Figura 29 representa gráficamente la síntesis completamente automatizada de todo-trans-retinal usando un módulo de desprotección en medio acuoso.

50 Descripción detallada

La invención actualmente reivindicada se dirige a un método para purificar un boronato del ácido N-metiliminodiacético (MIDA) a partir de una solución, que comprende las etapas de diluir la solución con hexano, precipitando selectivamente, de esta forma, el boronato de MIDA; y aislar el boronato de MIDA precipitado, en la que la solución que comprende el boronato de MIDA es una solución de THF.

55 Ácidos haloborónicos bifuncionales protegidos con MIDA

Una clave para el desarrollo de aparatos y métodos para la síntesis automatizada de moléculas pequeñas fue el uso de la reacción de Suzuki-Miyaura para conseguir el acoplamiento cruzado iterativo (ICC) de "ácidos haloborónicos bifuncionales" (Figura 1A). Sin embargo, para conseguir un procedimiento eficaz que se pudiera automatizar, era necesario el desarrollo de un método suave y selectivo para atenuar de forma reversible un extremo de cada ácido haloborónico para evitar la oligomerización aleatoria. De esta manera, los equipos y métodos descritos en el presente documento aprovechan el hallazgo de que el ligando trivalente ácido N-metiliminodiacético (MIDA) puede actuar como un interruptor para "activar" y "desactivar" la reactividad de un ácido borónico en condiciones muy suaves (E.P. Gillis, M.D. Burke J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 6716-6717; y publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2009/0030238). Esta propiedad de los boronatos de MIDA ha posibilitado preparar una variedad de productos

naturales mediante ciclos repetidos que implican la desprotección del boronato de MIDA, el acoplamiento cruzado selectivo, y la purificación (Figura 1B; S.J. Lee, K.C. Gray, J.S. Paek, M.D. Burke J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 466-468; E.P. Gillis, M.D. Burke, J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 14084-14085; y E.M. Woerly, A.H. Cherney, E.K. Davis, M.D. Burke, J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 6941-6943). Permitiendo adicionalmente su utilidad general como bloques de construcción, los boronatos de MIDA son sólidos monoméricos de flujo libre estables al aire de manera uniforme y muy cristalinos que son totalmente compatibles con una amplia gama de reactivos sintéticos y cromatografía en gel de sílice habituales (E.P. Gillis, M.D. Burke Aldrichmaica Acta 2009, 42, 17-27). Además, los avances más recientes en los métodos de preparación de los bloques de construcción de boronato de MIDA, y el descubrimiento de su capacidad para "liberar lentamente" el acoplamiento cruzado, han ampliado considerablemente la utilidad de las plataformas de síntesis descritas en el presente documento (G.R. Dick, D.M. Knapp, E.P. Gillis, Org. Lett. 2010, 12, 2314-2317; D.M. Knapp, E.P. Gillis J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 6961-6963; y publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2010/0121062). De hecho, está ahora disponible en el mercado una colección creciente de boronatos de MIDA, que representan muchas de las subestructuras que aparecen habitualmente en productos naturales y farmacéuticos. El creciente alcance de la reacción de Suzuki-Miyaura, que incluye crecientemente acoplamientos de tipo Csp^3-Csp^3 (M.R. Netherton, G.C. Fu, Adv. Syn. Cat. 2004, 346, 1525-1532), indica que la potencial generalidad de esta estrategia de ICC es notable.

Purificación de ácidos organoborónicos protegidos con MIDA

La transformación de un enfoque ICC en un proceso completamente automatizado requiere una estrategia general para purificar los compuestos intermedios sintéticos. En el caso de péptidos, oligonucleótidos, y oligosacáridos, este problema se ha resuelto mediante la unión del oligómero en crecimiento a un soporte sólido. Al finalizar la reacción de acoplamiento, el producto deseado se separa de los disolventes residuales, reactivos, y subproductos mediante una filtración sencilla. Aunque muy eficaz en este contexto, existen dos limitaciones principales de esta estrategia de purificación base de la síntesis de moléculas pequeñas basada en ICC.

En primer lugar, esta estrategia requiere una manipulación química ubicua que permita la unión covalente del oligómero en crecimiento a la fase sólida. En el caso de péptidos, oligonucleótidos, y oligosacáridos, los correspondientes monómeros están convenientemente contenidos en un elemento de unión de un heteroátomo común como componente inherente de la estructura diana. Por el contrario, aunque se han desarrollado algunos sistemas de unión en fase sólida excelentes, las moléculas pequeñas son estructuralmente bastante diversas, y muchas carecen de un grupo funcional común disponible para su unión a una fase sólida.

En segundo lugar, el acoplamiento selectivo de ácidos borónicos en presencia de boronatos de MIDA requiere el uso de condiciones relativamente anhidras porque los boronatos de MIDA son estables y no reactivos en condiciones básicas anhidras, pero se hidrolizan rápidamente para producir ácidos borónicos reactivos cuando se tratan con base acuosa. En estudios preliminares, se descubrió que la traducción de la química de los acoplamientos cruzados de Suzuki-Miyaura anhidros a la fase sólida podría ser un problema.

Sorprendentemente, los inventores han descubierto dos notables propiedades de los boronatos de MIDA, que permiten evitar ambos dos desafíos anteriormente mencionados. En su conjunto, las dos propiedades han permitido una estrategia de purificación alternativa muy eficaz y, por lo tanto, permiten la automatización completa del ICC con la química en fase de solución. Las dos estrategias de purificación -"precipitación" y "captura y liberación"- se describen con más detalle a continuación. La presente invención se dirige a la purificación mediante una estrategia de precipitación. Las dos estrategias de purificación se pueden usar solas o combinadas, en cuyo caso, se pueden realizar secuencialmente en cualquier orden.

Purificación por precipitación. La invención reivindicada se refiere al descubrimiento de que prácticamente todas las moléculas que contienen un ácido organoborónico protegido con MIDA son insolubles en hexanos:THF (3:1 v/v), mientras que la mayoría de ácidos borónicos, otros ésteres borónicos, o derivados relacionados son solubles en este sistema disolvente (Figura 1C). Esta propiedad física general de los boronatos de MIDA permite una purificación muy eficaz basada en la precipitación. (Para antecedentes sobre la purificación basada en precipitación, véase: H. Perrier, M. Labelle, J. Org. Chem. 1999, 64, 2110-2113; T. Bosanac, C.S. Wilcox, Org. Lett. 2004, 6, 2321-2324; y J.C. Poupon, A.A. Boezio, A.B. Charette, Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 1415-1420). Además, como la mayoría de especies de catalizadores y haluros orgánicos son solubles en hexanos:THF (3:1), los boronatos de MIDA se pueden purificar directamente mediante reacciones de acoplamiento cruzado, tales como las reacciones de acoplamiento cruzado de Suzuki. La mera transferencia de una mezcla de producto bruto en THF (por ejemplo, desde una reacción de acoplamiento cruzado) a un recipiente agitado que contiene una cantidad de hexanos que es aproximadamente tres veces el volumen total de THF a añadir da como resultado una precipitación rápida y cuantitativa del producto de boronato de MIDA mientras que el ácido borónico residual sin reaccionar, así como la mayoría de subproducto y resto de componentes de la reacción, tales como ligandos de paladio y fosfina, permanecen solubles en la mezcla de hexano:THF (3:1 v/v). La mera filtración de esta mezcla, seguida de la disolución del boronato de MIDA precipitado con THF proporciona una solución del boronato de MIDA semipurificado.

De esta forma, la invención reivindicada se dirige a un método para purificar un boronato de MIDA a partir de una solución, que comprende las etapas de diluir con hexano la solución que comprende el boronato de MIDA, precipitando

selectivamente, de esta forma, el boronato de MIDA; y aislar el boronato de MIDA precipitado, en la que la solución que comprende el boronato de MIDA es una solución de THF. El hexano puede ser cualquier isómero de hexano o una mezcla de hexanos. Los isómeros ilustrativos de hexano útiles en la invención incluyen hexano no ramificado (n-hexano), hexanos ramificados (por ejemplo, isohexano), y ciclohexano.

5 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que el boronato de MIDA precipitado se aísla mediante filtración.

10 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, que comprende además la etapa de disolver el boronato de MIDA precipitado en un disolvente polar. En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, que comprende además la etapa de disolver el boronato de MIDA precipitado en THF.

15 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en la que la solución que comprende el boronato de MIDA se añade gota a gota al hexano.

20 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que el volumen de hexano está comprendido entre aproximadamente dos y aproximadamente cuatro veces el volumen de la solución que comprende el boronato de MIDA.

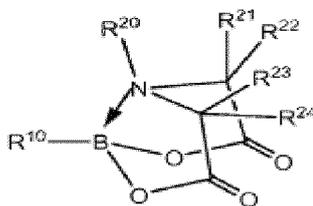
En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que el volumen de hexano es aproximadamente tres veces el volumen de la solución que comprende el boronato de MIDA.

25 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que la solución que comprende el boronato de MIDA es una mezcla de producto bruto procedente de una reacción química.

30 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que la reacción química se selecciona del grupo que consiste en un acoplamiento de Suzuki-Miyaura, una oxidación, una oxidación de Swern, una oxidación con "reactivo de Jones", una reducción, reacción de aldol de Evans, una olefinación de HWE, una olefinación de Takai, una siliilación de alcohol, una desiliilación, una p-metoxibencilación, una yodación, un acoplamiento cruzado de Negishi, un acoplamiento de Heck, una borilación de Miyaura, un acoplamiento de Stille, y un acoplamiento de Sonogashira.

35 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que la reacción química comprende la etapa de poner en contacto un boronato de MIDA con un reactivo, en el que el boronato de MIDA comprende un boro que tiene una hibridación sp^3 , un grupo protector de MIDA unido al boro, y un grupo orgánico unido al boro a través de un enlace boro-carbono; el grupo orgánico se transforma químicamente, y el boro no está transformado químicamente.

40 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que el boronato de MIDA está representado mediante



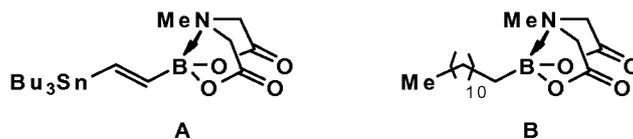
45 R^{10} representa un grupo orgánico; B representa boro que tiene una hibridación sp^3 ; R^{20} es metilo; y R^{21} , R^{22} , R^{23} y R^{24} se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste de un grupo hidrógeno y un grupo orgánico.

50 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en los que R^{21} , R^{22} , R^{23} y R^{24} son hidrógeno.

55 *Purificación mediante captura y liberación.* Se ha descubierto además que todas las moléculas que contienen un grupo funcional de boronato de MIDA tienen una afinidad excepcionalmente elevada por el gel de sílice (Figura 1C). Por ejemplo, se ha descubierto que los boronatos de MIDA, independientemente de la naturaleza del grupo orgánico unido al boro, tiene un R_f esencialmente de cero en hexanos:THF (3:1 v/v), Et_2O , y $Et_2O:MeOH$ (98,5:1,5 v/v). Por tanto, los boronatos de MIDA se pueden utilizar como etiqueta universal para la purificación mediante captura y liberación en gel de sílice. (Para una excelente revisión sobre las estrategias de marcado en separación para síntesis orgánica, véase:

J. Yoshida, K. Itami, Chem. Rev. 2002, 102, 3693-3716. Para una excelente revisión sobre modernas técnicas de separación en síntesis orgánica, véase: C.C. Tzschucke, C. Markert, W. Bannwarth, S. Roller, A. Hebel, R. Haag, Angew. Chem. Int. Ed. 2002, 41, 3964-4000. Véase, también, D.P. Curran, Angew. Chem. Int. Ed. 1998, 37, 1174-1196; P.H. Toy, K.D. Janda, Acc. Chem. Res. 2000, 33, 546-554; S.V. Ley, A. Massi, F. Rodriguez, D.C. Horwell, R.A. Lewthwaite, M.C. Pritchard, A.M. Reid, Angew. Chem. Int. Ed. 2001, 40, 1053-1055; A.R. Brown, S.L. Irving, R. Ramage, G. Raphy Tetrahedron 1995, 51, 11815-11830; L. A. Thompson, Curr. Opin. Chem. Bio. 2000, 4, 324-337; y M.G. Siegel, P.J. Hahn, B.A. Dressman, J.E. Fritz, J.R. Grunwell, S.W. Kaldor, Tetrahedron Lett. 1997, 38, 3357-3360. Para el uso de métodos del tipo de captura y liberación, véase: J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, Nature 1975, 278, 598). En otras palabras, el grupo funcional de boronato de MIDA, que está convenientemente presente en todos los compuestos intermedios utilizados en determinadas secuencias de ICC (Figura 1B), permite la unión reversible no covalente de cualquier boronato de MIDA a gel de sílice, un soporte sólido.

El uso de hexanos:THF (por ejemplo, 3:1 v/v) como sistema disolvente es importante porque proporciona un medio (a través de la dilución con hexanos) para purificar directamente las soluciones de reacción en THF que contienen boronatos de MIDA. Con respecto a la síntesis automatizada, tal como se analiza más adelante, esta característica es importante porque no son necesarias manipulaciones avanzadas, tales como la evaporación del disolvente, para preparar la solución de reacción para su purificación. El uso de Et₂O es importante porque, en determinadas reacciones de acoplamiento, el resto de compuestos presentes en la solución de reacción se eluyen en Et₂O. De manera interesante, la adición de MeOH al 1,5 % (v/v) al Et₂O garantiza que incluso los ácidos borónicos polares se eliminan por elución de la columna con una razonable cantidad de disolvente. La compatibilidad entre el MeOH y los boronatos de MIDA en el método de purificación era inesperado, ya que el MeOH se puede utilizar para desproteger los boronatos de MIDA al correspondiente ácido borónico a temperatura ambiente. Todas las propiedades anteriormente mencionadas se han ensayado con muchos boronatos de MIDA y se ha demostrado que son generales. Por ejemplo, los boronatos A y B se comportan como se ha descrito anteriormente, a pesar de que no son polares y se eluyen bien en otras combinaciones de disolventes, tal como hexanos:EtOAc.



Una vez que los ácidos borónicos sin reaccionar, así como los reactivos de reacción, se han eluido, los boronatos de MIDA puros se eluyen bien en THF. Asimismo, los boronatos de MIDA generalmente se eluyen bien con MeCN y acetona.

Un aspecto de la presente divulgación, que se describe pero no se reivindica de forma independiente, se refiere a un método para purificar un boronato de MIDA a partir de una solución, que comprende las etapas de hacer pasar la solución a través de un lecho de sílice; para hacer pasar un primer líquido a través del lecho de sílice; y hacer pasar un segundo líquido a través del lecho de sílice, eluyendo de esta forma el boronato de MIDA en el segundo líquido; en el que el primer líquido contiene dietil éter o la polaridad del primer líquido es menor o igual que aproximadamente la de una mezcla de 98,5:1,5 (v/v) de Et₂O:MeOH; y la polaridad del segundo líquido es mayor o igual que aproximadamente la polaridad del THF.

Los boronatos de MIDA, como la mayoría de los compuestos orgánicos, se eluyen generalmente más rápidamente de SiO₂ (es decir, tienen un R_f mayor) cuando la polaridad del disolvente es mayor. Sin embargo, el método de purificación anteriormente descrito aprovecha las propiedades especiales de los boronatos de MIDA en determinados disolventes. Específicamente, existen determinados sistemas disolventes en los que el R_f de un boronato de MIDA no está relacionado con la polaridad del disolvente. De hecho, en determinados sistemas disolventes, el R_f puede estar cercano a cero. Por ejemplo, incluso aunque el cloroformo es más polar que el THF, el R_f del dodecaboronato de MIDA en cloroformo es 0,00 y en THF es 0,80. Aunque sin desear quedar ligado por teoría particular alguna, este fenómeno tan sorprendente probablemente implica una interacción única entre los tres factores: el disolvente, el gel de sílice y el boronato de MIDA. Por tanto, es posible aislar un boronato de MIDA en una columna de gel de sílice si se toma un disolvente que es una excepción a las reglas de elución (como el cloroformo o el Et₂O). Para retirar un boronato de MIDA de la columna así cargada, se cambia a un disolvente polar que obedece las reglas normales de elución (como THF, MeCN, o acetona).

También se ha descubierto que un gel de sílice funcionalizado, tal como gel de sílice funcionalizado con 3-aminopropilo, se puede sustituir por SiO₂ sin afectar a las propiedades de la interacción del MIDA/SiO₂. El gel de sílice funcionalizado se puede utilizar para secuestrar, por ejemplo, catalizadores metálicos de la disolución. Por tanto, en determinadas realizaciones, el gel de sílice es un gel de sílice funcionalizado con 3-aminopropilo.

Purificación que combina la precipitación y la captura-liberación. Las dos estrategias de purificación anteriormente descritas anteriormente se pueden combinar en un proceso sólido y general. Específicamente, la solución que se

somete a la purificación mediante captura-liberación descrita anteriormente puede ser una solución que se deriva de la precipitación selectiva de un boronato de MIDA.

5 Un aspecto de la invención reivindicada se refiere a un método para purificar un boronato de MIDA a partir de una solución, que comprende las etapas de diluir la solución con hexano, precipitando selectivamente, de esta forma, el boronato de MIDA, en la que la solución que comprende el boronato de MIDA es una solución de THF; hacer pasar la solución a través de un lecho de sílice, depositando de esta forma el ácido organoborónico protegido con MIDA sobre el lecho de gel de sílice; para hacer pasar un primer líquido a través del lecho de sílice; y hacer pasar un segundo líquido a través del lecho de sílice, eluyendo de esta forma el boronato de MIDA en el segundo líquido; en el que el primer líquido contiene dietil éter o la polaridad del primer líquido es menor o igual que aproximadamente la de una mezcla de 98,5:1,5 (v/v) de Et₂O:MeOH; y la polaridad del segundo líquido es mayor o igual que aproximadamente la polaridad del THF.

15 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que el primer líquido comprende dietil éter.

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que el primer líquido es dietil éter.

20 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que el primer líquido es una mezcla de dietil éter y metanol.

25 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que el primer líquido es una mezcla de dietil éter y metanol; y la relación entre dietil éter y metanol es 98,5:1,5 (v/v).

30 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que el segundo líquido es THF, MeCN, acetato de etilo o acetona, o un disolvente de polaridad similar o superior.

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que el segundo líquido es THF, MeCN, acetato de etilo o acetona.

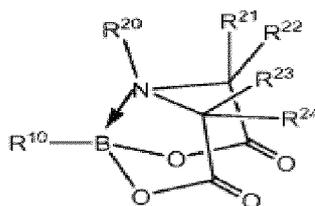
35 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que el segundo líquido es THF.

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que la solución es una mezcla de producto bruto procedente de una reacción química.

40 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que la reacción química se selecciona del grupo que consiste en un acoplamiento de Suzuki-Miyaura, una oxidación, una oxidación de Swern, una oxidación con "reactivo de Jones", una reducción, reacción de aldol de Evans, una olefinación de HWE, una olefinación de Takai, una silitación de alcohol, una desililación, una p-metoxibencilación, una yodación, un acoplamiento cruzado de Negishi, un acoplamiento de Heck, una borilación de Miyaura, un acoplamiento de Stille, y un acoplamiento de Sonogashira.

50 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que la reacción química comprende las etapas de poner en contacto un boronato de MIDA con un reactivo, en el que el boronato de MIDA comprende un boro que tiene una hibridación sp³, un grupo protector de MIDA unido al boro, y un grupo orgánico unido al boro a través de un enlace boro-carbono; el grupo orgánico se transforma químicamente, y el boro no está transformado químicamente.

55 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que el boronato de MIDA está representado



mediante R¹⁰ representa un grupo orgánico; B representa boro que tiene una hibridación sp³; R²⁰ es metilo; y R²¹, R²², R²³ y R²⁴ se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste de un grupo hidrógeno y un grupo orgánico. En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en los que R²¹, R²², R²³ y R²⁴ son hidrógeno.

5 *Recipientes de purificación híbrida personalizados.* En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a uno cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, en el que se utiliza un recipiente de purificación híbrida personalizado que contiene tanto una "cámara de precipitación" como una "cámara de captura y liberación" dispuestas en serie (Figura 1C). En este sistema, una reacción de acoplamiento cruzado bruta se transfiere a una primera cámara (por ejemplo, una cámara superior) llena de hexano, dando como resultado una precipitación rápida y cuantitativa del producto que contiene boronato de MIDA mientras que el ácido borónico residual (y la mayoría de subproductos), paladio, y ligando de fosfina permanecen todos ellos solubles. Como se ha indicado anteriormente, la mera filtración de esta suspensión, seguida por lavado con Et₂O:MeOH, lleva al boronato de MIDA sólido semipurificado resultante a la parte superior de un lecho de gel reside que se encuentra en una segunda cámara (por ejemplo, una cámara inferior). Esta cámara inferior se somete a continuación a lavado con grandes cantidades de, por ejemplo, Et₂O:MeOH 98.5:1.5 (v/v) seguido por un volumen pequeño definido de THF para realizar la purificación mediante captura y liberación en gel de sílice. La solución de THF resultante de boronato de MIDA purificado está convenientemente preparada para su utilización en ciclos posteriores de desprotección y acoplamiento.

20 Purificación/desprotección de ácidos organoborónicos protegidos con MIDA

Los desafíos asociados con la purificación de ácidos borónicos incluyen el hecho de que "las características polares y frecuentemente anfífilas tienen a complicar su aislamiento y purificación" (Hall, D. G. Boronic Acids; Wiley-VCH: Weinheim, Alemania, 2005; pág. 57-58). Además, "[l]os muy conocidos y utilizados ácidos borónicos muestran estabilidad variable (el ácido vinilborónico, alquilborónico, y alquililborónico no son muy estables), y su purificación no es directa. Además, los ácidos borónicos aislados generalmente contienen grandes cantidades de anhídridos o boroxinas, que dan como resultado problemas para determinar su estequiometría" (Darses, S.; Genet, J-P. Chem. Rev. 2008, 108, 288-325).

30 Se han desarrollado numerosas estrategias para purificar ácidos borónicos, pero están limitadas en su generalidad. La estrategia más básica es recrystalizar el ácido borónico, normalmente en solución acuosa. Sin embargo, esta estrategia solamente es eficaz si la muestra es inicialmente bastante pura, y cuando la solubilidad dependiente de la temperatura del ácido borónico es favorable. Cuando no se utilizan disolventes polares en la recrystalización, se produce una deshidratación significativa del ácido borónico para dar la boroxina. (Santucci, L.; Gilman, H. J. Am. Chem. Soc. 1958, 80, 193-196). Otra estrategia es el reparto líquido/líquido "con cambio de fase" (Mothana, S.; Grassot, J-M.; Hall, D. G. Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 2883-2887). En esta estrategia, el ácido borónico se convierte en la especie aniónica borato con una base fuerte (pH 10), los productos orgánicos no aniónicos se eliminan por lavado, y a continuación la solución se acidifica (pH 1-5) para regenerar el ácido borónico. Este método no es compatible con ácidos borónicos que contienen grupos funcionales ácidos, grupos funcionales básicos, o cualquier funcionalidad que sea sensible a condiciones ácidas o básicas, incluyendo la funcionalidad del ácido borónico. Un secuestrante de ácidos borónicos en un soporte sólido de tipo dietanolamina, abreviado como DEAM-PS, también se ha notificado (Hall, D. G.; Tailor, J.; Gravel, M. Angew. Chem. Int. Ed. 1999, 38, 3064-3067). Sin embargo, este método es caro y no representa una solución práctica o escalable.

45 Los ácidos borónicos se pueden purificar en un proceso en dos etapas usando como intermedio un derivado de ácido borónico. Por ejemplo, los ácidos borónicos se pueden convertir en la correspondiente sal de trifluoroborato que puede recrystalizarse (Darses, S.; Genet, J-P. Chem. Rev. 2008, 108, 288-325). Sin embargo, las limitaciones de esta estrategia incluyen el hecho de que las condiciones de cristalización son específicas del sustrato, se utilizan grandes cantidades de fluoruro, parte de las impurezas cristalizan con el producto, y la regeneración del ácido borónico a partir del trifluoroborato no es eficaz (Molander, G. A.; Cavalcanti, L. N.; Canturk, B.; Pan, P-S.; Kennedy, L. E. J. Org. Chem. 2009, 74, 7364-7369). Como alternativa, los ácidos borónicos se pueden deshidratar en presencia de un diol (muy frecuentemente pinacol) para formar el correspondiente éster borónico. Algunos ésteres arilborónicos tienen propiedades cromatográficas, de extracción y cristalización más favorables que los correspondientes ácidos borónicos. Sin embargo, otros tipos de ésteres borónicos (heteroarilo, alquenilo, alquilo, alquililo, etc.) tienden a tener características muy variables. Además, cuando el éster borónico se vuelve lo suficientemente estable como para mejorar sus propiedades de purificación, las condiciones necesarias para regenerar el ácido borónico son más rigurosas. Por ejemplo, convertir un éster pinacolborónico en el correspondiente ácido borónico suele requerir una solución acuosa ácida y un oxidante (frecuentemente, NaIO₄), lo que limita la generalidad de esta estrategia (Murphy, J. M.; Tzschuck, C. C.; Hartwig, J. F. Org. Lett. 2007, 9, 757-760).

60 Finalmente, los ácidos borónicos inestables representan un problema especialmente desafiante. Ninguna de las estrategias anteriormente mencionadas se puede utilizar para purificar ácidos borónicos inestables, tales como los ácidos vinilborónicos. De forma notable, el ácido vinilborónico se puede generar a partir del vinilboronato de MIDA con una pureza mayor del 95 % (Knapp, D. M.; Gillis, E. P.; Burke, M. D. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 6961-6963).

Para resolver algunos de los problemas señalados anteriormente, se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, un método de tipo "captura y liberación selectiva" desarrollada para la hidrólisis del boronato de MIDA. Específicamente, una solución de un boronato de MIDA en THF (reactividad = OFF) se mezcla con un hidróxido de amonio en soporte sólido (tal como Amberlyst A26(OH); véase T.M. Morwick, J. Comb. Chem. 2006, 8, 649-651) para impulsar la hidrólisis del MIDA. En ese momento, tanto el ligando MIDA escindido (probablemente en la forma de $\text{MIDA}^2\text{-Na}^+_2$) y el ácido borónico (probablemente en la forma del correspondiente complejo de boron-'ato'; véase D.G. Hall, J. Taylor, M. Gravel, Angew. Chem. Int. Ed. 1999, 38, 3064-3067) permanece atrapado en la resina (la "captura"). Se ha determinado que el tratamiento posterior con una solución de AcOH en THF (véase M.G. Siegel, P.J. Hahn, B.A. Dressman, J.E. Fritz, J.R. Grunwell, S.W. Kaldor, Tetrahedron Lett. 1997, 38, 3357-3360) da como resultado una "liberación selectiva" solamente del ácido borónico (reactividad = ON), mientras que el ligando MIDA escindido permanece convenientemente atrapado en la resina bajo estas condiciones suaves. La transferencia de esta solución de THF/AcOH/ácido borónico a un nuevo vial que contiene K_2CO_3 , tamices moleculares de 4 Å, y Celite®, seguido por burbujeo de argón a través de la mezcla y filtración proporciona una solución neutralizada, principalmente anhidra y desoxigenada de ácido borónico en THF recientemente preparada, lista para la siguiente reacción de acoplamiento.

Un aspecto de esta divulgación se refiere a la desprotección de un boronato de MIDA, que comprende la etapa de poner en contacto una solución que comprende el boronato de MIDA y un disolvente con un reactivo de hidróxido de amonio en soporte sólido, desprotegiendo de esta forma el boronato de MIDA y formando un ácido borónico y un MIDA.

SINTETIZADORES AUTOMÁTICOS DE MOLÉCULAS PEQUEÑAS

Con los métodos sólidos y robustos generales para la purificación y la desprotección de los boronatos de MIDA, ya desarrollados, se diseñó y se construyó un aparato con la capacidad de síntesis totalmente automatizada de moléculas pequeñas mediante ICC (Figura 1D). En determinadas realizaciones, este aparato comprende tres módulos, cada uno de ellos diseñado para promover una etapa de desprotección (D), acoplamiento cruzado (CC), o purificación (P) necesaria para llevar a cabo el esquema de ICC representado gráficamente en la Figura 1B. En determinadas realizaciones, todos los materiales se transfieren entre módulos como soluciones manipuladas por una serie de bombas de jeringa principales (por ejemplo, ocho) coordinadas con un conjunto de válvulas conmutables (J-KEM Scientific). En determinadas realizaciones, todas las bombas de jeringa están impulsadas por un ordenador que ejecuta un programa informático personalizado. Una realización de la máquina se representa gráficamente en la Figura 1D; los detalles adicionales relativos a esta máquina se proporcionan en la Ejemplificación siguiente.

Diseño del sistema de reacción. En determinadas realizaciones, las reacciones de acoplamiento cruzado se llevan a cabo en tubos de polipropileno adquiridos de Luknova, objeto n.º FC003012. Las dimensiones del tubo son 21 mm x 120 mm (DI x longitud). El fondo del tubo está provisto de una placa fritada de 21 mm de diámetro y 4 mm de altura. En la parte superior de esta placa fritada está asegurada mediante un hilo metánico una placa fritada de 13 mm de diámetro x 4 mm de altura. En la parte superior de esta placa fritada se coloca una larga varilla de agitación que contiene un imán de tierras raras (Big Science Inc., SBM-1508- REH). La parte inferior del tubo es accesible mediante una punta Luer macho, mientras que la parte superior del tubo está sellada con un tampón roscado hermético que contiene un puerto Luer hembra. El tubo contiene un volumen de solvente de hasta 25 ml. Los tubos se introducen en un bloque calefactor de aluminio que se fabricó de forma personalizada. El bloque calefactor contiene hasta 9 tubos de reacción. Los tubos se mantienen 3 cm por encima de la superficie de la placa agitadora, donde el fondo, a 4 cm del tubo, está encamisado por el bloque calefactor. Los tubos que acceden a la parte inferior del tubo de reacción pasan por un orificio situado en el lateral del bloque cerca de la parte inferior.

El uso de un tubo de polipropileno parece ser importante para simplificar el diseño del tubo de reacción. Específicamente, el material es un buen aislante, de tal manera que solamente la parte que está encamisada por el bloque calefactor está caliente. Cuando el bloque calefactor se calienta a 60 °C, la solución de reacción alcanza los 60 °C en varios minutos. Sin embargo, la parte del tubo que no está encamisada permanece a temperatura ambiente, actuando como un condensador, y de esta forma, el vapor por encima del disolvente permanece a temperatura ambiente. Cuando se utilizan otros materiales como el vidrio, la parte del tubo por encima del bloque calefactor se calienta y la solución se evapora rápidamente. Por tanto, si se utilizara vidrio en lugar de polipropileno, sería necesario un elemento refrigerante adicional para evitar la pérdida de solución.

En algunas realizaciones del sistema, los tubos del bloque de reacción se agitan constantemente, independientemente de si la solución se encuentra en el interior del tubo. Esto mantiene simple el sistema, ya que la placa agitadora no tiene que encenderse y apagarse, y además, los tiempos de inicio y parada de las reacciones en el interior del bloque no tienen que coordinarse. Sin embargo, durante la agitación prolongada, la barra agitadora del tubo actúa como mano de mortero, mientras que la placa fritada es el mortero, de forma que la base queda finalmente molida en los poros de la placa fritada. Además, la barra agitadora puede dañar la parte superior de la placa fritada incluso en ausencia de base. En estas situaciones, resulta casi imposible retirar soluciones a través de la placa fritada ya que la superficie superior de la placa fritada queda ocluida y/o dañada. Para superar esta limitación, se diseñó un tubo de reacción para que contuviera dos placas fritadas de diferentes tamaños (Figura 8). De esta forma, la varilla de agitación solamente entra en contacto con la placa fritada más pequeña, e incluso si la superficie superior de esta placa fritada queda dañada u ocluida, se puede retirar la solución a través de los laterales de la placa fritada pequeña o a través de los

espacios abiertos solamente para la placa fritada grande. El alambre es necesario para asegurar la parte superior de la placa fritada de forma que no gire lateralmente durante la reacción para quedar perpendicular a la placa fritada más grande. En determinadas realizaciones, se podría fabricar una única placa fritada que tenga una forma similar a la combinación de placas fritadas.

5 *Diseño del sistema de purificación.* Las propiedades cromatográficas de los boronatos de MIDA que permiten la estrategia de purificación sencilla se han descrito anteriormente. Se describe a continuación como el diseño del sistema soporta la cromatografía de captura-liberación y la purificación basada en precipitación.

10 Como la dilución de la reacción en THF bruta con hexanos ocasiona la precipitación inmediata del producto de boronato de MIDA, la mezcla de THF y hexanos debe tener lugar en un recipiente de volumen suficiente para contener el producto precipitado. Los disolventes deben también poder mezclarse completamente, de tal forma que la solución sea homogénea. Finalmente, la adición de hexanos a la solución de THF también hace que los subproductos de la reacción se vuelvan insolubles. En algunos casos, estos subproductos son pegajosos o forman un precipitado muy fino
15 que puede obstruir la placa fritada. En determinadas realizaciones, se puede utilizar una cámara de precipitación personalizada en la que mezclar la solución bruta de THF y los hexanos (Figura 9). En determinadas realizaciones, la cámara de precipitación contiene Celite® que secuestra las impurezas pegajosas que precipitan y mantiene este material distribuido por la totalidad de la Celite® de forma que no obstruya la placa fritada. En determinadas realizaciones, una varilla de agitación en la cámara garantiza un buen mezclado. Sin embargo, se observó que, si la
20 varilla de agitación seguía girando continuamente durante varias horas, la Celite® del tubo quedaba tan finamente molida que podía pasar a través de la placa fritada y obstruir procesos posteriores. Para resolver este problema, una vez que la cámara de precipitación está llena de disolvente y se mezcla, el disolvente se retira de forma que la varilla de agitación queda incluida en la Celite® seca y no agita. En otras palabras, la varilla de agitación se puede realizar para agitar solamente cuando se necesita -es decir, cuando hay disolvente en la cámara de precipitación- y, por tanto, este proceso no requiere encender y apagar la placa de agitación ni coordinar la agitación u otros procesos que utilizan la misma placa agitadora. En determinadas realizaciones, gel de sílice funcionalizado con 3-aminopropilo se introduce en la cámara de precipitación para secuestrar el paladio de una solución de reacción bruta.

En determinadas realizaciones, la cámara de precipitación se llena en primer lugar con hexano mediante la bomba auxiliar (humedeciendo así la columna de SiO₂ con hexanos en el proceso). A continuación, se añade desde la parte superior una solución de reacción en THF. La bomba principal no manipula tanto los hexanos como la solución de THF porque los hexanos residuales en la jeringa podrían ocasionar que el producto de boronato de MIDA precipitara en la jeringa. Además, la bomba principal no retira la solución residual de THF:hexanos por este motivo y para reducir la contaminación. Por tanto, una vez que los disolventes se mezclan en la cámara de precipitación, la solución se retira
30 mediante la bomba auxiliar hacia la columna de SiO₂ y después se envía a vertido. A continuación, se añade Et₂O con MeOH a la cámara de precipitación, se mezcla, y después se retira a través de la columna de SiO₂ y se envía a vertido. Este proceso se repite con Et₂O. En este punto, el producto de boronato de MIDA puro permanece como precipitado en la cámara de precipitación o se encuentra en la parte superior de la columna de SiO₂. La bomba auxiliar inyecta a continuación THF a través de la parte inferior de la columna de SiO₂, o a través de la parte superior y a la cámara y a
40 través de la cámara de precipitación. Por tanto, no es importante si el producto de boronato de MIDA se encuentra inicialmente en la columna de SiO₂ o en la cámara de precipitación, ya que se disolverá en THF en cualquier lugar. Este sistema reduce la cantidad de THF utilizada para eluir/disolver el producto, permitiendo que la solución se utilice en la siguiente reacción sin concentración adicional. Una vez que el THF se ha mezclado en la cámara de precipitación durante aproximadamente 30 minutos, se retira mediante la bomba principal hacia la conexión de tres vías sin volver a
45 pasar a través de la columna de SiO₂.

Algunas características importantes de esta configuración son: el evento de precipitación se produce en una cámara de mezclado; la cámara de mezclado contiene secuestrante (Celite® y gel de sílice funcionalizada); la agitación se puede controlar de manera sencilla; la cámara de precipitación y la columna de SiO₂ están espacialmente separadas; y la configuración de las bombas permite que los disolventes se añadan y se retiren en varias conexiones en la totalidad del proceso.

Programa informático. El programa informático que controla la máquina se puede describir como estando constituido por tres niveles de complejidad: el nivel básico, el nivel funcional, y el nivel desarrollado. El nivel básico representa esencialmente la combinación de unos y ceros que se puede enviar al equipo para desplazar las bombas de jeringa y las válvulas. El nivel funcional representa los comandos más sencillos para mover el equipo que podría entender una persona que mire el código informático. El nivel desarrollado representa un programa informático especialmente hecho a medida para la máquina de síntesis automatizada que pueden utilizar las personas no expertas para modificar la forma en que la síntesis se lleva a cabo. El nivel básico es inherente a los equipos fabricados por Kloehn. El nivel funcional procede del código fuente proporcionado por J-KEM cuando se compró el equipo. El nivel funcional es código fuente escrito en VB.NET que empaqueta los comandos del nivel básico en subrutinas de ejecución sencilla. El nivel desarrollado se diseñó a medida y se escribió en VB.NET basándose en el código fuente proporcionado en el nivel funcional.

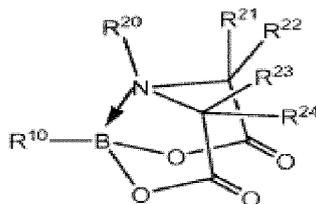
65 Más específicamente, la máquina se compone de un número de bombas de jeringa y válvulas que son las piezas originales de Kloehn. Las bombas de jeringa y válvulas se volvieron a envasar y se comercializaron por J-KEM como

una pieza de hardware personalizada. El equipo se controla mediante un puerto serie RS-485 que envía y recibe comandos de cadena de texto simple escritas en lenguaje máquina específico para las piezas de Kloehn. Por tanto, en el nivel más simple, la máquina se puede controlar mediante el envío de cadenas de texto simples tales como "/xR", pero estos comandos son ininteligibles para cualquiera que use el equipo. El equipo enviado por J-KEM viene con el código fuente escrito en VB.NET que proporciona subrutinas para mover la bomba de jeringa a posiciones específicas, cambiar válvulas a posiciones específicas, controlar la velocidad a la que se mueve la jeringa, y abrir/cerrar las válvulas solenoides. El código que se desarrolló utiliza las subrutinas del código proporcionado por J-KEM. El código fuente de J-KEM se puede eliminar, y el programa informático se pudo comunicar con el equipo directamente sin perder funcionalidad. Sin embargo, el código fuente de J-KEM no sería por sí mismo suficiente para hacer funcionar un sistema de síntesis automatizada. Por tanto, fue necesario crear un programa informático que permitiera el desarrollo de la máquina de síntesis automatizada. Los detalles relativos a determinadas realizaciones del programa informático se pueden encontrar en la Ejemplificación.

Sintetizadores automatizados. Se describe, pero no se reivindica, un sintetizador de moléculas pequeñas automatizado que comprende: (a) un módulo de desprotección, en comunicación de fluidos con (b) un módulo de secado y desgasificación, en comunicación de fluidos con (c) un módulo de reacción, en comunicación de fluidos con (d) un módulo de purificación; al menos una bomba que puede mover el líquido de un módulo a otro; y un ordenador provisto del programa informático; en el que todos los módulos están bajo el control del ordenador.

En una realización, el módulo de purificación comprende un módulo combinado (o "híbrido") de precipitación y captura-liberación.

En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el boronato de MIDA está representado



mediante R^{10} representa un grupo orgánico; B representa boro que tiene una hibridación sp^3 ; R^{20} es metilo; y R^{21} , R^{22} , R^{23} y R^{24} se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste de un grupo hidrógeno y un grupo orgánico.

En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en los que R^{21} , R^{22} , R^{23} y R^{24} son hidrógeno.

En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el módulo de purificación comprende una cámara de precipitación y una columna de gel de sílice; comprendiendo la cámara de precipitación una primera abertura en la parte superior de la cámara de precipitación, una segunda abertura en la parte inferior de la cámara de precipitación, una primera placa fritada que cubre la segunda abertura, una varilla de agitación, y una tierra de diatomeas (como Celite®); y la columna de gel de sílice comprende una primera abertura en la parte superior de la columna, una segunda abertura en la parte inferior de la columna, una segunda placa fritada que cubre la abertura superior de la columna, una tercera placa fritada que cubre la abertura inferior de la columna, y gel de sílice; en el que el módulo de purificación está en comunicación de fluidos con el módulo de reacción.

En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que la cámara de precipitación comprende un tubo cilíndrico.

En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el tubo cilíndrico de la cámara de precipitación es un tubo cilíndrico de polipropileno.

En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el tubo cilíndrico de la cámara de precipitación tiene una longitud de entre aproximadamente 100 mm y aproximadamente 140 mm.

En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el tubo cilíndrico de la cámara de precipitación tiene una longitud de aproximadamente 120 mm.

- En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el tubo cilíndrico de la cámara de precipitación tiene un diámetro interno de entre 18 mm y 24 mm.
- 5 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el tubo cilíndrico de la cámara de precipitación tiene un diámetro interno de aproximadamente 21 mm.
- 10 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el tubo cilíndrico de la cámara de precipitación tiene un volumen de aproximadamente 25 ml.
- 15 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que la cámara de precipitación comprende además una resina que secuestra metales.
- 20 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que la cámara de precipitación comprende además carbón activo.
- 25 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el módulo de purificación comprende además una placa de agitación que activa la varilla de agitación.
- 30 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que la tierra de diatomeas (por ejemplo, Celite®) de la cámara de precipitación evita que la varilla de agitación gire si no hay disolvente en la cámara de precipitación.
- 35 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que la primera placa fritada de la cámara de precipitación mantiene la tierra de diatomeas en la cámara de precipitación.
- 40 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que la columna de gel de sílice es un tubo cilíndrico.
- 45 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el tubo cilíndrico de la columna de gel de sílice es un tubo cilíndrico de polipropileno.
- 50 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el tubo cilíndrico de la columna de gel de sílice tiene una longitud de entre aproximadamente 100 mm y aproximadamente 140 mm.
- 55 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el tubo cilíndrico de la columna de gel de sílice tiene una longitud de aproximadamente 120 mm.
- 60 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el tubo cilíndrico de la columna de gel de sílice tiene un diámetro interno de entre 18 mm y 24 mm.
- 65 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el tubo cilíndrico de la columna de gel de sílice tiene un diámetro interno de aproximadamente 21 mm.
- En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el tubo cilíndrico de la columna de gel de sílice tiene un volumen de aproximadamente 25 ml.
- 60 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que la segunda placa fritada de la columna de gel de sílice y la tercera placa fritada de la columna de gel de sílice mantienen el gel de sílice en la columna de gel de sílice.
- En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el gel de sílice está funcionalizado con grupos amino.
- 65 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el módulo de purificación comprende además una bomba auxiliar.

En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, que comprende además un depósito de disolvente que contiene hexano.

5 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el módulo de purificación está en comunicación de fluidos con el depósito de hexano; y la bomba auxiliar proporciona hexano desde el depósito a la cámara de precipitación haciendo pasar el hexano por la columna de gel de sílice a través de la segunda abertura de la columna de gel de sílice, al exterior de la columna de gel de sílice a través de la primera abertura de la columna de gel de sílice, y al interior de la cámara de precipitación a través de la segunda abertura de la cámara de precipitación.

10 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que la bomba auxiliar puede eliminar el hexano haciendo pasar el hexano por la segunda abertura de la cámara de precipitación, a través de la primera abertura de la columna de gel de sílice y hacia fuera por la segunda abertura de la columna de gel de sílice.

15 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, que comprende además un depósito de disolvente que contiene dietil éter.

20 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el módulo de purificación está en comunicación de fluidos con el depósito de dietil éter; y la bomba auxiliar proporciona dietil éter desde el depósito a la cámara de precipitación haciendo pasar el dietil éter por la columna de gel de sílice a través de la segunda abertura de la columna de gel de sílice, al exterior de la columna de gel de sílice a través de la primera abertura de la columna de gel de sílice, y al interior de la cámara de precipitación a través de la segunda abertura de la cámara de precipitación.

25 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que la bomba auxiliar puede eliminar el dietil éter haciendo pasar el dietil éter por la segunda abertura de la cámara de precipitación, a través de la primera abertura de la columna de gel de sílice y hacia fuera por la segunda abertura de la columna de gel de sílice.

30 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, que comprende además un depósito de disolvente que contiene dietil éter que contiene un 1,5 % de metanol en volumen.

35 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el módulo de purificación está en comunicación de fluidos con el depósito de dietil éter que contiene un 1,5 % de metanol en volumen; y la bomba auxiliar proporciona dietil éter que contiene un 1,5 % de metanol en volumen desde el depósito a la cámara de precipitación haciendo pasar el dietil éter por la columna de gel de sílice a través de la segunda abertura de la columna de gel de sílice, al exterior de la columna de gel de sílice a través de la primera abertura de la columna de gel de sílice, y al interior de la cámara de precipitación a través de la segunda abertura de la cámara de precipitación.

40 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que la bomba auxiliar puede eliminar el dietil éter que contiene un 1,5 % de metanol en volumen haciendo pasar el dietil éter que contiene un 1,5 % de metanol en volumen por la segunda abertura de la cámaras de precipitación, a través de la primera abertura de la columna de gel de sílice y hacia fuera por la segunda abertura de la columna de gel de sílice.

45 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, que comprende además un recipiente de residuos; en el que la segunda abertura de la columna de gel de sílice está en comunicación de fluidos con el recipiente de residuos.

50 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, que comprende además un depósito de disolvente que contiene THF.

55 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que el módulo de purificación está en comunicación de fluidos con el depósito de THF; y la bomba auxiliar proporciona THF desde el depósito a la cámara de precipitación haciendo pasar el THF por la columna de gel de sílice a través de la segunda abertura de la columna de gel de sílice, al exterior de la columna de gel de sílice a través de la primera abertura de la columna de gel de sílice, y al interior de la cámara de precipitación a través de la segunda abertura de la cámara de precipitación.

60 En determinadas realizaciones, se divulga uno cualquiera de los sintetizadores de moléculas pequeñas automatizados anteriormente mencionados, en el que la segunda abertura de la cámara de precipitación se puede poner en comunicación de fluidos con la primera abertura de la columna de gel de sílice mediante una válvula de tres vías; en el que un primer puerto de la válvula está conectado con la segunda abertura de la cámara de precipitación, un segundo

puerto de la válvula está conectado con la primera abertura de la columna de gel de sílice, y un tercer puerto de la válvula se puede usar para retirar una solución desde la cámara de precipitación sin pasar la solución a través de la columna de gel de sílice.

5 PREPARACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES DE MOLÉCULAS PEQUEÑAS

Con este novedoso aparato de síntesis de moléculas pequeñas en el banco de pruebas, su capacidad se sometió a ensayo en la preparación de una serie de productos naturales de moléculas pequeñas, derivados de diferentes clases biosintéticas, incluyendo politerpenos, ácidos grasos, y acoplamiento oxidativo, de una forma completamente automatizada (Figura 2). Los detalles de las reacciones seleccionadas se proporcionan en la sección de Ejemplificación siguiente. En la estrategia ICC idealizada, dichas moléculas pequeñas se construyen usando solamente reacciones de acoplamiento cruzado estereoespecíficas para ensamblar iterativamente colecciones de bloques de construcción que tienen todas las funcionalidades necesarias preinstaladas en los estados de oxidación correctos, y con las relaciones estereoquímicas necesarias (varios de los bloques de construcción necesarios para dichas síntesis están comercialmente disponibles).

Análogamente al cromóforo para la visión de todos los vertebrados, el complejo de la bacteriorodopsina captador de luz, y un derivado de una vitamina clave en la fisiología de los mamíferos, el producto natural retinal derivado de politerpina es el centro de una amplia investigación en química, biología, física, y medicina. Por tanto, un acceso sintético completamente automatizado a este producto natural y a muchos de sus derivados tendría posiblemente un amplio impacto en todos estos campos de investigación. Este producto natural se sintetizó automáticamente utilizando dos ciclos de acoplamiento para unir bloques de construcción BB₄, BB₅ comercialmente disponible, y BB₆ (Figura 2A).

El lípido fluorescente, ácido β-parinárico se deriva de la biosíntesis de ácidos grasos, y ha demostrado ser muy útil en una amplia gama de estudios estructurales y funcionales de membranas de bicapa lipídica. Demostrando que la modularidad que existe entre las moléculas pequeñas cruza incluso entre clases biosintéticas, los mismos bloques comercialmente disponibles BB₅ se usaron dos veces en la preparación automatizada de ácido β-parinárico. Específicamente, tres ciclos iterativos de acoplamiento llevaron al ensamblaje automatizado de los bloques de construcción BB₇, BB₅, BB₅, y BB₈ para preparar eficazmente esta pequeña molécula diana (Figura 2B).

En otro ejemplo, el neolignano ratanhina (A. Arnone, V. Di Modugno, G. Nasini, O.V. de Pava Gazz. Chim. Ital. 1990, 120, 397-401) es un producto natural modular derivado del acoplamiento oxidativo de bloques de construcción comunes, en este caso, bloques de construcción de fenilpropanoide derivados de la fenilalanina (S.R. Angle, K.D. Turnbull, J. Org. Chem. 1993, 58, 5360-5369). Como otros derivados, esta estrategia de biosíntesis basada en bloques de construcción da como resultado en una modularidad sustancial. Por ejemplo, el fragmento de propenilo presente en el boronato de MIDA BB₉ aparece en una amplia gama de productos naturales, y este bloque de construcción ahora está comercialmente disponible. La ratanhina se sintetizó automáticamente a través de los acoplamientos secuenciales de BB₉, BB₁₀, BB₁₁ y BB₁₂, seguido de una desprotección final global de los éteres de metoximetilo (MOM). Este tipo de desprotección global es análoga a la utilizada para desproteger los péptidos, oligonucleótidos, y oligosacáridos sintetizados automáticamente. Véase la Figura 2C.

Tal como se muestra en la Figura 2D, el interesante producto natural crocacina C derivado de PK/NRPS se ensamblará automáticamente partiendo del boronato de MIDA comercialmente disponible BB₁. Se anticiparon dos ciclos de acoplamientos automatizados con BB₂ y BB₃ para obtener el producto natural.

También se propuso que la naturaleza flexible del ICC automatizado debería permitir la preparación rápida de derivados de una molécula pequeña específica con el potencial de impulsar estudios fundamentales acerca de su función. Específicamente, como se ha descrito anteriormente, debido a su excepcional importancia en una amplia gama de disciplinas científicas, el retinal se ha estudiado ampliamente por químicos, biólogos, biofísicos, e ingenieros moleculares. La estereoquímica del doble enlace está estrechamente vinculada a la función de este producto natural, y sondear esta relación requiere un acceso eficaz a estos estereoisómeros en forma químicamente pura. Además, los derivados de retinal que están marcados de una forma selectiva del sitio con átomos de ¹³C son muy valiosos para estudios biofísicos realizados mediante espectroscopía de RMN. Se reconoce que la estrategia de ICC podría abordar ambos desafíos sintéticos simplemente incorporando al sistema automatizado la secuencia de síntesis automática anteriormente descrita con bloques de construcción de boronato de MIDA alternativos que tengan la estereoquímica y el marcado con ¹³C de forma específica del sitio deseados preinstalados (Figura 3A). Específicamente, el acoplamiento iterativo completamente automatizado de diferentes combinaciones de bloques de construcción BB₄, (E)-BB₅, (Z)-BB₅, (E)-¹³C₂-BB₅, (Z)-¹³C₂-BB₅, BB₆, y ¹³C₂-BB₆ se anticipa que produce seis derivados diferentes de retinal, que representan dos posibles estereoisómeros, marcado cada uno de ellos con ¹³C con tres diseños diferentes (Figura 3B).

El ICC automatizado también tiene la capacidad teórica de acelerar sustancialmente la preparación de muchos derivados de productos naturales de moléculas pequeñas biológicamente activos con el fin de mejorar su potencial para aplicaciones médicas. Como ejemplo específico, ratanhina representa simplemente un miembro de una familia muy numerosa de productos naturales de neolignano. Muchos de estos productos naturales demuestran interesantes propiedades antifúngicas, antileishmaniosis, antiangiogénicas, antiirreumáticas, antitumorales, y/o hipolipidémicas, y

varias se han utilizado como compuestos principales para el desarrollo de nuevos medicamentos (S. Apers, A. Vlietinck, L. Pieters, *Phytochem. Rev.* 2003, 2, 201-217). Para explorar el potencial del ICC automatizado para preparar análogos estructurales de esta familia de productos naturales, se preensamblaron cuatro conjuntos de bloques de construcción que representan varias subestructuras que aparecen normalmente en muchos de estos compuestos. Se espera que el ICC completamente automatizado se pueda emplear para unir estos bloques de construcción en todas las combinaciones posible para generar, de forma protegida, cuatro productos naturales de neoglicano y 20 análogos novedosos de neolignano (Figura 4B). Tras retirar los grupos protectores de hidroxilo y purificación por HPLC automatizada, se espera que todos estos productos naturales y derivados de productos naturales se produzcan en cantidades adecuadas para los ensayos biológicos.

El desarrollo de una plataforma de ICC completamente automatizada para la síntesis de moléculas pequeñas representa un paso importante hacia el aumento de la eficacia y flexibilidad con la que se pueden preparar las moléculas pequeñas en el laboratorio. Aunque algunos tipos de moléculas pequeñas (por ejemplo, las que tienen muchos enlaces Csp²-Csp²) son en la actualidad más susceptibles a esta estrategia que otros, el rápido alcance creciente de la reacción de Suzuki-Miyaura, que incluye cada vez más ligandos de acoplamiento Csp³ (M.R. Netherton, G.C. Fu, *Adv. Synth. Catal.* 2004, 346, 1525-1532) sugiere que la potencial generalidad de esta estrategia es importante. Este aparato de síntesis significa extender la capacidad de la síntesis de moléculas pequeñas a la no química, y finalmente ayudará a desplazar la etapa limitante de la velocidad en la ciencia de las moléculas pequeñas de conseguir la síntesis a entender la función. Dado que la capacidad funcional de las moléculas pequeñas probablemente se extiende mucho más allá de lo que se entiendo o utiliza en la actualidad, los desarrollos descritos en el presente documento significan tener un amplio impacto tanto en la ciencia como en la medicina.

DEFINICIONES

Los artículos "un" y "uno" se utilizan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a "al menos uno") de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

La expresión "y/o", tal como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, deberá entenderse que significa "cualquiera o ambos" de los elementos así conjuntados, es decir, elementos que están conjuntamente presentes en algunos casos y disyuntivamente presentes en otros casos. Múltiples elementos relacionados con "y/o" deberán considerarse de la misma forma, es decir, "uno o más" de los elementos así conjuntados. Otros elementos pueden estar opcionalmente presentes diferentes de los elementos identificados específicamente por la cláusula "y/o", tanto de forma relacionada como no relacionada con estos elementos específicamente identificados. Por tanto, como ejemplo no limitante, una referencia a "A y/o B", cuando se usa junto con un lenguaje no limitativo como "que comprende" puede referirse, en una realización, a A solamente (incluyendo opcionalmente elementos diferentes a B); en otra realización, a B solamente (incluyendo opcionalmente elementos diferentes a A); en otra realización adicional, tanto a A como a B (incluyendo opcionalmente otros elementos); etc.

Tal como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, "o" deberá entenderse que tiene el mismo significado que "y/o" como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, cuando se separan los elementos de una lista, "o" o "y/o" deberán considerarse como inclusivos, es decir, la inclusión de al menos uno, pero también la inclusión de más de uno, de una serie o lista de elementos, y, opcionalmente, términos no relacionados adicionales. Solamente los términos indicados claramente en sentido contrario, tales como "solamente uno de" o "exactamente uno de", o, cuando se usa en las reivindicaciones, "que consiste de", se referirá a la inclusión de exactamente un elemento de una serie o lista de elementos. En general, el término "o" tal como se usa en el presente documento solamente se deberá interpretar como una indicación de alternativas excluyentes (es decir, "uno u otro pero no ambos") cuando van precedidos de términos de exclusividad, tal como "cualquiera de", "uno de", "solamente uno de", o "exactamente uno de". "Que consiste esencialmente de", cuando se usa en las reivindicaciones, deberá tener su significado normal cuando se utiliza en el campo de la legislación de patentes.

Tal como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la expresión "al menos uno", en referencia a una lista de uno o más elementos, deberá entenderse que significa al menos un elemento seleccionado entre cualquiera uno o más de los elementos de la lista de elementos, pero no incluyendo necesariamente al menos uno de todos y cada uno de los elementos específicamente relacionados dentro de la lista de elementos y sin excluir cualquier combinación de los elementos de la lista de elementos. Esta definición también permite que puedan estar opcionalmente presentes elementos diferentes a los elementos específicamente identificados dentro de una lista de elementos a la que se refiere la expresión "al menos uno", tanto de forma relacionada como no relacionada con estos elementos específicamente identificados. Por tanto, como ejemplo no limitante, "al menos uno de A y B" (o, de forma equivalente, "al menos uno de A o B", o, de forma equivalente, "al menos uno de A y/o B") puede referirse, en una realización, a al menos uno, incluyendo opcionalmente más de un, A, sin B presente (e incluyendo opcionalmente elementos diferentes a B); en otra realización, a al menos uno, incluyendo opcionalmente más de un, B, sin A presente (e incluyendo opcionalmente elementos diferentes a A); en otra realización adicional, a al menos uno, incluyendo opcionalmente más de un, A, y al menos uno, incluyendo opcionalmente más de un, B (e incluyendo opcionalmente otros elementos); etc.

También debe entenderse que, a no ser que se indique lo contrario claramente, en cualquiera de los métodos reivindicados en el presente documento que incluyen más de una etapa o actuación, el orden de las etapas o acciones del método no está necesariamente limitado al orden en que se citan las etapas o acciones del método.

- 5 En las reivindicaciones, así como en la memoria descriptiva anterior, todas las frases de transición tales como "que comprende", "que incluye", "que contiene", "que tiene", "que contienen", "que implican", "que sujetan", "compuesto de", y similares, deberán entenderse que no están limitadas, es decir, que significan incluyendo, pero sin limitación. Solamente las frases transicionales "que consiste en" y "que esencialmente consiste en" deberán considerarse frases transicionales cerradas o semicerradas, respectivamente, tal como se establece en el The United States Patent Office
10 Manual of Patent Examining Procedures, Sección 2111.03.

EJEMPLIFICACIÓN

- 15 La invención se describirá ahora de una forma general, se entenderá más fácilmente con referencia a lo siguiente, que se ha incluido simplemente con fines de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, y no se pretende que limiten la invención.

Ejemplo 1 -- Principios de diseño generales del aparato

- 20 Un ejemplo de un sintetizador automatizado de moléculas pequeñas se muestra en la Figura 1D (fotografía) y en la Figura 5 (esquema). El aparato de diseño personalizado puede ejecutar la síntesis completamente automatizada de ocho moléculas pequeñas simultáneamente. Cada síntesis consiste en entre una y tres secuencias de acoplamiento iterativas, donde cada secuencia de acoplamiento puede incluir una etapa de desprotección, una etapa de acoplamiento cruzado y una etapa de purificación. La organización del aparato se centra en ocho bombas de jeringa
25 principales. Cada bomba de jeringa principal está dedicado solamente a una síntesis. Estas ocho bombas de jeringa principales operan independientemente para ejecutar secuencias de acoplamiento iterativas en paralelo. Los recursos de cada síntesis están compartimentados de tal forma que cada bomba de jeringa principal no puede acceder a los recursos de otra bomba de jeringa principal, con las siguientes excepciones: todos los disolventes y todos los puertos de salida de productos se comparten por todas las bombas de jeringa principales. Además, se utiliza una bomba de jeringa auxiliar como recurso compartido para las etapas de purificación. Otra bomba auxiliar se utiliza como recurso compartido para gestionar todas las soluciones acuosas. El programa informático de diseño personalizado que opera la máquina controla cómo se distribuyen los recursos compartidos.
30

- 35 *Válvula estándar.* Los módulos de válvula se adquirieron de J-KEM Scientific (n.º de pieza Syr-CS4) y se conectaron al ordenador de control mediante una conexión USB a RS485. Cada módulo de válvula está provisto de cuatro válvulas de selección para ocho puertos de corriente (J-KEM, n.º de pieza SPDV-CS8). Cada válvula conecta la corriente de entrada, que entra por el centro de la válvula, a una de las ocho posibles corrientes de salida (puertos A a H). La ubicación de las válvulas estándar se muestra en la Figura 5.

- 40 *Válvula de la bomba de jeringa.* Cada bomba de jeringa está provista de una válvula de selección para ocho puertos de corriente (J-KEM, n.º de pieza SPDV8) donde la corriente de entrada entra desde la jeringa conectada inmediatamente frente al puerto "E". El puerto "E" está parcialmente bloqueado por la jeringa y requiere un adaptador de tipo *flush-net* (IDEX Health and Science, n.º de pieza F-358) para conectar la corriente de salida. La ubicación de las válvulas de la bomba de jeringa se muestra en la Figura 5.
45

- Bombas de jeringa.* Las bombas de jeringa se adquirieron de J-KEM Scientific (n.º de pieza SYR1400-8 para P1-P8, n.º de pieza SYR-1400PC para P9 y P10) y están conectadas al ordenador de control mediante una conexión USB a RS485. Cada bomba de jeringa está provista de una válvula de selección para ocho puertos de corriente (J-KEM, n.º de pieza SPDV8) y una jeringa de vidrio de 10 ml provista de un émbolo de Teflón (J-KEM, n.º de pieza SPGS-10000). La bomba de jeringa retira e inyecta a velocidades desde 0,0 ml/min a 70,0 ml/min con un paso de 0,0029 ml. La ubicación de las bombas de jeringa se muestra en la Figura 5.
50

- Tubos de reacción.* Para minimizar la contaminación cruzada y permitir la configuración rápida de una síntesis, todas las manipulaciones químicas se realizan en tubos de polipropileno desechable comprados a Luknova, objeto n.º FC003012. Las dimensiones del tubo son 21 mm x 120 mm (DI x longitud). El fondo del tubo está provisto de una placa fritada de 21 mm de diámetro y 5 mm de altura. La parte inferior del tubo es accesible mediante una punta Luer macho, mientras que la parte superior del tubo está sellada con un tampón roscado hermético que contiene un puerto Luer hembra. El tubo contiene un volumen de solvente de hasta 25 ml. En las Figuras 6 y 8 se muestran ejemplos de tubos de reacción.
55

- 60 *Conducciones y accesorios.* Todas las conducciones y accesorios se adquirieron de IDEX Health and Science. Las conducciones usadas en la máquina tienen 0,030 pulgadas (0,76 mm) (DI) x 1/16 pulgadas (1,33 mm) (DO) de conducción de Teflón FEP (n.º de pieza 1520xL). Todas las conexiones de las conducciones se realizaron con férulas sin aletas de 1/16 pulgadas (1,33 mm) de ETFE (n.º de pieza P-200x) y accesorios de 1/4-28 acetal (n.º de pieza P-202x). Los accesorios Luer macho (n.º de pieza P-625) y Luer hembra (n.º de pieza P-658) son ETFE y PEEK, respectivamente. En la Figura 6 se muestran ejemplos de conducciones y accesorios.
65

Ejemplo 2 -- Ordenador de control del aparato

Principios de diseño generales de la programación. Todos los aparatos del equipo se controlan mediante un programa personalizado escrito en VB.NET usando Microsoft Visual Basic 2008 Express Edition. El aparato está controlado por un único ordenador que ejecuta Windows Vista. El aparato está diseñado para ejecutar un experimento independientemente de cada una de las ocho bombas de jeringa principales. Cada bomba principal se puede iniciar y detener a voluntad sin afectar las otras bombas. Además, los scripts de los experimentos en ejecución simultánea no tienen que ser los mismos ni necesitan estar sincronizados para que los experimentos se realicen con éxito. El programa está diseñado para gestionar la distribución de los recursos compartidos tales como el equipo de la válvula común y las bombas de jeringa auxiliares, así como el ancho de banda de los puertos COM.

La configuración y la modificación del script usado para ejecutar un experimento están diseñados para que sea sencillo y fácil. Con este fin, se desarrolló un lenguaje de scripting personalizado sencillo. El lenguaje de scripting contiene una pequeña colección de comandos utilizados para enviar instrucciones a una máquina virtual, gestionar el calendario de dichas operaciones, y bloquear/desbloquear el acceso a los recursos compartidos. El programa sirve como un intérprete para este lenguaje de scripting personalizado y cartografía las instrucciones de la máquina virtual hacia el hardware del aparato. De esta forma, se puede usar el mismo script en cualquiera de las bombas de jeringa principales sin modificación.

Comunicación con el aparato de equipo. Los comandos se envían al equipo del aparato usando los puertos serie del ordenador. Los puertos serie RS485 del equipo del aparato están conectados a un convertidor serie-a-USB que está conectado al ordenador. Cada puerto COM puede direccionar hasta 16 piezas de equipo, donde una pieza del equipo se define como una válvula o una bomba de jeringa. La bomba de jeringa puede estar controlada adicionalmente, o no, por una válvula solenoide. Tal como está configurado, la comunicación con el aparato se distribuye a través de cuatro puertos COM. Los comandos se pueden enviar al equipo con una velocidad no superior a cada 20 milisegundos. Para reforzar este retraso, el programa mantiene una cola de comandos para su envío al equipo. Los comandos reconocidos por el equipo son: mover la válvula a un puerto concreto, notificar la posición actual de la válvula, desplazar el émbolo de la jeringa a una posición específica a una velocidad determinada, apagar/encender el solenoide de la válvula, y notificar si el equipo ha terminado de ejecutar el comando anterior.

Arquitectura del programa. Cada válvula y cada bomba de jeringa están representadas programáticamente como un "objeto de equipo". Cada uno de estos objetos de equipo recibe un identificador que se puede usar para cartografiar los comandos del lenguaje de scripting para el hardware actual representado por el objeto del equipo. Cada bomba principal se asigna a un "objeto de bomba" que es un contenedor de todos los objetos del equipo que representan recursos que están disponibles para la bomba principal. Ningún objeto de bomba contiene todos y cada uno de los objetos del equipo, pero todos y cada uno de los objetos del equipo están incluidos en al menos un objeto de bomba. Cuando se ejecuta un experimento en la bomba principal, la lista de comandos programados se pasa como un archivo de texto al correspondiente objeto de bomba. El objeto de bomba es responsable de la revisión, interpretación y ejecución de los comandos programados y de actualizar la interfaz gráfica de usuario (GUI) según corresponda.

Ejecución del script. Cuando el objeto de bomba recibe el archivo de texto de líneas de comando, el objeto de bomba interpreta cada línea de comando como un "objeto de comando". El objeto de comando contiene toda la información necesaria para ejecutar el comando. Una vez que un objeto de comando se crea, pasa a una cola gestionada por el objeto de bomba. Mediante este proceso, el script se revisa para identificar posibles errores sintácticos que evitarían la ejecución correcta del código. El script se ejecuta a continuación recuperando un objeto de la cola, enviando los comandos adecuados al equipo mediante el puerto COM, comprobando periódicamente el estado del equipo de la máquina hasta que se completa el comando, y a continuación repetir el proceso para el siguiente comando de la cola.

Lenguaje de Scripting. El lenguaje de scripting contiene los siguientes comandos con indicaciones sobre su uso:

' (apóstrofe)	Indica que todo lo que sigue al apóstrofe es un comentario y no debe interpretarse.
[<i>texto</i>] (corchetes)	Los corchetes representan un valor de un marcador de posición reconocido por el identificador <i>text</i> que se sustituirá en el tiempo de ejecución con el comando <i>define</i> .
<i>define text=value</i>	En el tiempo de ejecución sustituye todos los corchetes (marcadores de posición) que contienen <i>text</i> por el valor de <i>value</i> . Se trata de una estrategia útil para escribir scripts flexibles.
<i>pause n</i>	Detiene la ejecución del script durante <i>n</i> segundos.
<i>valve nL</i>	Mueve la válvula <i>n</i> a la posición del puerto <i>L</i> (A-H).
<i>valve xon</i>	<i>valve xon</i> abre la válvula solenoide asociada con la bomba de jeringa principal. <i>valve xoff</i> cierra esta válvula solenoide.
<i>valve xoff</i>	
<i>pump n in=L out=M</i>	Llena la jeringa con <i>n</i> ml extraídos de la posición del puerto <i>L</i>
<i>ratein=x rateout=y</i>	(A-H) a una tasa de <i>x</i> ml/min e inyecta <i>n</i> ml a través de la posición del puerto <i>M</i> (A-H) a <i>y</i> ml/min. La posición del puerto se refiere a la válvula que está directamente conectada a la jeringa. Si se omite la parte <i>in=</i> , se instruye a la bomba que dispense solamente <i>n</i> ml como anteriormente. Si se omite la parte <i>out=</i> , se instruye a la bomba que llene solamente <i>n</i> ml como anteriormente. Utilizar <i>rate=x</i> para configurar tanto la velocidad de extracción como la velocidad de inyección a <i>x</i> ml/min.

pump out=M rate=x	Inyecta todo el contenido de la jeringa a través de la posición del puerto <i>M</i> (A-H) a una velocidad de <i>x</i> ml/min.
log "comment text"	escribe una entrada marcada con fecha y hora en el libro de registro que contenga el texto definido por el usuario (<i>comment text</i>).
lock <i>n</i>	Marca la válvula <i>n</i> para uso exclusivo de la bomba principal. Si la válvula <i>n</i> está ocupada, o se ha bloqueado por una bomba diferente, la ejecución del script se detiene hasta que la válvula esté disponible. Las bombas auxiliares también pueden bloquearse con este comando.
unlock <i>n</i>	Libera la válvula <i>n</i> del uso exclusivo de la bomba principal. Todos los comandos de bloqueo deben ir seguidos, en su caso, de un comando de desbloqueo. Las bombas auxiliares también pueden liberarse con este comando.
sub <i>sub_name</i> end sub	Los comandos sub y end sub marcan el inicio y final, respectivamente, de las líneas de comando que se interpretarán como una subrutina con el identificador <i>sub_name</i> .
run <i>sub_name</i>	Ejecuta la subrutina identificada como <i>sub_name</i> . Esta subrutina debería haber sido previamente definida mediante los comandos sub y end sub. El comando que sigue al comando run no se ejecuta hasta que todos los comandos de la subrutina se han completado (en oposición al comando antecedente).
background <i>sub_name</i>	Ejecuta la subrutina identificada como <i>sub_name</i> . Este comando es similar al comando run salvo que tan pronto como la subrutina comienza a ejecutarse, el comando que sigue al comando background también se ejecuta. Por tanto, la subrutina se gestiona como un proceso en segundo plano que permite realizar múltiples acciones al mismo tiempo.
wait <i>sub_name</i>	Detiene la ejecución del script hasta la subrutina ejecutada como <i>sub_name</i> (que previamente se ha ejecutado anteriormente usando el comando background) finaliza su ejecución. Este comando permite que los procesos en segundo plano se sincronicen con el script principal.

Ejemplo 3 – Síntesis química

- 5 **Procedimiento general.** Todas las manipulaciones químicas se realizan en tubos de polipropileno adquiridos de Luknova, objeto n.º FC003012. Las dimensiones del tubo son 21 mm x 120 mm (DI x longitud). El fondo del tubo está provisto de una placa fritada de 21 mm de diámetro y 5 mm de altura. La parte inferior del tubo es accesible mediante una punta Luer macho, mientras que la parte superior del tubo está sellada con un tampón roscado hermético que contiene un puerto Luer hembra. El tubo contiene un volumen de solvente de hasta 25 ml.
- 10 **Tubos de desprotección.** Para permitir la automatización, se desarrolló un método de desprotección del boronato de MIDA usando la resina Amberlyst A26(OH). Amberlyst A26(OH) se adquirió de Sigma-Aldrich y se almacenó bajo atmósfera de N₂ a 4 °C. Amberlyst A26(OH) (volumen de suspensión de 20 ml) se lavó dos veces con MeCN (50 ml) con agitación intensa durante 60 segundos en cada lavado. El disolvente residual se evaporó bajo una corriente de aire rápida durante 5 minutos hasta que la resina se volvió de color beige claro y tuvo flujo libre.
- 15 **Tubos de desprotección.** Se añadió a cada tubo de polipropileno la resina Amberlyst (2,0 g de resina para cada 1,0 mmol de boronato de MIDA a desproteger) y, opcionalmente, el material de partida de boronato de MIDA. El tubo se tapó, y a continuación se colocó sobre la máquina, donde la punta Luer inferior conectada a la mesa de desprotección y el puerto Luer superior se cubren con una lámina de aluminio.
- 20 **Tubos de secado y desgasificación.** Un tubo de polipropileno se llenó con Celite®, tamices moleculares activados (4 Å, malla 8-12) y K₂CO₃. Las cantidades de estos reactivos son proporcionales a la cantidad de la resina Amberlyst A26 utilizada en la etapa de desprotección antes del secado/desgasificación, como se indica a continuación. Sobre el lecho de sólidos se colocó un émbolo de plástico, recortado del émbolo de una jeringa de 5 ml de polipropileno (Fisher n.º 14-817-28, Norm-Ject). El émbolo evita que los sólidos se eleven durante la etapa de desgasificación. El tubo se tapó,
- 25 y a continuación, se colocó sobre la máquina donde la punta Luer inferior conectada a la tabla de desgasificación y el puerto Luer superior está conectado al colector de gas.

Amberlyst A26 (etapa anterior)	Celite®	Tamices mol.	K ₂ CO ₃
2,0 g	200 mg	2,0 g	2,0 g
1,0 g	100 mg	1,0 g	1,0 g
0,5 g	50 mg	0,5 g	0,5 g

- 30 **Tubos de reacción.** Para ayudar en la transferencia de pequeñas cantidades de Pd(OAc)₂ y S-Phos, estos reactivos se adsorbieron sobre Cs₂CO₃ de la siguiente forma. A un vial de vidrio de 40 ml se añadió Pd(OAc)₂ (22 mg) y Cs₂CO₃ (2,723 g). Al vial se añadió THF (10 ml), y la suspensión se concentró in vacuo para dar como resultado un polvo de color ámbar, la mezcla Pd. A un vial de vidrio de 40 ml se añadió S-Phos (76 mg) y Cs₂CO₃ (2,667 g). Al vial se añadió THF (10 ml), y la suspensión se concentró in vacuo para dar como resultado un polvo de color blanco, la SPhos-mezcla.

- 35 A un tubo de polipropileno se añadió una varilla de agitación (Big Science Inc., SBM-1508-REH), el haluro (0,333 mmol), la Pd-mezcla (488 mg, 5 % Pd) y la SPhos-mezcla (488 mg, 10 % S-Phos). Para acoplamientos acuosos, y se

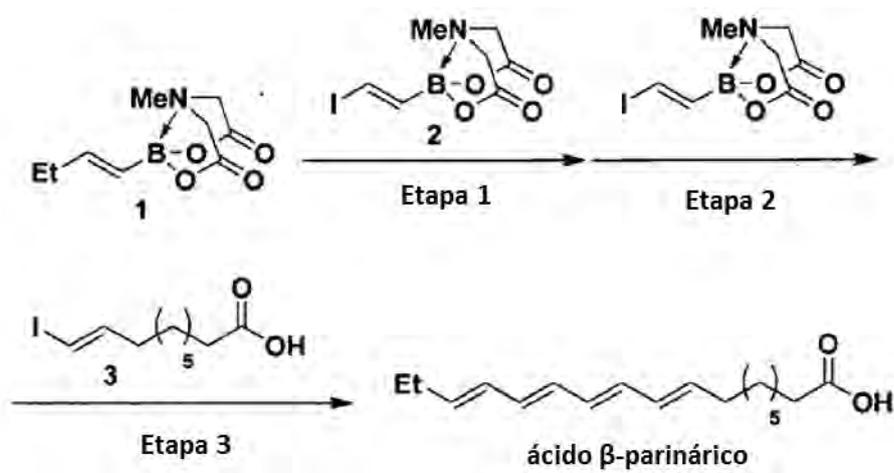
añadió al tubo un aglomerado de KOH (75 mg, 1,7 mmol). El tubo se tapó con un tapón modificado (véase el detalle) y se introdujo en un bloque calefactor. La parte inferior del tubo se conectó a la mesa de reacción, la parte superior del tubo se ventila en dirección al colector de gases, y la segunda entrada superior se conecta con la mesa de reacción para la adición del ácido borónico. Aprovechando los informes publicados anteriormente sobre el acoplamiento cruzado de "liberación lenta", el ácido borónico se añadió lentamente mediante la bomba de jeringa para minimizar la descomposición *in situ* y maximizar, de esta forma, el rendimiento.

Automatización. Cada acoplamiento cruzado de la secuencia automatizada se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente script completamente automatizado:

- 10
- | | | |
|-----------------------------|-----|--|
| <i>Desprotección</i> | 1) | Añadir THF (5 ml) al tubo de desprotección |
| | 2) | Agitar la mezcla mediante burbujeo de gases durante 60 minutos |
| | 3) | Añadir AcOH en THF (4,0 M, 5,0 mmol por 1,0 g de resina Amberlyst) |
| | 4) | Agitar la mezcla mediante burbujeo de gases durante 15 minutos |
| | 5) | Transferir la solución al tubo de secado, lavar la resina con THF (5 x 1,0 ml) |
| | 6) | Purgar la mezcla con Ar gaseoso durante 15 minutos |
| | 7) | Durante la purga del tubo de reacción con Ar gaseoso durante 15 min., agitar la mezcla de THF mediante burbujeo de gases cada 2 minutos |
| <i>Acoplamiento cruzado</i> | 8) | Añadir THF (3 ml) al tubo de reacción y dejar la mezcla en agitación durante 10 min. |
| | 9) | Transferir la solución de ácido borónico desde el tubo de secado hasta el tubo de reacción durante 120 min., lavar los sólidos con THF (3 x 1,0 ml) |
| <i>Purificación</i> | 10) | Agite la mezcla de reacción a 150 rpm durante 22 horas. |
| | 11) | Añadir hexanos (12 ml) a la cámara ppt., añadir a continuación una parte de la solución de reacción (3 ml) a la cámara ppt. |
| | 12) | Retirar la solución de la cámara ppt. mediante el lecho de SiO ₂ y enviarlo a residuos |
| | 13) | Repetir las etapas 11 y 12 hasta que toda la solución de reacción se ha transferido |
| | 14) | Añadir Et ₂ O agua/MeOH (1,5 % v/v) (7,5 ml) a la cámara ppt., retirar la solución a través del lecho de SiO ₂ , y enviar a residuos. Repetir cuatro veces más. |
| | 15) | Añadir Et ₂ O (7,5 ml) a las cámaras ppt., retirar la solución a través del lecho de SiO ₂ , y enviar a residuos. Repetir dos veces más. |
| | 16) | El flujo de Ar gaseoso a través del lecho de SiO ₂ durante tres minutos para evaporar el disolvente residual. |
| | 17) | Añadir THF (6,8 ml) a la cámara ppt. |
| | 18) | Retirar la solución de THF a través del lecho de SiO ₂ y luego retroinyectar la solución en la cámara ppt. Repetir dos veces más. |
| | 19) | Retirar la solución de THF a través del lecho de SiO ₂ e inyectar la solución en el tubo de desprotección utilizado en la siguiente etapa de reacción. La siguiente etapa de reacción comienza en la etapa 1. |

Modificación de liberación directa/acoplamiento en medio acuoso (realizado normalmente como la última etapa de una síntesis automatizada). Esta secuencia comienza después de la etapa 19 del script de automatización general (arriba).

- 15
- 1) Purgar la solución de THF derivada de la purificación del acoplamiento cruzado anterior con Ar gaseoso durante 15 minutos.
 - 2) Transferir la solución de THF al tubo de reacción en una porción.
- 20
- 3) Agitar la mezcla durante 5 minutos.
 - 4) Añadir H₂O (2 ml) desgasificado al tubo de reacción
- 25
- 5) Agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 12 horas.
 - 6) Añadir una solución acuosa de NH₄Cl (2,5 ml), mezclar durante 5 minutos, a continuación retirar la totalidad de la mezcla y transferirla al tubo de ensayo de producto.
- 30
- Ácido β-parinámico. Todas las etapas se realizaron de acuerdo con el procedimiento general. La máquina se equipó con tubos de reactivo, de la siguiente forma.



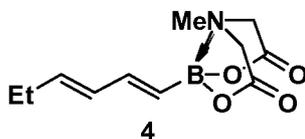
Etapa 1. La máquina se equipó con un tubo de desprotección cargado de resina Amberlyst (2,0 g) y boronato de MIDA 1 (211 mg, 1,0 mmol); un tubo de secado cargado con tamices moleculares (2,0 g), K_2CO_3 (2,0 g) y Celite® (0,2 g); y un tubo de reacción cargado con Pd-mezcla (488 mg), la SPhos-mezcla (488 mg) y el boronato 2 (103 mg, 0,333 mmol).

Etapa 2. La máquina se equipó con un tubo de desprotección cargado de resina Amberlyst (1,0 g); un tubo de secado cargado con tamices moleculares (1,0 g), K_2CO_3 (1,0 g) y Celite® (0,1 g); y un tubo de reacción cargado con Pd-mezcla (244 mg), la SPhos-mezcla (244 mg), y el boronato 2 (34 mg, 0,11 mmol).

Etapa 3. La máquina se equipó con un tubo de desprotección (vacío, pero se utiliza para purgar la solución de boronato de MIDA) y un tubo de reacción cargado con la Pd-mezcla (60 mg), la SPhos-mezcla (60 mg), KOH (75 mg, 1,7 mmol) y el haluro 3 (11 mg, 0,037 mmol).

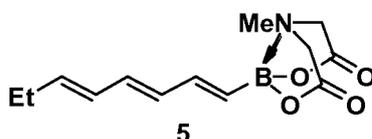
Automatización. La síntesis se llevó a cabo de una forma completamente automatizada sin intervención del operador. La etapa 1 y la etapa 2 se realizaron según el script normal, y la etapa 3 se realizó siguiendo la modificación de liberación directa/acoplamiento en medio acuoso del script estándar. La mezcla acuosa que se extrajo de la máquina se purificó manualmente de la siguiente forma: La mezcla se transfirió a un embudo de decantación de 60 ml y se diluyó con una disolución acuosa saturada de NH_4Cl (10 ml). La mezcla se extrajo dos veces con Et_2O (20 ml) y la combinación de extractos orgánicos se lavaron con salmuera (20 ml); se secó con $MgSO_4$; se filtró, después se concentró *in vacuo*. El residuo de color amarillo se purificó mediante cromatografía en SiO_2 para dar como resultado ácido β -parinámico en forma de un sólido de color blanco (rendimiento no determinado aún). El espectro de RMN 1H ($CDCl_3$) del producto sintetizado concordó completamente con los datos de la bibliografía (Lee, S. J.; Gray, K. C.; Paek, J. S.; Burke, M. D. J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 466-468).

Para caracterizar la eficacia de cada etapa y caracterizar todos los compuestos intermedios, la etapa 1 se repitió, y la solución de boronato de MIDA generada en la línea 19 del script estándar se dividió a un tubo de ensayo y a continuación se concentró para dar el compuesto intermedio 4 puro en forma de un sólido incoloro (40 mg, 52 %).



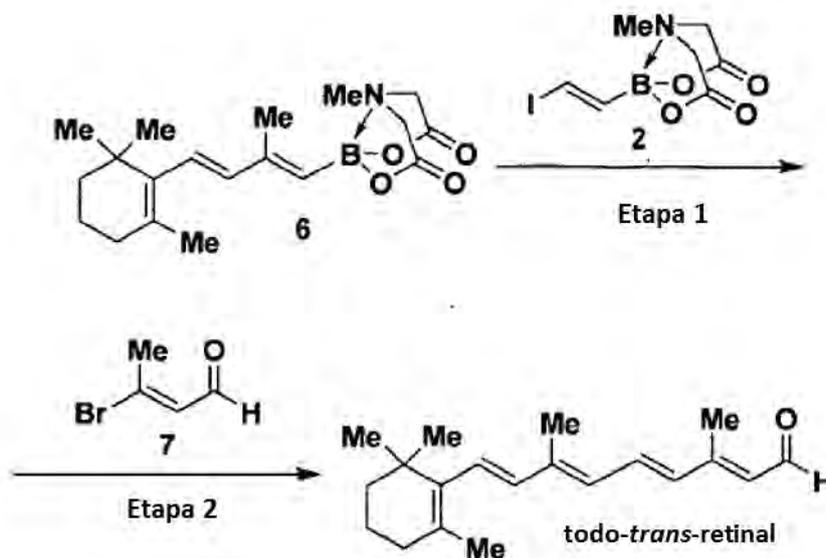
RMN 1H (500 MHz, acetona- d_6): δ 6,53 (dd, $J = 17,0, 10$ Hz, 1H), 6,11 (dd, $J = 15,5, 10,0$ Hz, 1H), 5,82 (dt, $J = 15,5, 6,5$ Hz, 1H), 5,54 (d, $J = 17,5$ Hz, 1H), 4,20 (d, $J = 17,0$ Hz, 2H), 4,01 (d, $J = 17,0$ Hz, 2H), 2,98 (s, 3H), 2,10 (quint., $J = 7,5$ Hz, 2H), 0,99 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, acetona- d_6): δ 196,1, 143,7, 137,8, 132,6, 62,2, 47,2, 26,1, 13,7.

La etapa 1 y la etapa 2 se repitieron, y la solución de boronato de MIDA generada durante el segundo acoplamiento (la línea 19 del script estándar) se dividió a un tubo de ensayo y a continuación se concentró para dar el compuesto intermedio 5 puro en forma de un sólido incoloro (22 mg, 76 %).



RMN ^1H (500 MHz, acetona- d_6): δ 6,58 (dd, $J = 18,0, 10,5$ Hz, 1H), 6,28 (dd, $J = 15,0, 10,0$ Hz, 1H), 6,20 (dd, $J = 15,0, 10,0$ Hz, 1H), 6,11 (ddt, $J = 15,5, 10,5, 1,5$ Hz, 1H), 5,82 (dt, $J = 15,0, 6,5$ Hz, 1H), 5,64 (d, $J = 17,5$ Hz, 1H), 4,21 (d, $J = 17,0$ Hz, 2H), 4,03 (d, $J = 17,0$ Hz, 2H), 2,99 (s, 3H), 2,12 (quint., $J = 7,5$ Hz, 2H), 0,99 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, acetona- d_6): δ 169,0, 143,5, 138,3, 134,8, 133,5, 130,3, 62,2, 47,3, 26,4, 13,8.

5 todo-*trans*-retinal. Todas las etapas se realizaron de acuerdo con el procedimiento general. La máquina se equipó con tubos de reactivo, de la siguiente forma.



10 **Etapa 1.** La máquina se equipó con un tubo de desprotección cargado de resina Amberlyst (1,0 g) y boronato de MIDA 6 (173 mg, 0,500 mmol); un tubo de secado cargado con tamices moleculares (1,0 g), K_2CO_3 (1,0 g) y Celite® (0,1 g); y un tubo de reacción cargado con Pd-mezcla (244 mg), la SPhos-mezcla (244 mg) y el boronato 2 (52 mg, 0,111 mmol).

15 **Etapa 2.** La máquina se equipó con un tubo de desprotección cargado de resina Amberlyst (0,5 g); un tubo de secado cargado con tamices moleculares (0,5 g), K_2CO_3 (0,5 g) y Celite® (50 mg); y un tubo de reacción cargado con Pd-mezcla (82 mg), la SPhos-mezcla (82 mg). Un tubo de polipropileno separado se cargó con una solución del haluro 7 (0,056 mmol) en THF desgasificado (3 ml).

20 **Automatización.** La síntesis se llevó a cabo de una forma completamente automatizada sin intervención del operador. La etapa 1 se realizó según el script normal. La etapa 2 se realizó siguiendo la modificación con el script de liberación directa/acoplamiento en medio acuoso con la modificación adicional de que el THF utilizado en la línea 8 del script estándar era la totalidad de la solución que contiene el haluro 7. Además, el script de la etapa 2 se detuvo tras la línea 10 y la solución de reacción se extrajo a un tubo de ensayo. El producto se purificó manualmente de la siguiente forma: La solución de reacción se concentró *in vacuo* y el residuo de color amarillo se purificó mediante cromatografía en SiO_2 usando un Isco-Teledyne CombiFlash para dar como resultado todo-*trans*-retinal en forma de un sólido de color amarillo (3,3 mg, 20 %). El espectro de RMN ^1H (CDCl_3) del producto concordó completamente con los datos de la bibliografía (Lee, S. J.; Gray, K. C.; Paek, J. S.; Burke, M. D. J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 466-468).

30 **Ejemplo 4 - Generalidad de la plataforma de purificación**

Para establecer la generalidad de la novedosa plataforma de purificación, se sometió a ensayo su capacidad para purificar una serie de boronatos de MIDA que representan una amplia gama de estructuras, incluyendo derivados de arilo, heteroarilo, alquinilo, alquenilo, y alquilo. En resumen, se prepararon mezclas de reacción brutas señuelo mezclando cada boronato de MIDA (1 equiv.) (Tabla 1) con ácido tolilborónico (1 equiv.) y un catalizador de paladio (0,1 equiv) en THF. Cada una de estas mezclas se sometió a continuación a una purificación completamente automatizada con la plataforma híbrida de precipitación/captura-liberación descrita detalladamente en el presente documento. Al final de este proceso, todos estos boronatos de MIDA se obtuvieron con una pureza >90 % según se determinó mediante el RMN ^1H (véanse las Figuras 11-26), y el rendimiento de los boronatos de MIDA recuperados fue de bueno a notable (Tabla 1).

Tabla 1. Purificación a partir de mezclas de reacción brutas señuelo

Boronato	%Recuperación	Boronato	%Recuperación
	69		76
	53		86
	92		87
	92		90
	92		68
	83		94
	81		86
	78		65

5

Los detalles del procedimiento son de la siguiente forma.

10

Preactivación de la solución de catalizador: Acetato de paladio (II) (0,001875 mmol, 2,5 mol%) y SPhos (0,00375 mmol, 5 % en moles) por purificación a realizar se combinaron en un vial de centelleo de 8 ml provisto de una varilla de agitación revestida de PTFE y se colocó bajo atmósfera de argón. Se añadió THF para generar una solución madre de catalizador 0,01 M (con respecto al acetato de paladio (II)), y se agitó intensamente durante 30 min a temperatura ambiente para generar una solución de color naranja, amarillo o transparente. Tras este proceso de activación, se añadió 1 ml de solución madre de catalizador a la solución del cartucho de polipropileno que contiene la mezcla de reacción simulada.

15

20

Reparación e instalación de la cámara de reacción simulada: Un cartucho de polipropileno fritado de 12 g Luknova se cargó con boronato de MIDA (0,075 mmol, 1 eq), ácido 4-metilbencenoborónico (0,075 mmol, 1 eq), y THF (10 ml). Tras la adición de la solución de catalizador preactivada, el cartucho se instaló en los adaptadores Luer del bloque de reacción del sintetizador automatizado. Una vez instalados todos los cartuchos, se ejecutó la rutina de purificación automática usando la interfaz del ordenador. Las muestras se recogieron en forma de soluciones de THF en viales de centelleo de 40 ml tarados.

25

Concentración, secado azeotrópico, y análisis de materiales recuperados de la purificación: Las soluciones de THF se concentraron a presión reducida en un evaporador rotatorio, a continuación, el tejido se destiló azeotrópicamente con diclorometano (3 x 5 ml) para eliminar los disolventes residuales. Estos residuos se pusieron a continuación bajo vacío durante 12-36 horas, después de lo cual, se determinaron el rendimiento y la pureza por comparación de los RMN ¹H en acetona-d₆ con una muestra convencional del boronato de MIDA deseado con una mezcla de reacción simulada.

Protocolo detallado de purificación automatizada

- 1) En segundo plano, la bomba auxiliar aspira 6 ml de hexanos y los suministra a la parte inferior de la cámara de precipitación, a través de la columna de gel de sílice. Este proceso se repite una vez para un total de 12 ml de hexanos.
- 2) La bomba primaria aspira 9 ml de la mezcla de reacción desde la parte inferior de la cámara de reacción y devuelve 6 ml, a través del fondo, para garantizar que no se suministran más de 3 ml a la cámara de precipitación.
- 3) La bomba primaria suministra 3 ml de mezcla de reacción a la parte superior de la cámara de precipitación que contiene 12 ml de hexanos. Esto induce la precipitación del boronato de MIDA desde la solución de THF. La bomba primaria suministra a continuación dos lechos de nitrógeno seco de 10 ml a la parte inferior de la cámara de precipitación (derivando la columna de gel de sílice) para desalojar la varilla de agitación.
- 4) La suspensión de la cámara de precipitación se aspira de la parte inferior y a través de la columna de gel de sílice mediante la bomba auxiliar. El eluyente se envía al residuo.
- 5) Las etapas 1-4 se repiten tres veces más para enviar toda la mezcla de reacción a la cámara de precipitación.
- 6) La bomba primaria aspira 1,5 ml de THF y lo suministra a la parte superior de la cámara de reacción en forma de enjuague. Las etapas 1-3 se repiten.
- 7) La bomba primaria aspira 1,5 ml de THF y lo suministra a la parte superior de la cámara de reacción en forma de enjuague. Las etapas 2-3 se repiten.
- 8) La etapa 4 se repite.
- 9) Las etapas 1-4 se repiten.
- 10) La etapa 4 se repite.
- 11) La bomba primaria aspira 6,5 ml de MeOH al 1,5 % (v/v) en Et₂O y los suministra a la parte superior de la cámara de precipitación. Este proceso se repite una vez para un suministro total de 13 ml de disolvente.
- 12) La bomba primaria suministra a continuación dos lechos de nitrógeno seco de 10 ml a la parte inferior de la cámara de precipitación (derivando la columna de gel de sílice) para desalojar la varilla de agitación.
- 13) La etapa 4 se repite.
- 14) Las etapas 11-13 se repiten. La etapa 4 se vuelve a repetir.
- 15) Las etapas 11-13 se repiten dos veces con Et₂O en lugar de MeOH al 1,5 % (v/v) en Et₂O. La etapa 4 se repite dos veces más para secar la columna de gel de sílice.
- 16) La bomba auxiliar se enjuaga con 2 x 1 ml de THF para eliminar por lavado todo el MeOH residual. El lavado de THF se envía al residuo.
- 17) La bomba auxiliar aspira 6 ml de THF y lo suministra lentamente a la parte inferior de la cámara de precipitación a través de la columna de gel de sílice. Este proceso se repite una vez para un total de 12 ml de THF.
- 18) La bomba primaria aspira 5 ml de nitrógeno seco y lo suministra a la parte inferior de la cámara de precipitación (derivando la columna de gel de sílice) para agitar la suspensión, lo que promueve la mezcla de la disolución de boronato de MIDA. Este proceso se realiza 40 veces.
- 19) La solución de boronato de MIDA en THF se aspira mediante la bomba primaria de la parte inferior de la cámara de precipitación (derivando la columna de gel de sílice). La solución se suministra al tubo de recogida. Esta aspiración/suministro se repite 5 veces más para garantizar una transferencia completa.
- 20) La bomba auxiliar empuja el THF residual de la columna de gel de sílice hacia la cámara de precipitación como un enjuague.
- 21) La bomba primaria aspira 5 ml de nitrógeno seco y lo suministra a la parte inferior de la cámara de precipitación (derivando la columna de gel de sílice) para agitar la suspensión, lo que promueve la mezcla de la disolución de boronato de MIDA. Este proceso se realiza 5 veces.
- 22) El enjuague de THF se aspira mediante la bomba primaria de la parte inferior de la cámara de precipitación (derivando la columna de gel de sílice). La solución se suministra al tubo de recogida.

El resultado de este estudio de una amplia gama de boronatos de MIDA estructuralmente diferentes demuestra que la estrategia de purificación híbrida mediante precipitación/captura-liberación es notablemente general.

Ejemplo 5 --Módulo de desprotección en medio acuoso

La desprotección automatizada en medio acuoso de fenilboronato de MIDA, trienilboronato de MIDA, y butenilboronato de MIDA se llevó a cabo usando la estrategia y módulo de desprotección en medio acuoso anteriormente descritos.

La desprotección automatizada en medio acuoso de fenilboronato de MIDA dio como resultado el ácido fenilborónico. El posterior acoplamiento cruzado automatizado posterior con el bloque de construcción de yoduro de vinilo bifuncional dio como resultado el producto acoplado deseado con un rendimiento del 77 % tras purificación manual. Véase

Figura 28A.

La desprotección automatizada en medio acuoso del trienilboronato de MIDA dio como resultado el ácido trienilborónico. El posterior acoplamiento cruzado automatizado posterior con el bloque de construcción de yoduro de vinilo bifuncional dio como resultado el producto acoplado deseado con un rendimiento del 66 % tras purificación manual. Véase la Figura 28B.

La desprotección automatizada en medio acuoso del butenilboronato de MIDA dio como resultado el ácido butenilborónico. El posterior acoplamiento cruzado automatizado con una mezcla isomérica del bloque de construcción de yoduro de vinilo bifuncional dio como resultado un rendimiento del 75 % de los productos esperados de trienilo isomérico acoplados, con un rendimiento del 75 % tras purificación automatizada. Véase la Figura 28C.

5 Ejemplo 6 -- Síntesis completamente automatizada de todo-trans-retinal usando el módulo de desprotección en medio acuoso

10 *El primer tubo de desprotección se preparó de la siguiente forma:* A un cartucho fritado de 12 g nuevo (Luknova, Mansfield, MA, 02048, n.º de pieza FC003012) se añadió trienilboronato de MIDA (345,2 mg, 1 mmol, 9 equiv.). A esto se añadió hidróxido de sodio (120,0 mg, 3 mmol, 27 equiv.). El cartucho se tapó con el tapón roscado con el puerto Luer hembra. A este puerto Luer se conectó el cuerpo de un cilindro de una jeringa de polipropileno de 5 ml (Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Alemania, 78532, n.º de pieza A5) de la que se había extraído el émbolo. El primer tubo de desprotección se envolvió con una lámina de aluminio.

15 *El segundo tubo de desprotección se preparó de la siguiente forma:* A un cartucho fritado de 12 g nuevo (Luknova, Mansfield, MA, 02048, n.º de pieza FC003012) se añadió hidróxido de sodio (40,0 mg, 1 mmol, 9 equiv.). Los gránulos de hidróxido de sodio se habían afeitado hasta la masa correcta con una hoja de afeitar limpia y se manipularon rápidamente para minimizar la absorción de humedad atmosférica. El cartucho se tapó con el tapón roscado con el puerto Luer hembra. A este puerto Luer se conectó el cuerpo de un cilindro de una jeringa de polipropileno de 5 ml (Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Alemania, 78532, n.º de pieza A5) de la que se había extraído el émbolo. Este segundo tubo de desprotección se envolvió con una lámina de aluminio.

20 *El primer y el segundo tubos de presecado se prepararon de la siguiente forma:* A un cartucho fritado de 12 g nuevo (Luknova, Mansfield, MA, 02048, n.º de pieza FC003012) se añadió Celite® 545 como auxiliar de filtración (800 mg, sin lavado con ácido, Acros Organics, n.º de producto 349670025, Lote n.º A0287832). A esto se añadió sulfato de magnesio anhidro (2,1 g, ReagentPlus®, >99,5 %, Sigma-Aldrich, n.º de producto M7506, Lote n.º 080M0246V). Estos dos sólidos se mezclaron con una espátula hasta que la mezcla fue visiblemente homogénea. En la parte superior de la mezcla sólida se colocó un émbolo de jeringa de polipropileno de 5 ml (Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Alemania, 78532, n.º de pieza A5), cortado manualmente a aproximadamente 6,5 cm de longitud. El cartucho se tapó con el tapón roscado con el puerto Luer hembra. El puerto Luer se cubrió herméticamente con un cuadrado (aproximadamente 1 cm x 1 cm) de lámina de aluminio. Cada tubo de presecado se envolvió con una lámina de aluminio.

25 *El primer y el segundo tubos de secado se prepararon de la siguiente forma:* A un cartucho fritado de 12 g nuevo (Luknova, Mansfield, MA, 02048, n.º de pieza FC003012) se añadió Celite® 545 como auxiliar de filtración (300 mg, sin lavado con ácido, Acros Organics, n.º de producto 349670025, Lote n.º A0287832). A esto se añadieron tamices moleculares activos (3,6 g, 4 Å, malla -325, Sigma-Aldrich, n.º de producto 688363, Lote n.º MKBF4010V). Los tamices moleculares se activaron a 300 °C, presión ambiente, 24 h, y se enfriaron/recogieron en un desecador de vacío bajo atmósfera de argón Drierite. Estos dos sólidos no se mezclaron. En la parte superior de los sólidos estratificados se colocó un émbolo de jeringa de polipropileno de 5 ml (Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Alemania, 78532, n.º de pieza A5), cortado manualmente a aproximadamente 5,5 cm de longitud. El cartucho se tapó con el tapón roscado con el puerto Luer hembra. Cada tubo de secado se envolvió con una lámina de aluminio.

30 *El primer y el segundo tubos de desoxigenación/concentración se prepararon de la siguiente forma:* Un cartucho fritado de 12 g nuevo (Luknova, Mansfield, MA, 02048, n.º de pieza FC003012) se tapó con su tapón roscado con el puerto Luer hembra. Cada tubo de desoxigenación/concentración se envolvió con una lámina de aluminio.

35 *El primer tubo de reacción se preparó de la siguiente forma:* A un cartucho fritado de 12 g nuevo (Luknova, Mansfield, MA, 02048, n.º de pieza FC003012) se añadió una placa fritada 4-g (Luknova, Mansfield, MA, 02048, n.º de pieza FC003004). Esta placa fritada se fijó, de forma concéntrica, al cartucho fritado de 12 g provisto de alambre 26 G Chromel A, perforado a través de la placa fritada de 12 g. A este tubo de reacción se añadió, en orden, fosfato de potasio anhidro (1,39 g, 3 mmol + 750 mg, 27 equiv + 750 mg, 97 %, Alfa Aesar, n.º de producto L15168, n.º de lote L02U015), acetato de paladio (II) (1,9 mg, 0,0083 mmol, 2,5 % en moles, > 99,9 %, Sigma-Aldrich, n.º de producto 520764, n.º de lote 1000824996), 2-diciclohexilfosfino-2',6'-dimetoxi-1,1'-bifenilo (Sphos, 6,8 mg, 0,017 mmol, 5 % en moles, 98 %, Strem Chemicals, n.º de producto 15-1143, n.º de lote 18526300), vinilyoduro boronato de MIDA (103,0 mg, 0,33 mmol, 3 equiv.), y una varilla de agitación de tierras raras revestida de PTFE. Se molió recientemente fosfato de potasio con mortero y mano de mortero a 100 °C. El cartucho se tapó con su tapón roscado con el puerto Luer hembra personalizado. El tapón personalizado consiste en un tapón con puerto Luer hembra estándar doblada (en aproximadamente 45°), una aguja desechable de 1,5 pulgadas de 18 G desechable instalada a través del tapón y una pequeña bola de Kimwipe insertada en el puerto Luer. Es importante retirar el tapón de propileno sin núcleo del interior de la aguja tras la instalación. El tapón se remató con un cartucho fritado de 4 g (Luknova, Mansfield, MA, 02048, n.º de pieza FC003004).

40 *El tubo de precipitación se preparó de la siguiente forma:* A un cartucho fritado de 12 g nuevo (Luknova, Mansfield, MA, 02048, n.º de pieza FC003012) provisto de una varilla de agitación magnética revestida de PTFE se añadió Celite®

545 como auxiliar de filtración (150 mg, sin lavado con ácido, Acros Organics, n.º de producto 349670025, n.º de lote A0287832) y gel de sílice funcionalizado con 3-aminopropilo, (250 mg, 40-63 mm, aproximadamente 1 mmol/g NH₂, Sigma-Aldrich, n.º de producto 364258, Lote n.º 79096HM). El cartucho se tapó con el tapón roscado con el puerto Luer hembra. Al cartucho se añadieron hexanos (5 ml, calidad reactivo) y la suspensión resultante se agitó intensamente para mezclar los sólidos. La suspensión mezclada se dejó sedimentar durante aproximadamente 5 segundos y a continuación el disolvente se drenó forzando un volumen de aire ambiente a través de la parte superior del cartucho con una jeringa. Este proceso incrusta firmemente la varilla de agitación en los sólidos para evitar la agitación antes del uso del tubo de agitación. Este tubo de precipitación se envolvió con una lámina de aluminio.

La columna de cromatografía de gel de sílice se preparó de la siguiente forma: Una columna para cromatografía en columna de gel de sílice se preparó recientemente con accesorios de PTFE usando gel de sílice no funcionalizada. El cartucho se modeló como un cartucho de 4 g (Luknova, Mansfield, MA, 02048, n.º de pieza FC003004), pero se hizo de PTFE en lugar de polipropileno. A una columna fritada limpia se añadió gel de sílice. Esto se realizó mediante aspiración al vacío a través de la parte inferior del accesorio de punta Luer macho. Se aseguró la hermeticidad, incluso empacutando el lecho de gel de sílice. El exceso de gel de sílice se retiró manualmente con una espátula y una placa fritada de 4 g (Luknova, Mansfield, MA, 02048, n.º de pieza FC003004) se colocó en la parte superior del lecho de sílice. Este cartucho doblemente fritado se tapó con su tapón roscado con el puerto Luer hembra, usando cinta de PTFE para garantizar un precinto hermético.

El segundo recipiente de reacción se preparó de la siguiente forma: A un vial de vidrio de 7 ml no secado a la llama provisto de una varilla de agitación magnética revestida de PTFE se añadió acetato de paladio (II) (1,2 mg, 0,0056 mmol, 5 % en moles, > 99,9 %, Sigma-Aldrich, n.º de producto 520764, n.º de lote 1000824996), 2-diciclohexilfosfino-2',6'-dimetoxi-1,1'-bifenilo (Sphos, 4,6 mg, 0,011 mmol, 10 % en moles, 98 %, Strem Chemicals, n.º de producto 15-1143, n.º de lote 18526300), y fosfato de potasio anhidro (212 mg, 1 mmol, 9 equiv., 97 %, Alfa Aesar, n.º de producto L15168, Lote n.º L02U015). Se molió recientemente fosfato de potasio con mortero y mano de mortero a 100 °C. Este vial se precintó con un tapón roscado con un septo revestido de PTFE. A través del septo se introdujo una aguja de 1,5 pulgadas (3,81 cm) desechable conectada a una línea de gas argón en seco. A continuación, a través del septo se introdujo una aguja de 1,5 pulgadas (3,81 cm) desechable para actuar como venteo. El vial de reacción se purgó a continuación con argón seco durante aproximadamente 7 min. La aguja de venteo se retiró del septo.

Los tubos, recipientes y columnas anteriormente descritos se utilizaron de la siguiente forma: Véase la Figura 29 para un esquema de reacción. Ambos tubos de desprotección (envueltos con una lámina de aluminio) se introdujeron firmemente en la máquina. Los tubos se instalaron colocando la punta Luer macho del tubo en el puerto Luer hembra adecuado de la máquina, y se fijaron con una fuerza firme descendente y una pequeña rotación en la dirección de las agujas del reloj (menos de un cuarto de vuelta). Ambos tubos de presecado (envueltos y rematados con una lámina de aluminio) se introdujeron firmemente en la máquina. Ambos tubos de secado (envueltos con una lámina de aluminio) se introdujeron firmemente en la máquina. Cada tubo de secado se conectó al colector de gas inerte uniéndolo a una línea de desconexión al colector de gas de la máquina y al puerto Luer superior del tubo. Las líneas de conexión tienen aproximadamente 12 pulgadas (31 cm) de longitud, con accesorios de punta Luer macho en ambos extremos. Ambos tubos de desoxigenación/concentración (envueltos con una lámina de aluminio) se introdujeron firmemente en la máquina. Cada tubo de desoxigenación/concentración se conectó al colector de gas inerte uniéndolo a una línea de desconexión al colector de gas de la máquina y al puerto Luer superior del tubo. Las líneas de conexión del venteo tienen aproximadamente 12 pulgadas (31 cm) de longitud, con un accesorio de punta Luer macho en el extremo de la máquina y un conector en Y (un puerto conectado a la línea, un puerto conectado a un accesorio de punta Luer macho, y un puerto abierto) en el extremo del tubo. El primer tubo de reacción se instaló firmemente en la máquina (en un bloque calefactor precalentado a 40 °C) y conectado al colector de gas inerte mediante la unión de la línea de venteo de la reacción al puerto Luer de la parte superior del tubo. El tubo de reacción se cubrió a continuación con una lámina de aluminio y se dejó en agitación a 600 rpm. La columna de gel de sílice se instaló firmemente en la máquina y se conectó al módulo de purificación conectando la línea de eluyente al puerto Luer de la parte superior de la columna. El tubo de precipitación (envuelto con una lámina de aluminio) se instaló firmemente en la máquina y se conectó al módulo de purificación colocando la línea del eluyente (fijada con una aguja de 1,5 pulgadas (3,81 cm) 18 g desechable) a través del puerto Luer superior del tubo).

El código preensamblado del experimento se cargó a continuación y se ejecutó para iniciar la secuencia automatizada. La primera desprotección de boronato de MIDA en medio acuoso comenzó inmediatamente. Tras ejecutar la primera desprotección (ta, 10 min), la máquina inactivó y elaboró la solución de ácido borónico resultante y después la secó, la desoxigenó, y la concentró. La máquina realizó a continuación la primera reacción de acoplamiento cruzado, de adición lenta (40 °C, 8 h total) y purificó el producto acoplado resultante. A continuación, la máquina ejecutó la segunda desprotección de boronato de MIDA en medio acuoso (ta, 10 min) y posteriormente inactivó, elaboró, secó, desoxigenó, y concentró la solución de ácido borónico resultante.

Aproximadamente 5 minutos antes de comenzar la segunda reacción de acoplamiento, el segundo recipiente de reacción se introdujo en un bloque de aluminio (a temperatura ambiente) sobre una placa agitadora. Se conectó una línea de venteo (fijada con una aguja de 1,5 pulgadas (3,81 cm) 20 G, desechable), a través del septo. El tubo de reacción se cubrió a continuación con una lámina de aluminio y se dejó en agitación a 600 rpm. Por separado, en un

- vial de vidrio de 1,5 ml no secado a la llama se añadió el aldehído (16,6 mg, 0,11 mmol, 1 equiv.). El vial se precintó con un tapón roscado con septo y a esto se añadieron 100 ml de THF desoxigenado desde una jeringa de vidrio hermética de 100 ml con aguja fija. El vial se agitó suavemente de forma manual para disolver el aldehído y luego se añadió al vial de reacción con la misma jeringa. El aldehído residual remanente se transfirió cuantitativamente al vial de reacción con 2 x 50 ml de THF seco desoxigenado usando la misma jeringa. A medida que la máquina desoxigena automáticamente la línea de la reacción de adición (fijada con una aguja de 1,5 pulgadas (3,81 cm) 22 G, desechable), esta se conectó al recipiente de reacción, a través del septo. La máquina realizó a continuación la segunda reacción de acoplamiento cruzado, de adición rápida (ta, 3 h).
- 5
- 10 Al cabo de las 3 horas, el vial de reacción se retiró de la máquina y la mezcla de reacción en bruto se filtró a través de un lecho de Celite® de 1 cm introducido en una pipeta. El vial de reacción se lavó con 3 x 2 ml de THF seco y estos lavados se filtraron por el lecho de Celite®. Después, el lecho se lavó con 3 x 2 ml de THF seco. El filtrado resultante de color amarillo transparente se concentró *in vacuo* (ta, 80 Torr, (11 kPa), se destiló azeotrópicamente con 3 x 5 ml de diclorometano (ta, 80 Torr, (11 kPa), y el disolvente residual se eliminó con alto vacío (30 min, 200 mTorr, (27 Pa) para dar como resultado un sólido pegajoso de color amarillo oscuro/naranja. Este producto bruto se purificó manualmente mediante cromatografía en columna ultrarrápida de gel de sílice para dar como resultado una mezcla de todo-trans-retinal: 13-cis-retinal en una relación de 1:0,55 con un rendimiento combinado total del 30 %.
- 15

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar un boronato del ácido N-metiliminodiacético (MIDA) a partir de una solución, que comprende las etapas de diluir la solución con hexano, precipitando selectivamente, de esta forma, el boronato de MIDA; y aislar el boronato de MIDA precipitado, en el que la solución que comprende el boronato de MIDA es una solución de THF.

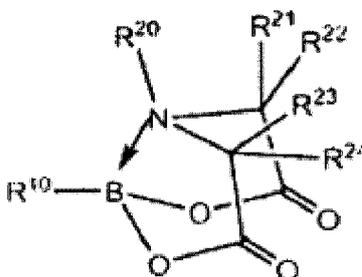
2. El método de la reivindicación 1, en el que se aplica uno o más de los siguientes

- (a) el aislamiento comprende filtrar el boronato de MIDA precipitado;
- (b) el método comprende además la etapa de disolver el boronato de MIDA precipitado en tetrahidrofurano (THF);
- (c) la solución que comprende el boronato de MIDA se añade gota a gota al hexano;
- (d) el volumen de hexano está comprendido entre aproximadamente dos y aproximadamente cuatro veces el volumen de la solución;
- (e) el volumen de hexano es aproximadamente tres veces el volumen de la solución; y
- (f) la solución que comprende el boronato de MIDA es una mezcla de producto bruto procedente de una reacción química; en la que, opcionalmente,

la reacción química se selecciona del grupo que consiste en un acoplamiento de Suzuki-Miyaura, una oxidación, una oxidación de Swern, una oxidación con "reactivo de Jones", una reducción, reacción de aldol de Evans, una olefinación de HWE, una olefinación de Takai, una silylación de alcohol, una desilylación, una p-metoxibencilación, una yodación, un acoplamiento cruzado de Negishi, un acoplamiento de Heck, una borilación de Miyaura, un acoplamiento de Stille, y un acoplamiento de Sonogashira; o,

la reacción química comprende la etapa de poner en contacto un boronato de MIDA con un reactivo, en el que el boronato de MIDA comprende un boro que tiene una hibridación sp^3 , un grupo protector de MIDA unido al boro, y un grupo orgánico unido al boro a través de un enlace boro-carbono; el grupo orgánico se transforma químicamente, y el boro no está transformado químicamente.

3. El método de la reivindicación 1, en el que el boronato de MIDA está representado mediante



R^{10} representa un grupo orgánico; B representa boro que tiene una hibridación sp^3 ; R^{20} es metilo; y R^{21} , R^{22} , R^{23} y R^{24} se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste de un grupo hidrógeno y un grupo orgánico; en la que, opcionalmente, R^{21} , R^{22} , R^{23} y R^{24} son hidrógeno.

4. El método de la reivindicación 1, en el que el aislamiento del boronato de MIDA precipitado comprende las etapas de hacer pasar la solución diluida a través de un lecho de gel de sílice, depositando de esta forma el boronato de MIDA precipitado sobre el lecho de gel de sílice; para hacer pasar un primer líquido a través del lecho de sílice; y hacer pasar un segundo líquido a través del lecho de sílice, eluyendo de esta forma el boronato de MIDA en el segundo líquido; en el que el primer líquido contiene dietil éter o la polaridad del primer líquido es menor o igual que aproximadamente la de una mezcla de 98,5:1,5 (v/v) de $Et_2O:MeOH$; y la polaridad del segundo líquido es mayor o igual que aproximadamente la polaridad del tetrahidrofurano (THF).

5. El método de la reivindicación 4, en el que se aplica uno o más de los siguientes,

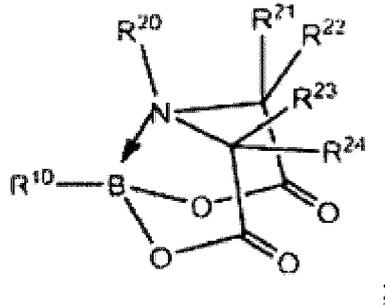
- (a) el primer líquido comprende dietil éter;
- (b) el primer líquido es dietil éter;
- (c) el primer líquido es una mezcla de dietil éter y metanol;
- (d) el primer líquido es una mezcla de dietil éter y metanol; y la relación entre dietil éter y metanol es 98,5:1,5 (v/v);
- (e) el segundo líquido es THF, MeCN, acetato de etilo o acetona, o un disolvente de polaridad similar o superior;
- (f) el segundo líquido es THF, MeCN, acetato de etilo o acetona;
- (g) el segundo líquido es THF; y
- (h) la solución es una mezcla de producto bruto procedente de una reacción química; en la que opcionalmente la reacción química se selecciona del grupo que consiste en un acoplamiento de Suzuki-Miyaura, una oxidación, una

oxidación de Swern, una oxidación con "reactivo de Jones", una reducción, reacción de aldol de Evans, una olefinación de HWE, una olefinación de Takai, una sililación de alcohol, una desililación, una p-metoxibencilación, una yodación, un acoplamiento cruzado de Negishi, un acoplamiento de Heck, una borilación de Miyaura, un acoplamiento de Stille, y un acoplamiento de Sonogashira; o,

5 la reacción química comprende la etapa de poner en contacto un boronato de MIDA con un reactivo, en el que el boronato de MIDA comprende un boro que tiene una hibridación sp^3 , un grupo protector de MIDA unido al boro, y un grupo orgánico unido al boro a través de un enlace boro-carbono; el grupo orgánico se transforma químicamente, y el boro no está transformado químicamente.

10

6. El método de la reivindicación 4, en el que el boronato de MIDA está representado mediante



;

15 R^{10} representa un grupo orgánico; B representa boro que tiene una hibridación sp^3 ; R^{20} es metilo; y R^{21} , R^{22} , R^{23} y R^{24} se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste de un grupo hidrógeno y un grupo orgánico; en la que, opcionalmente, R^{21} , R^{22} , R^{23} , y R^{24} son hidrógeno.

Figura 1

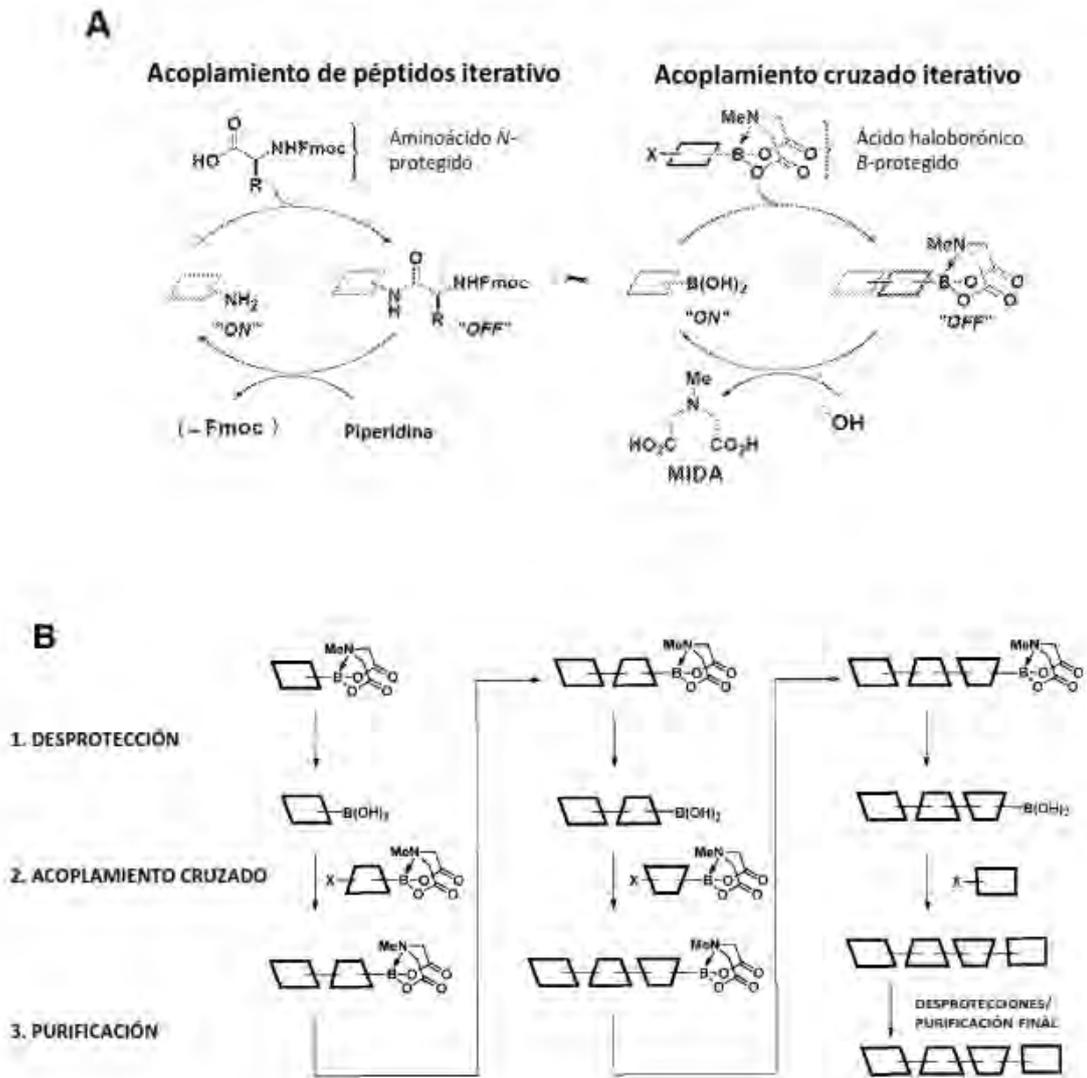
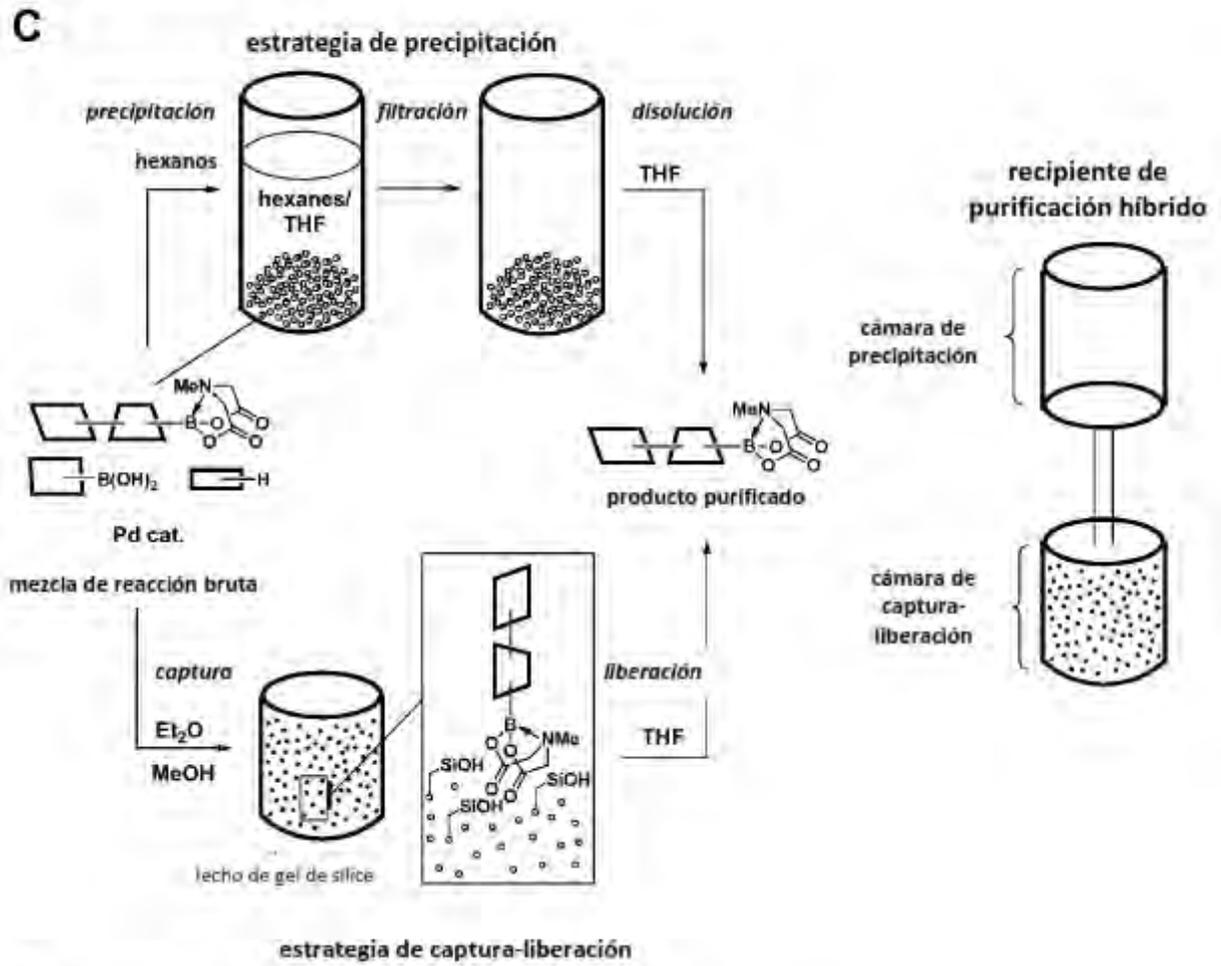


Figura 1 (continuación)



D

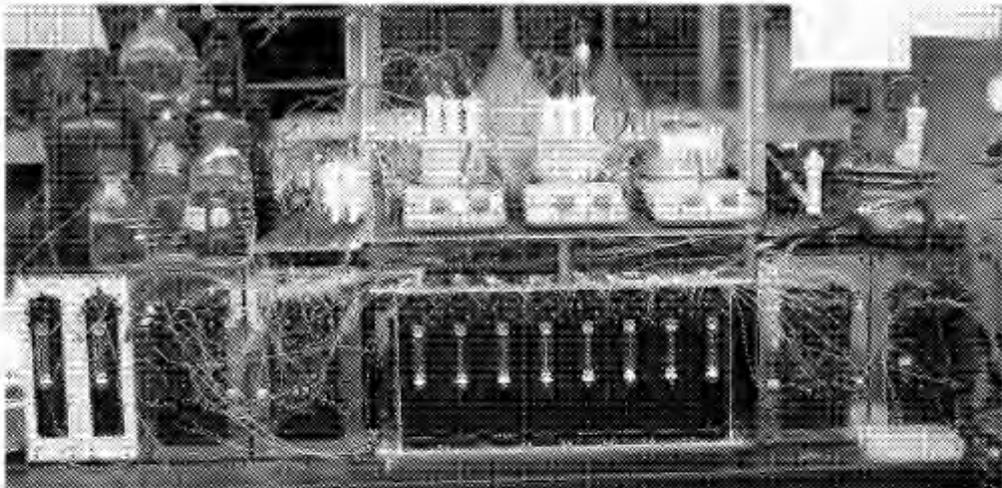


Figura 2

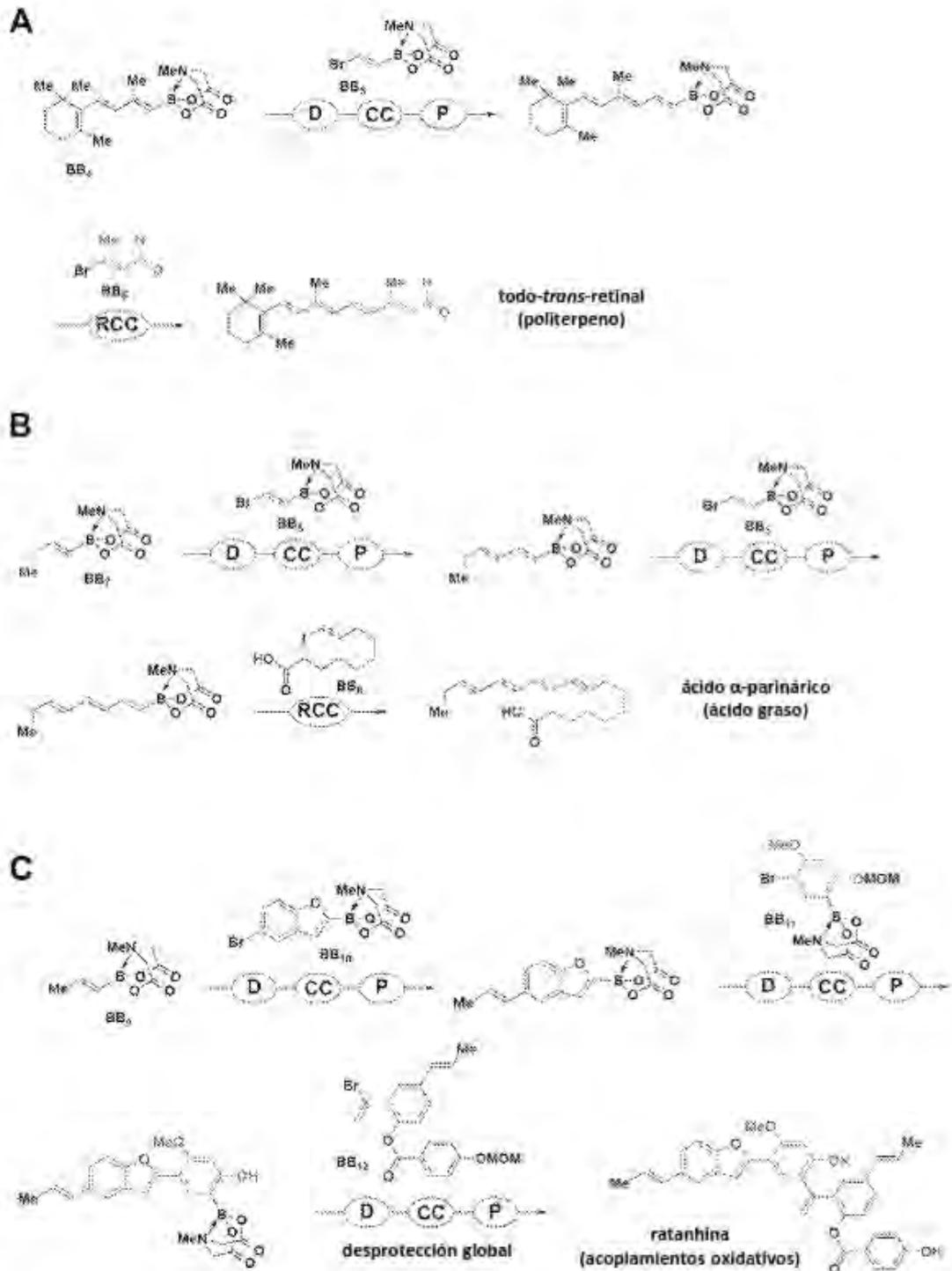


Figura 2 (continuación)

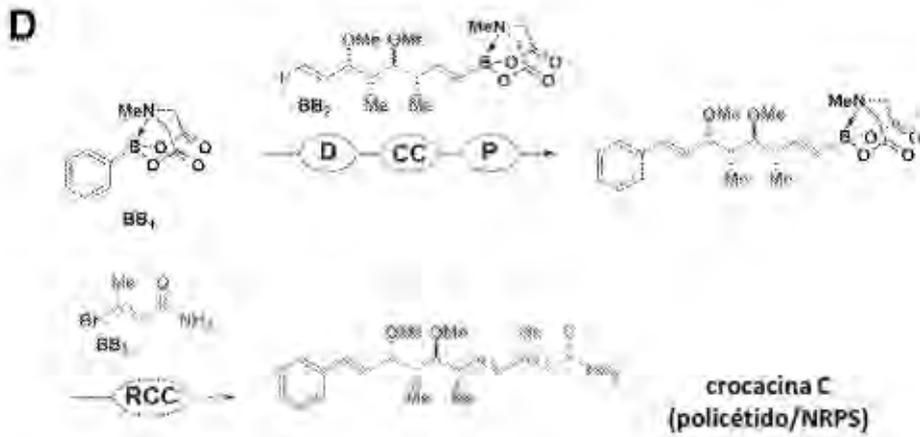


Figura 3

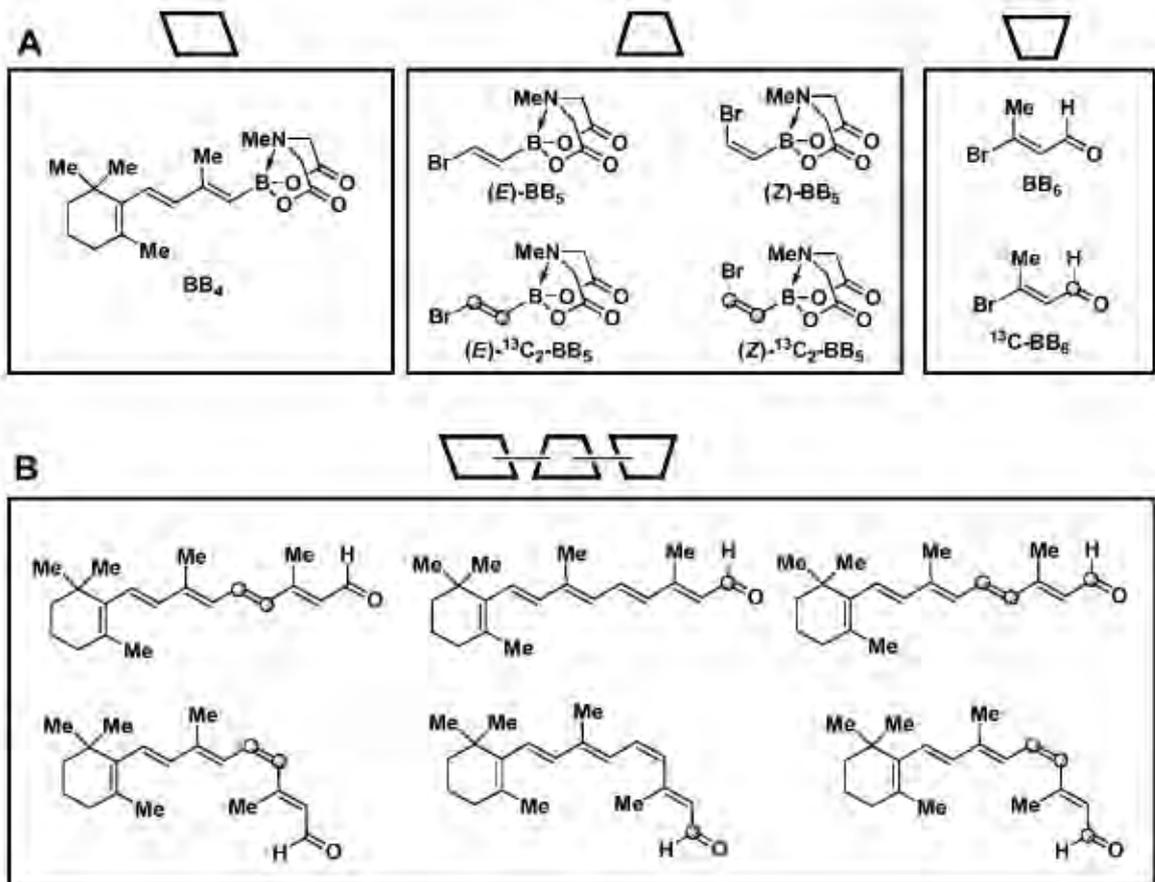


Figura 4

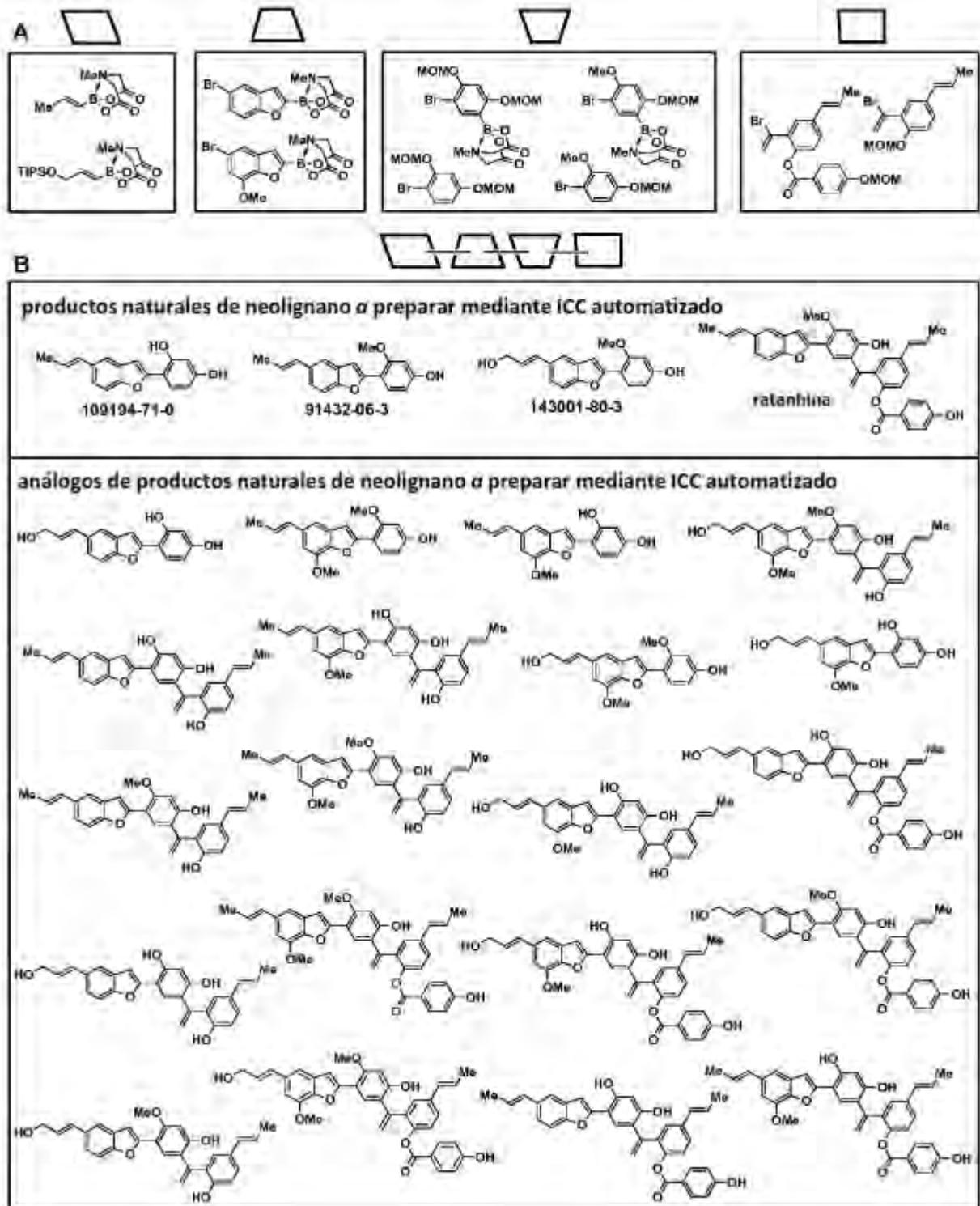


Figura 5

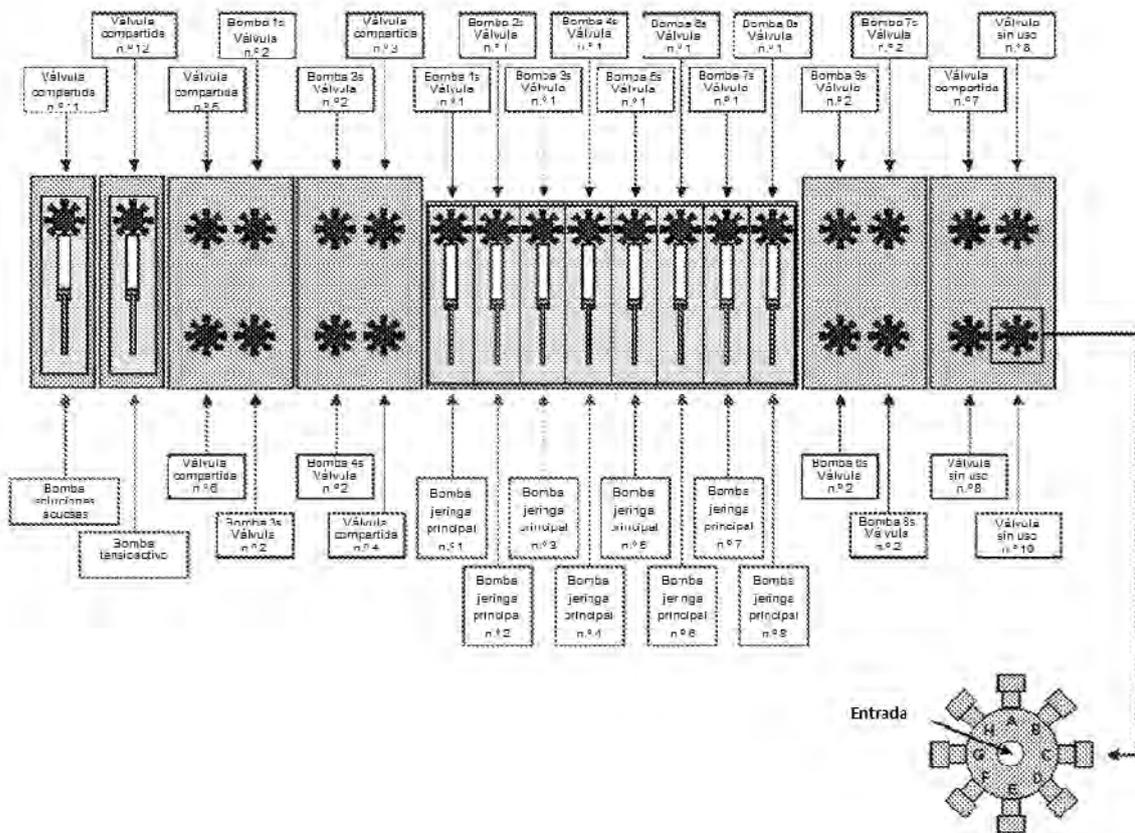
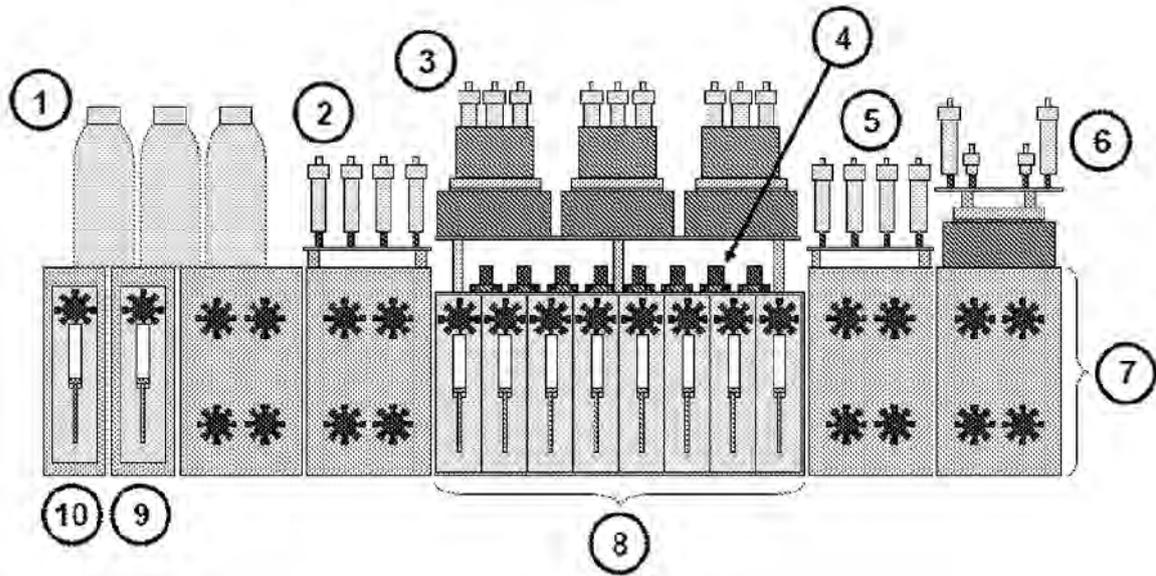


Figura 6

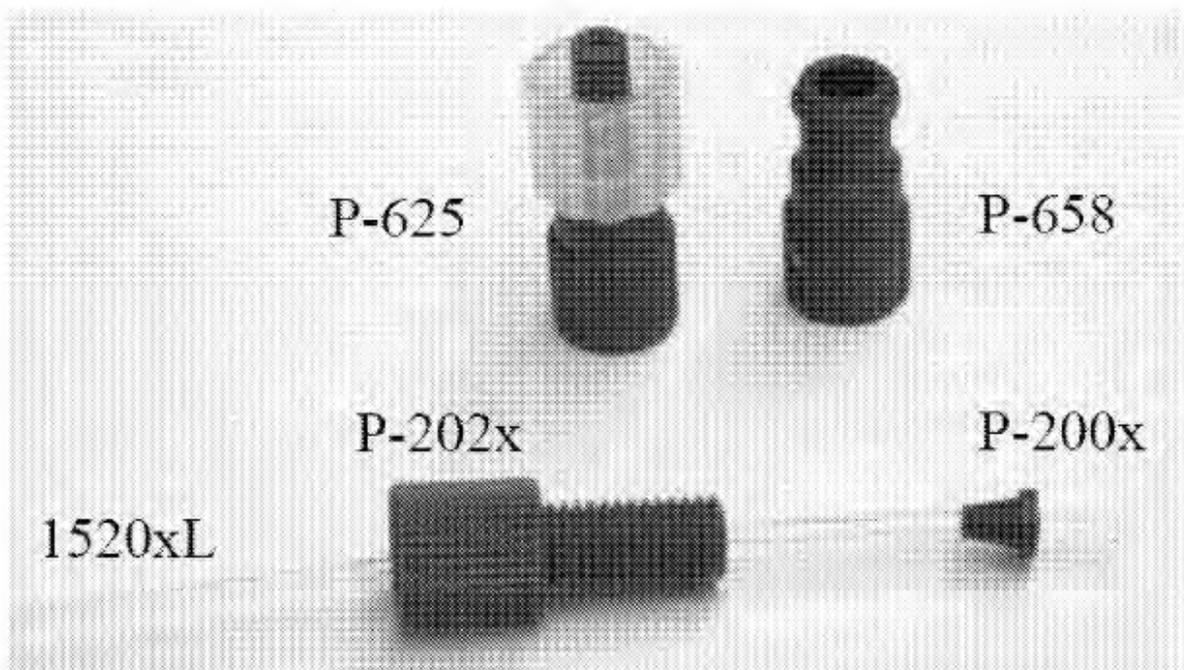
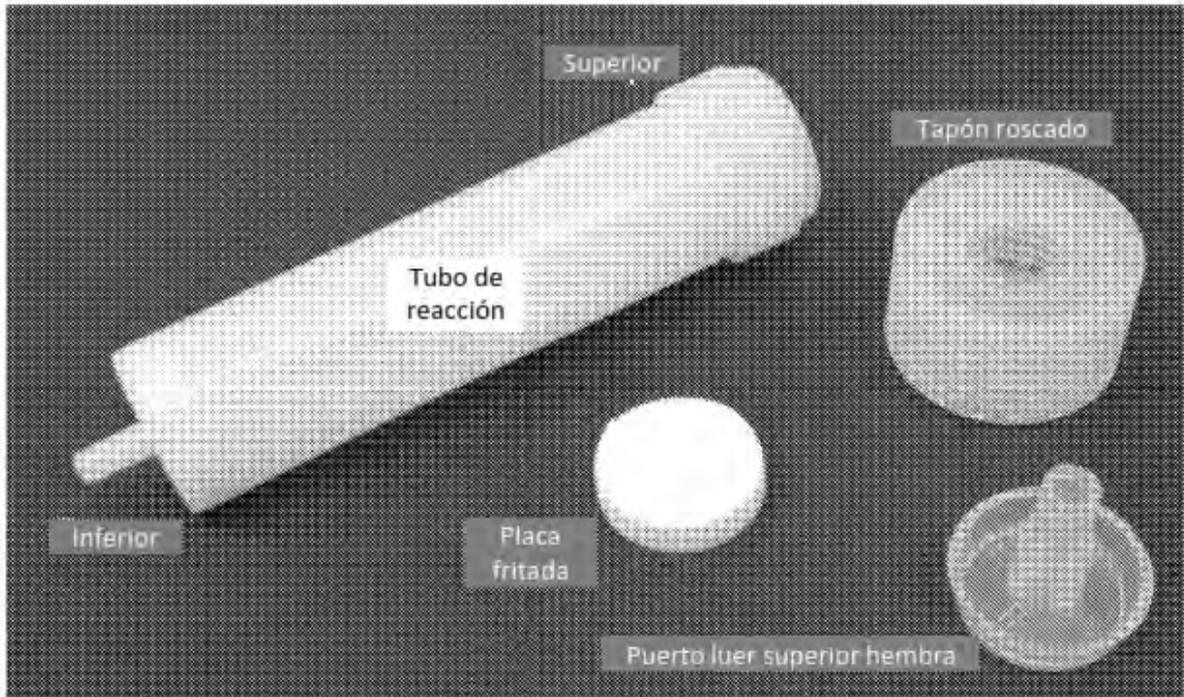
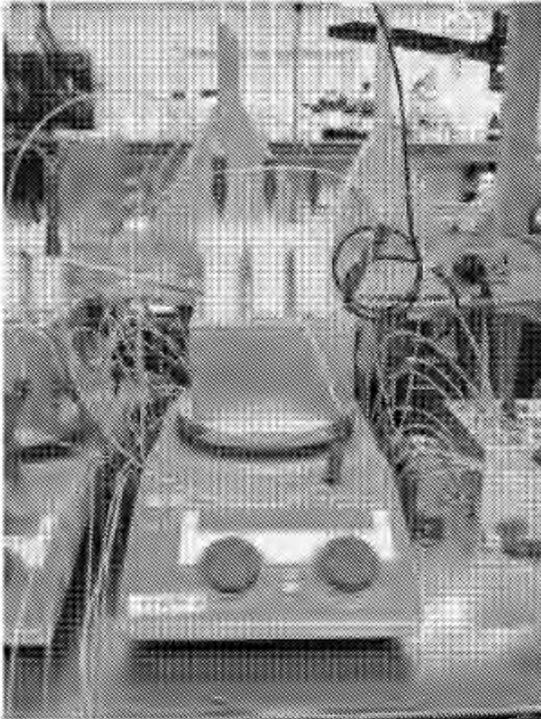


Figura 8



Tubo de reacción

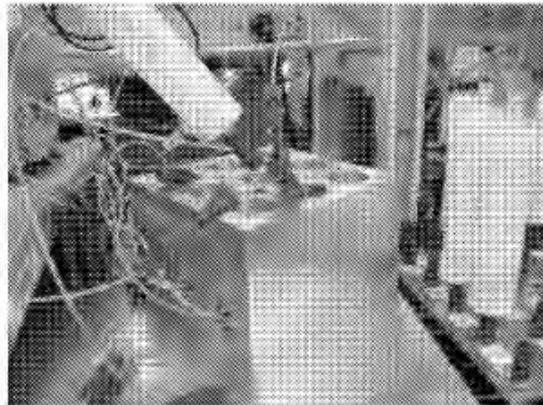
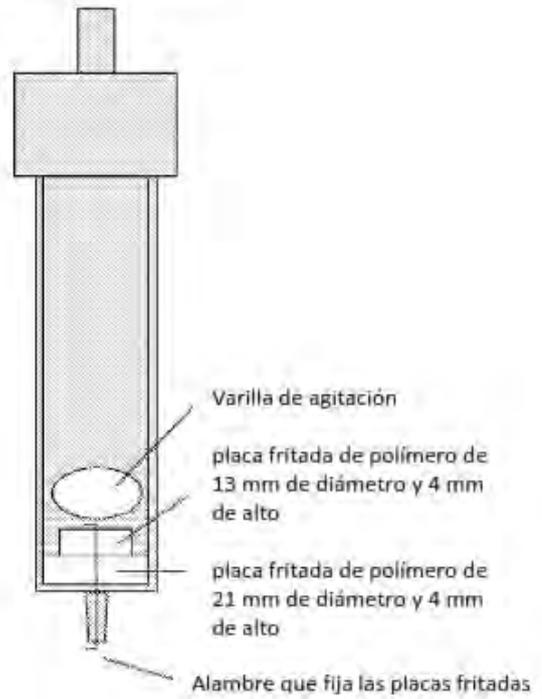


Figura 9

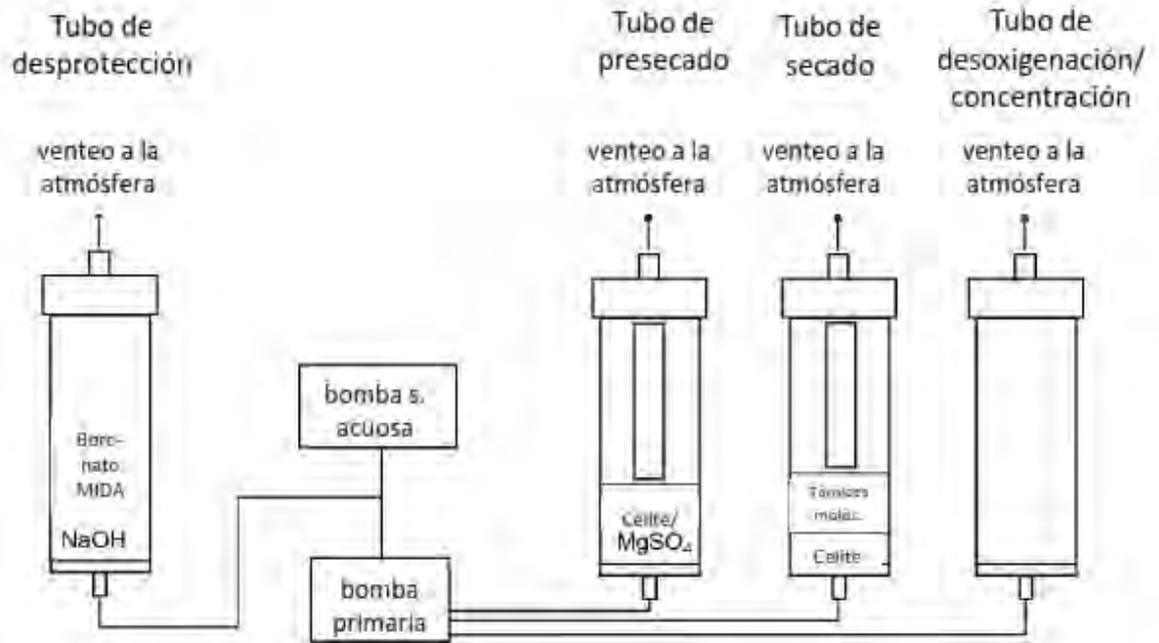


Figura 10

Bomba principal (añade reac. en bruto en THF, Et₂O con MeOH y Et₂O)

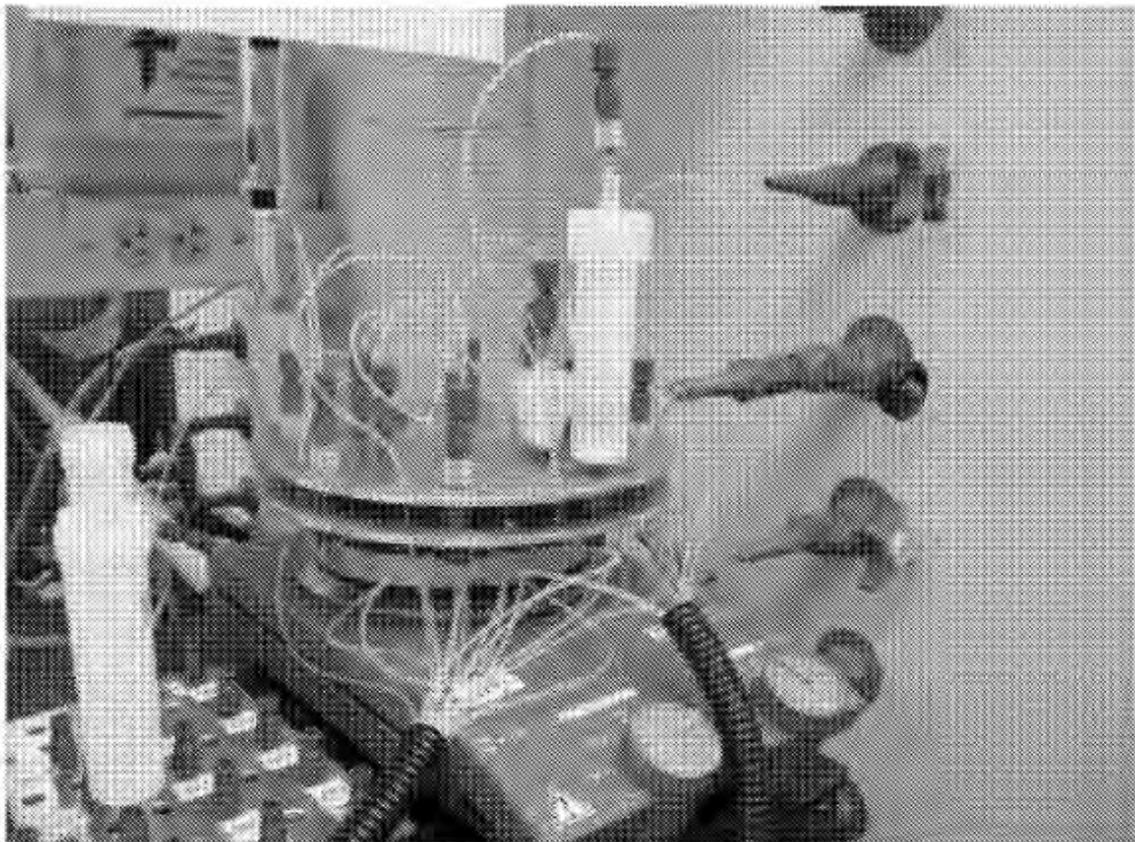
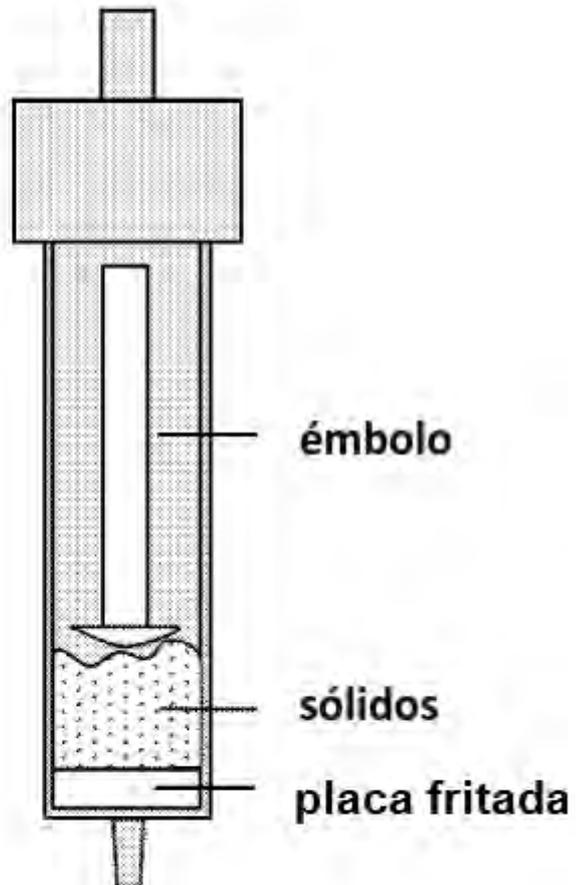


Figura 11



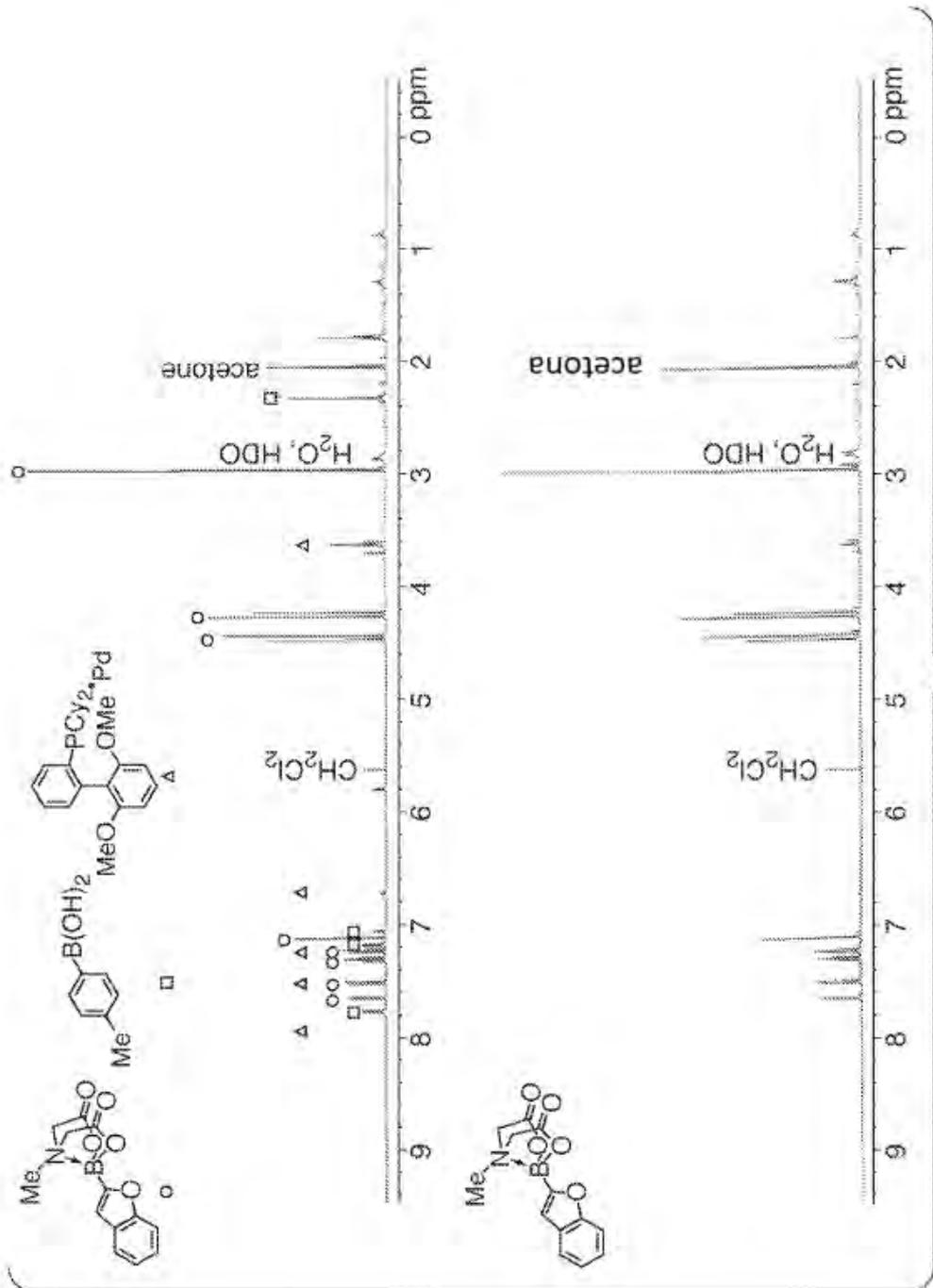


Figura 12

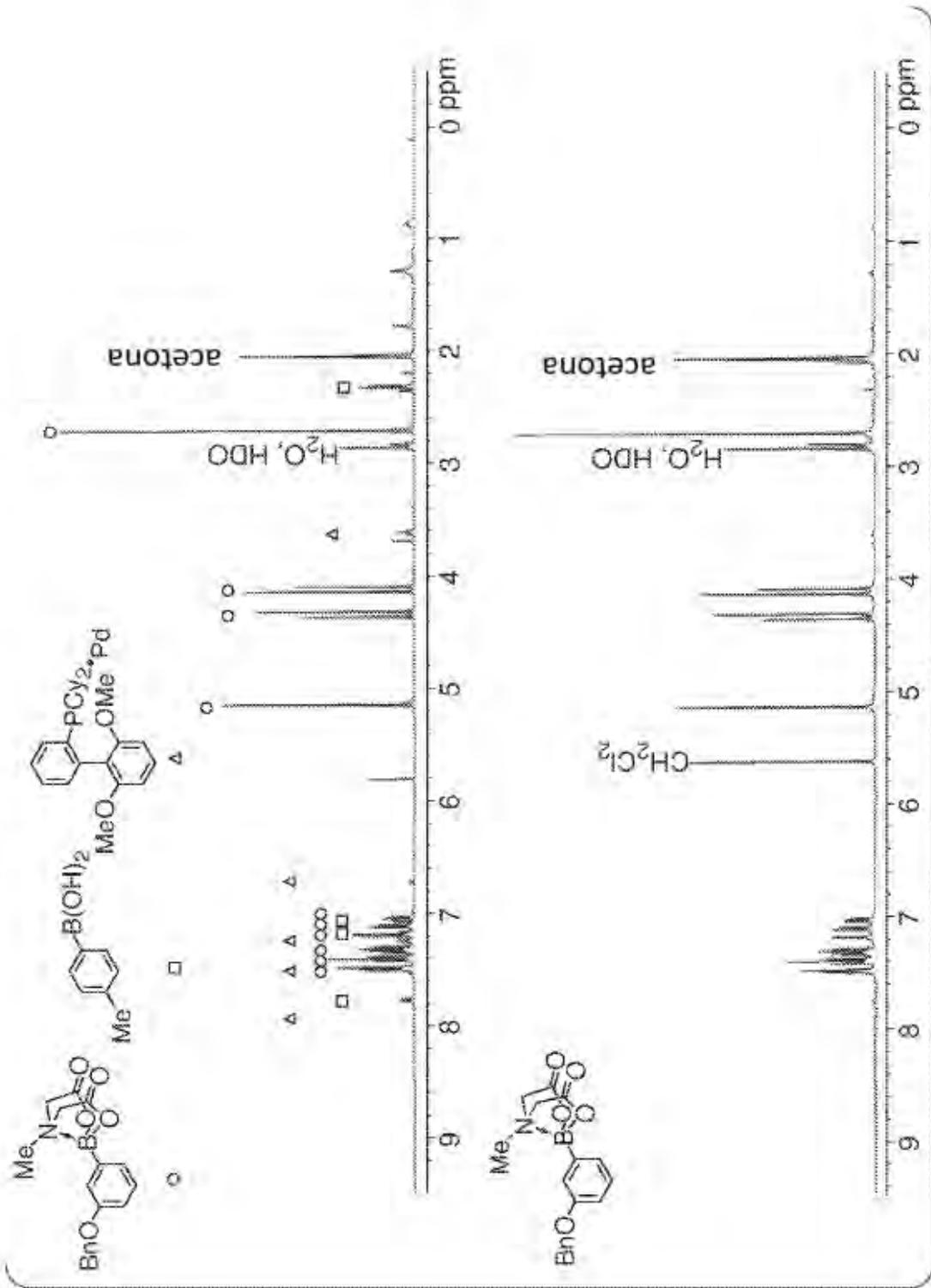


Figure 13

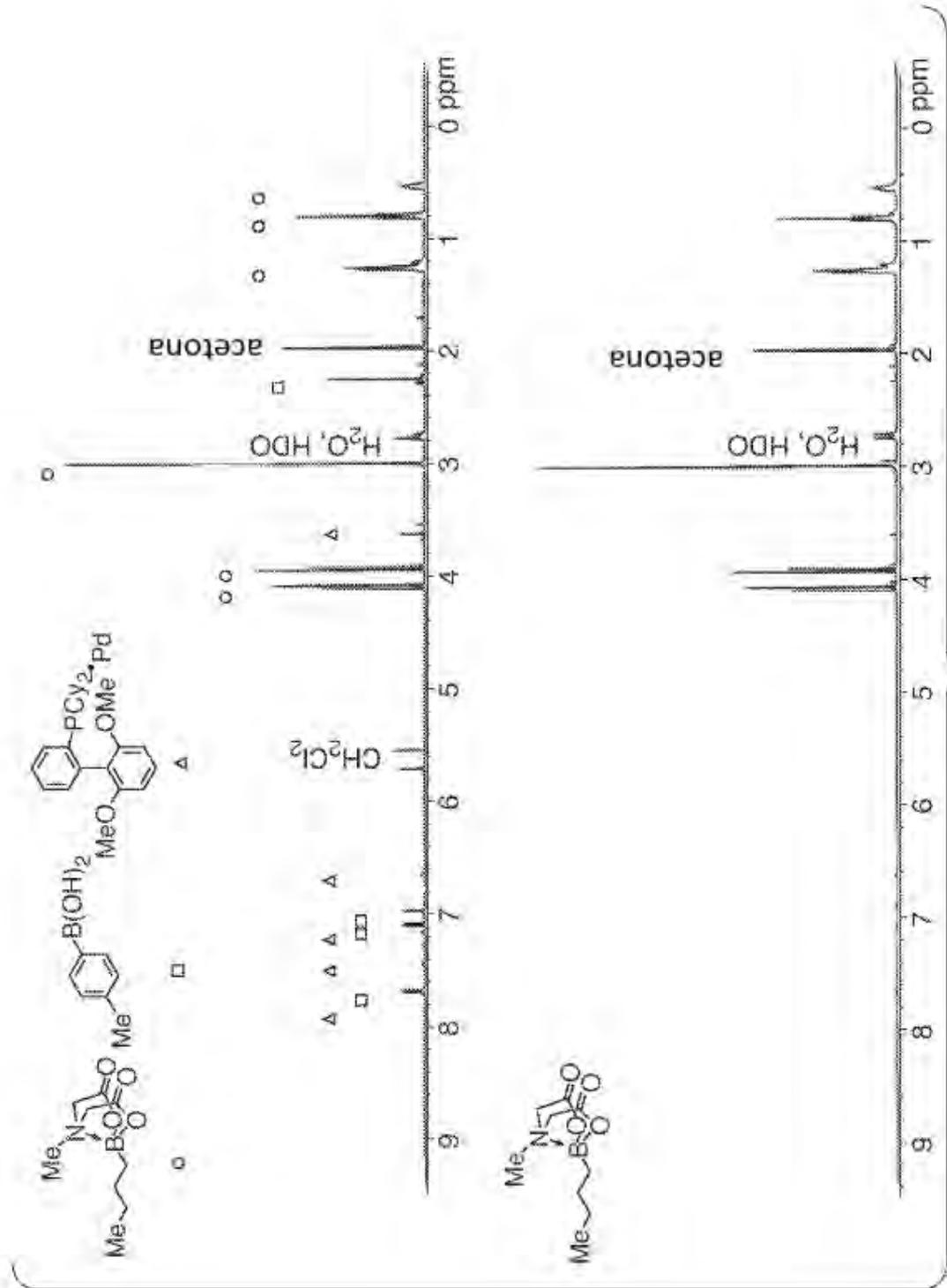


Figura 14

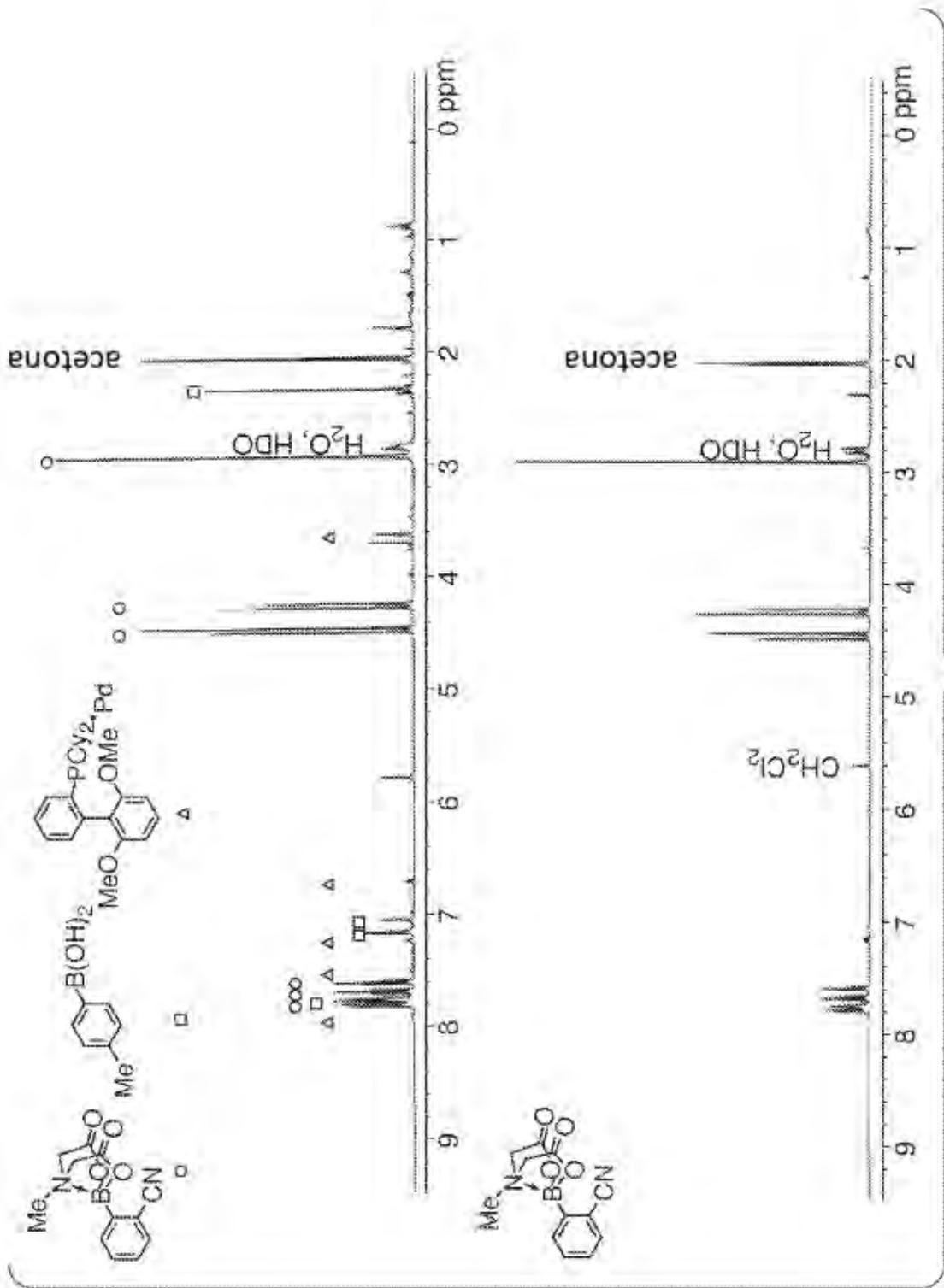


Figura 15

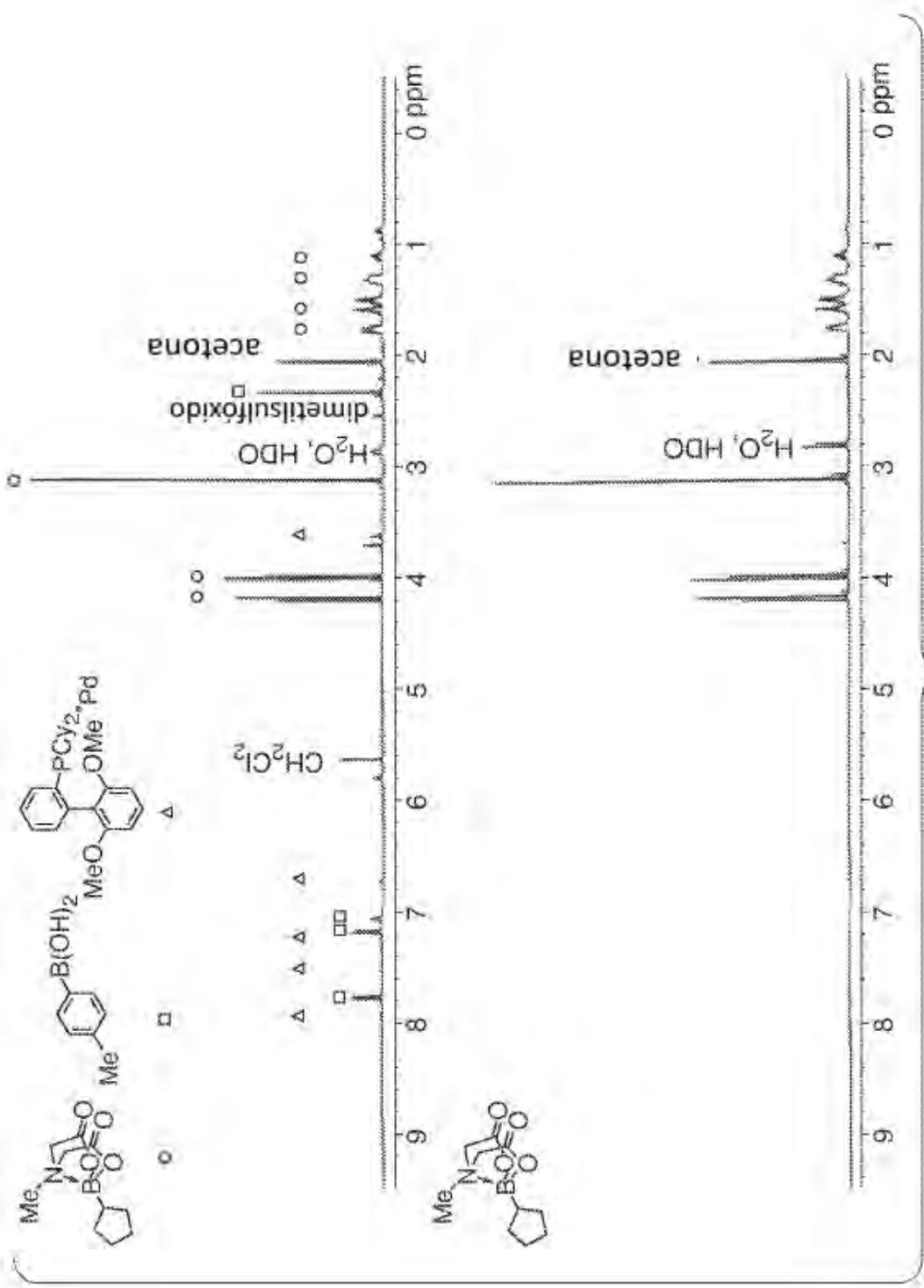


Figura 16

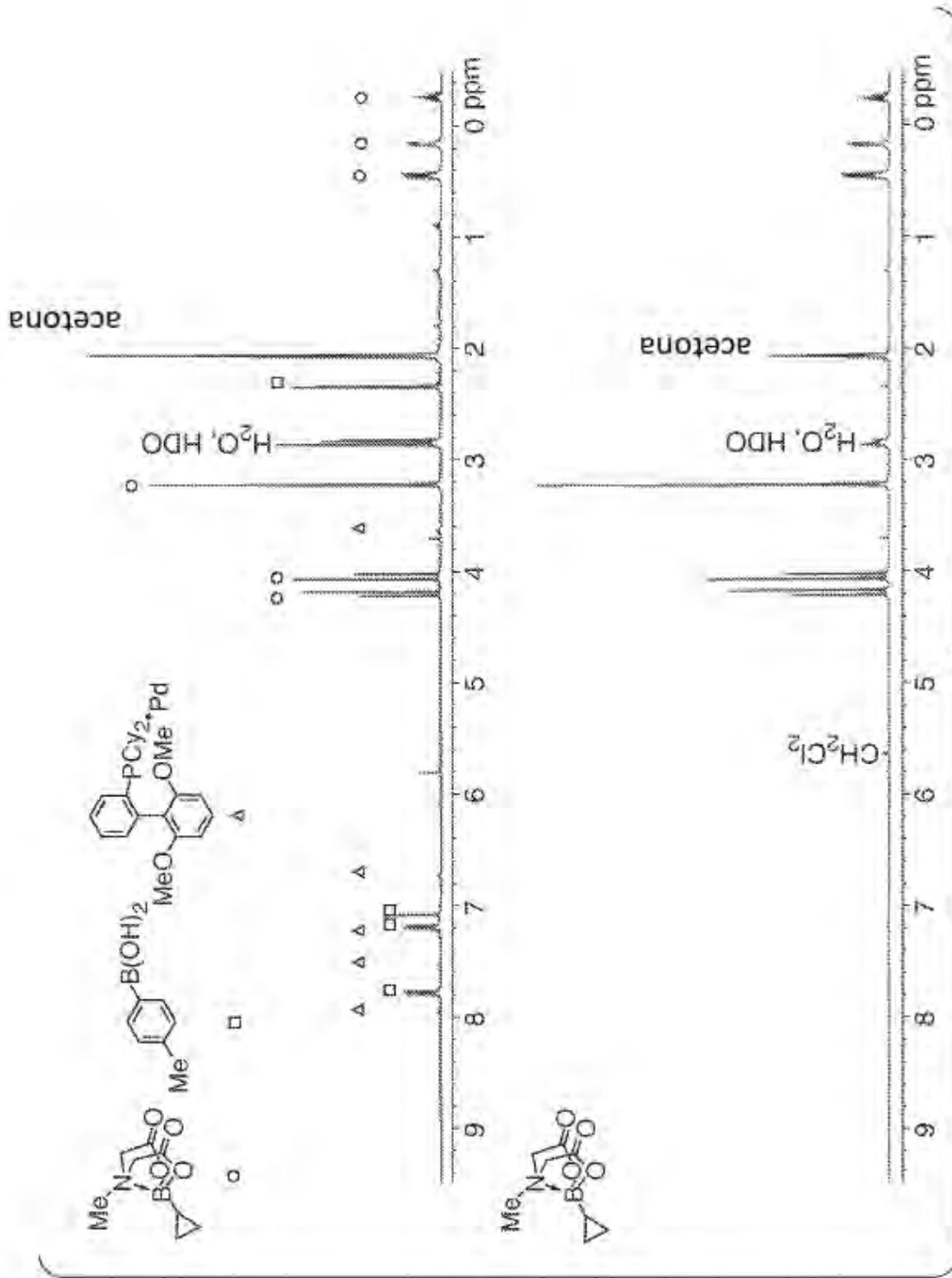


Figura 17

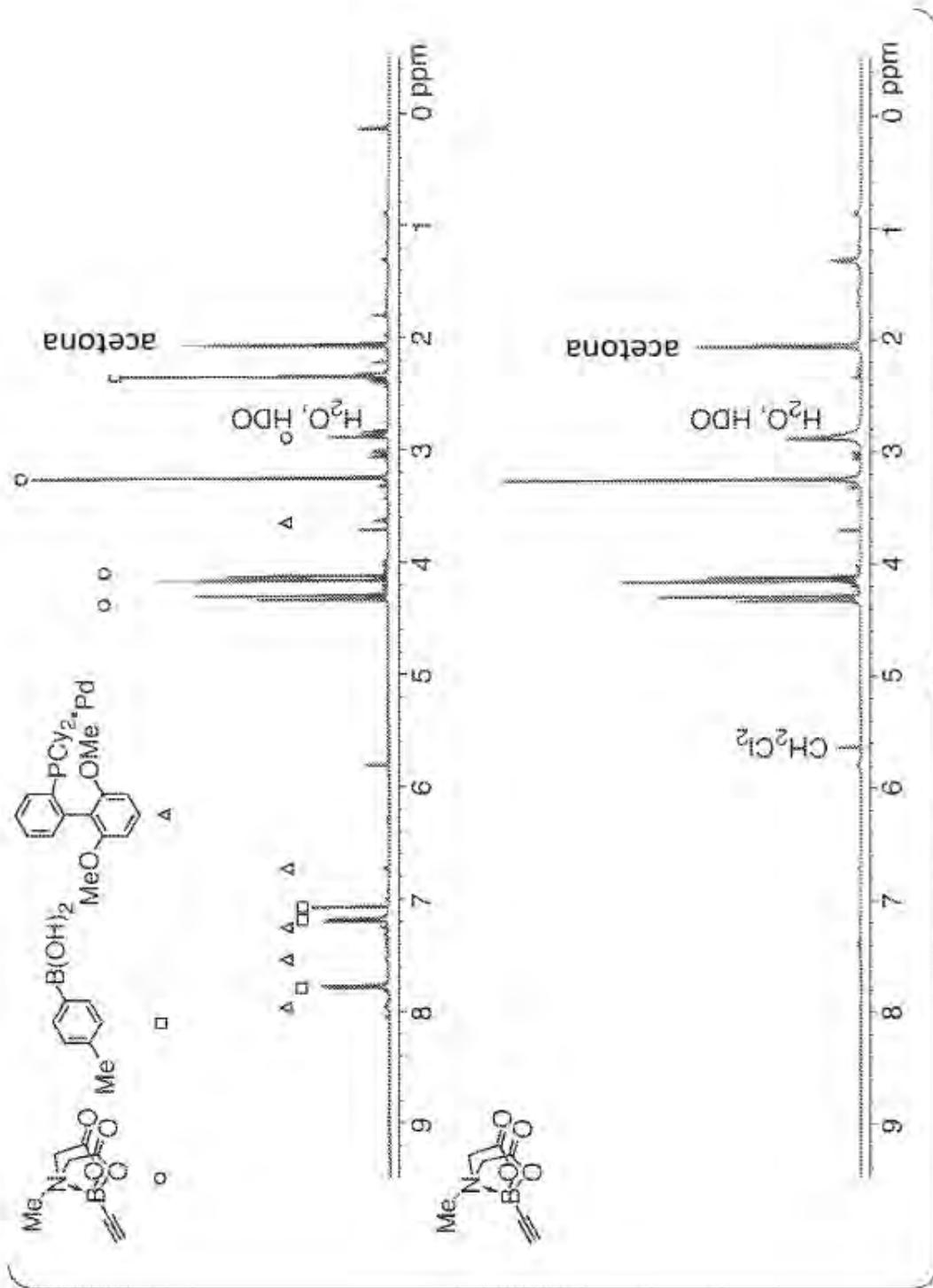


Figura 18

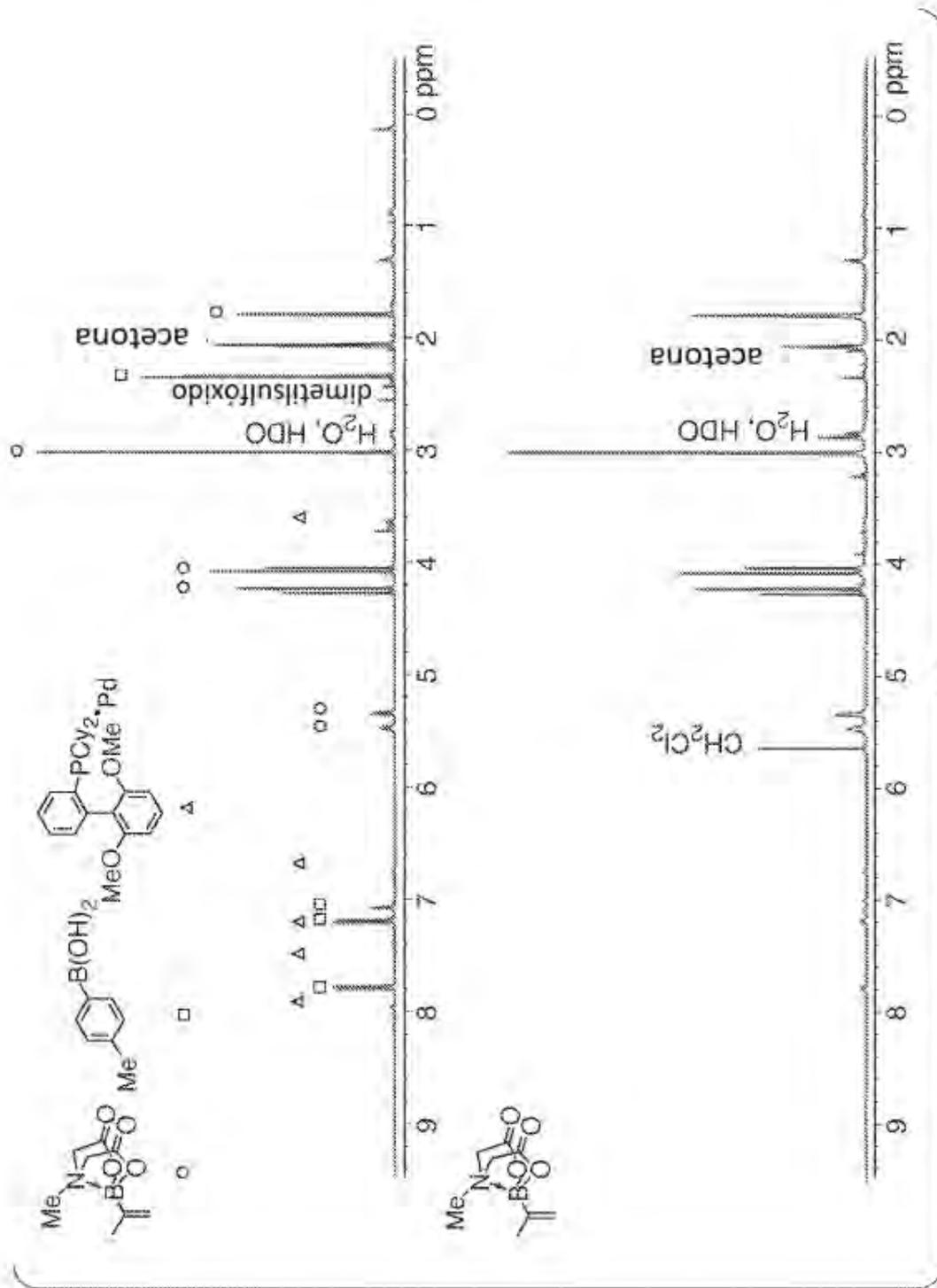


Figura 19

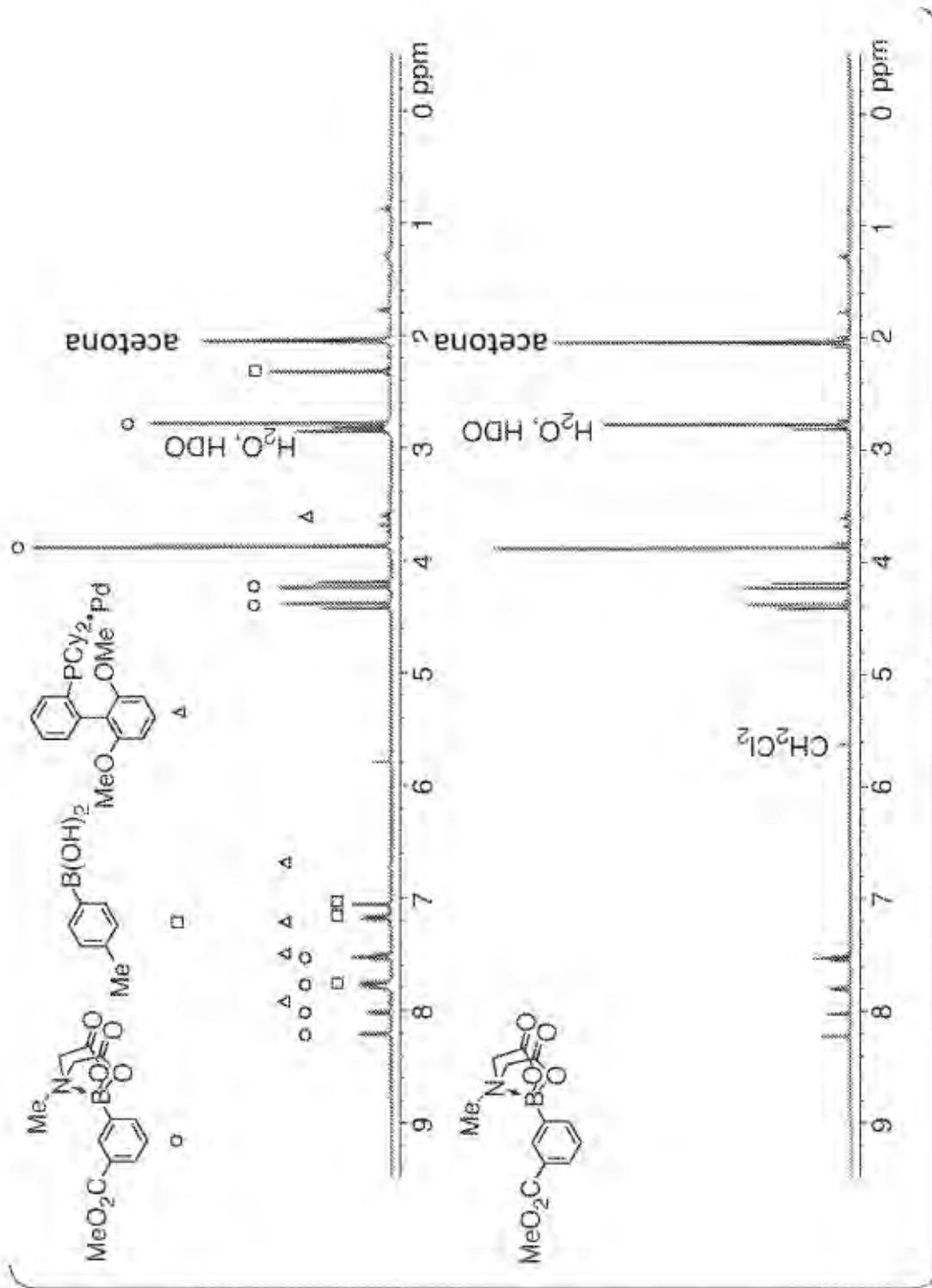


Figura 20

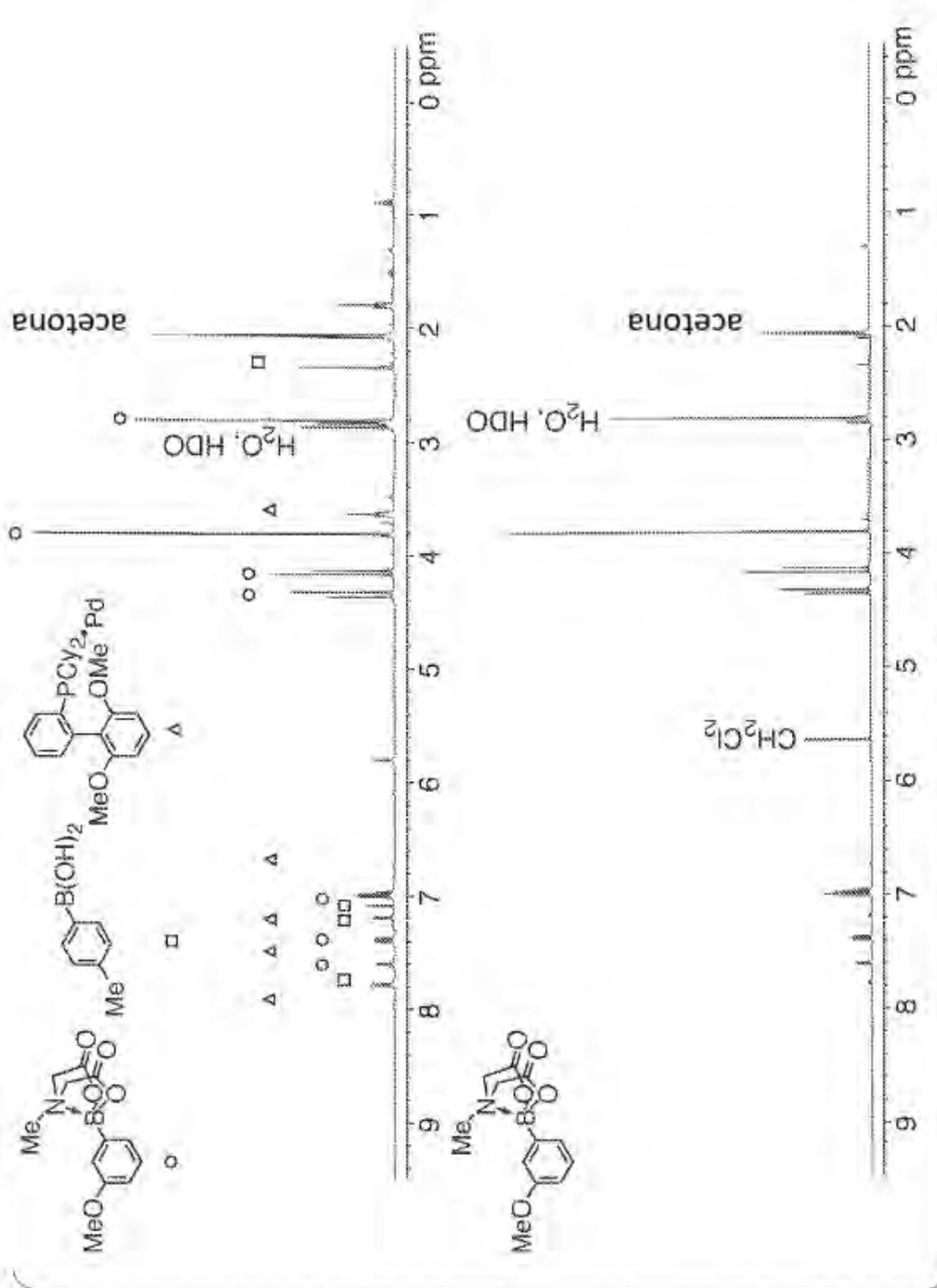


Figura 21

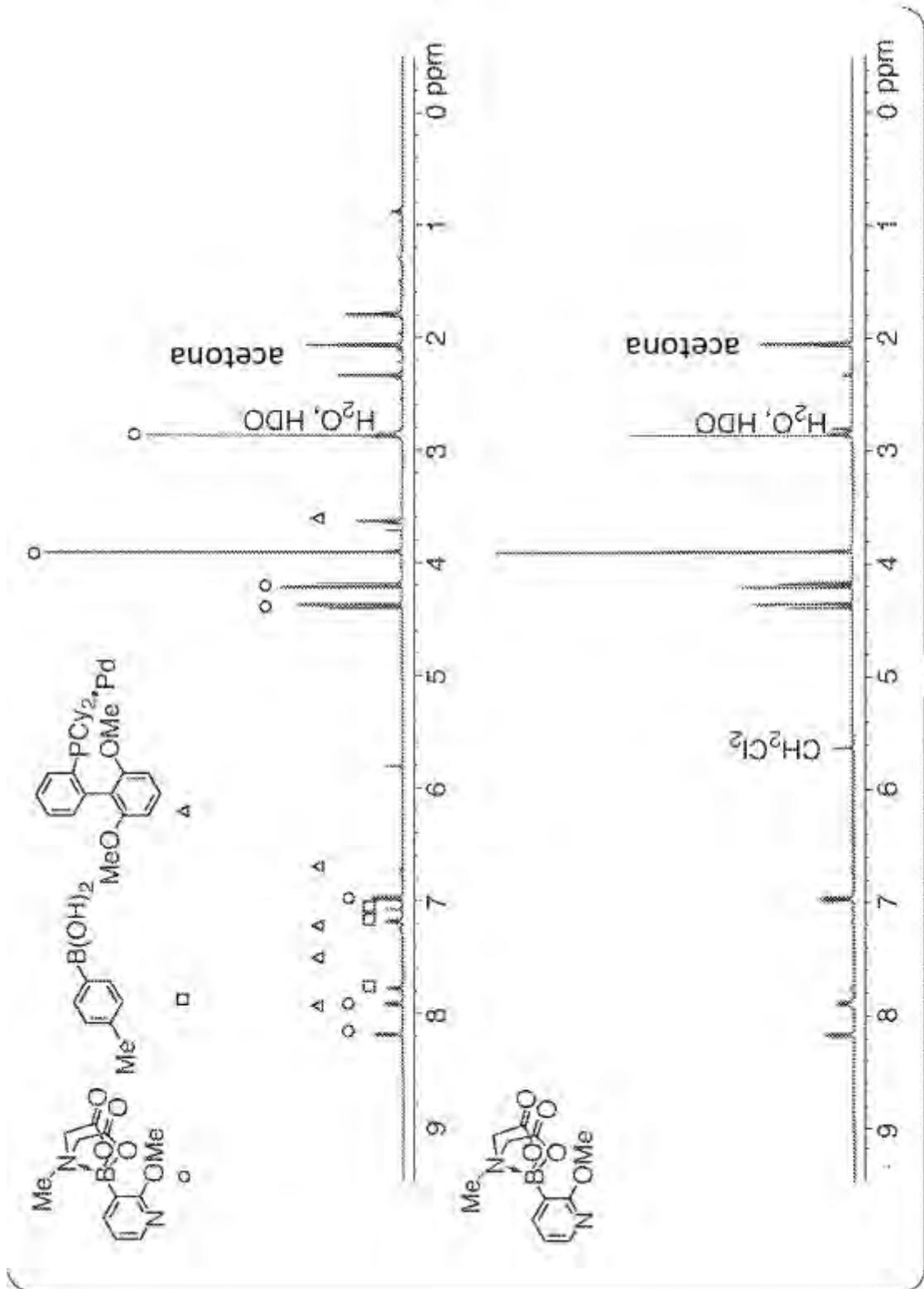


Figura 22

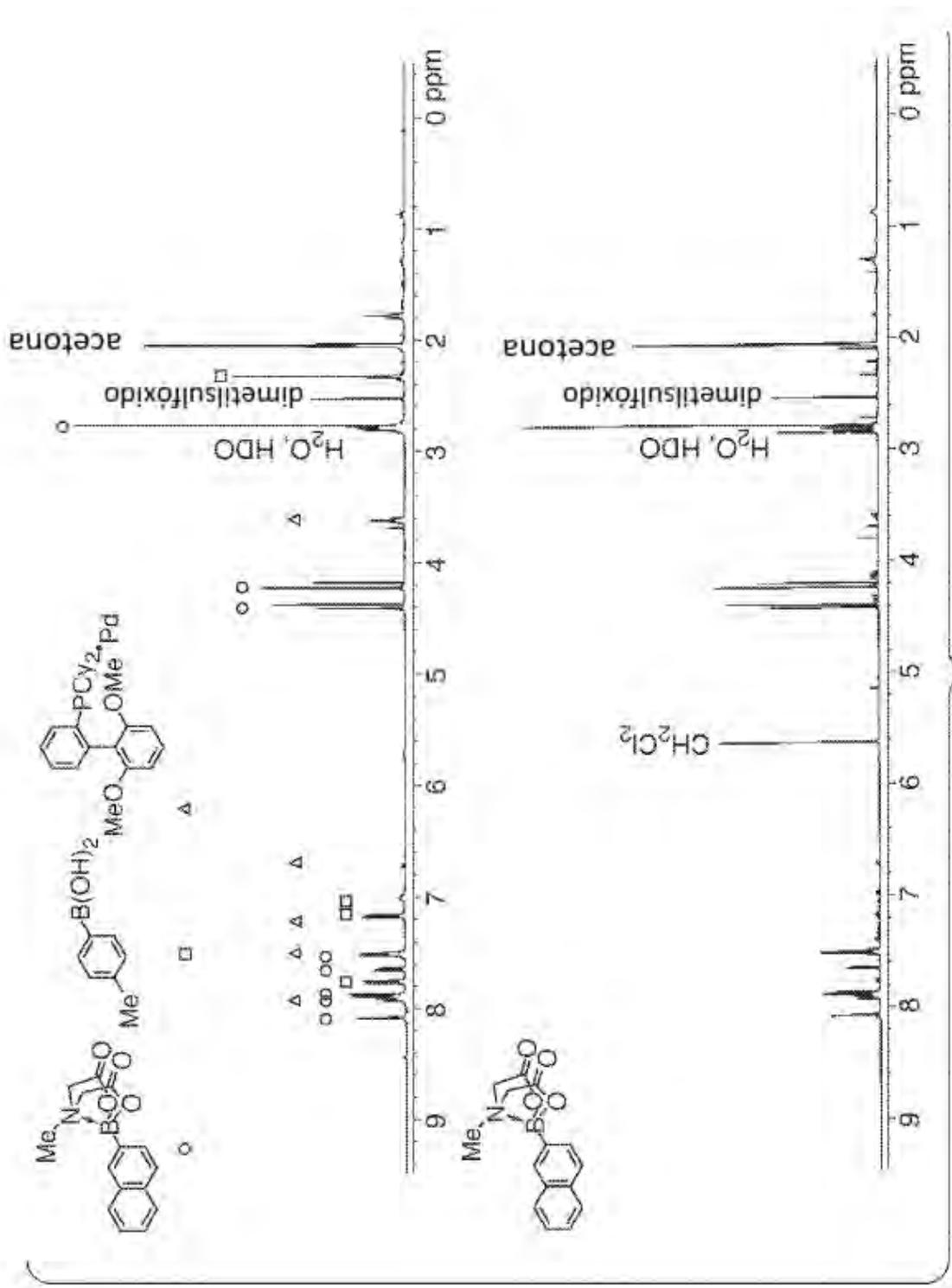


Figura 23

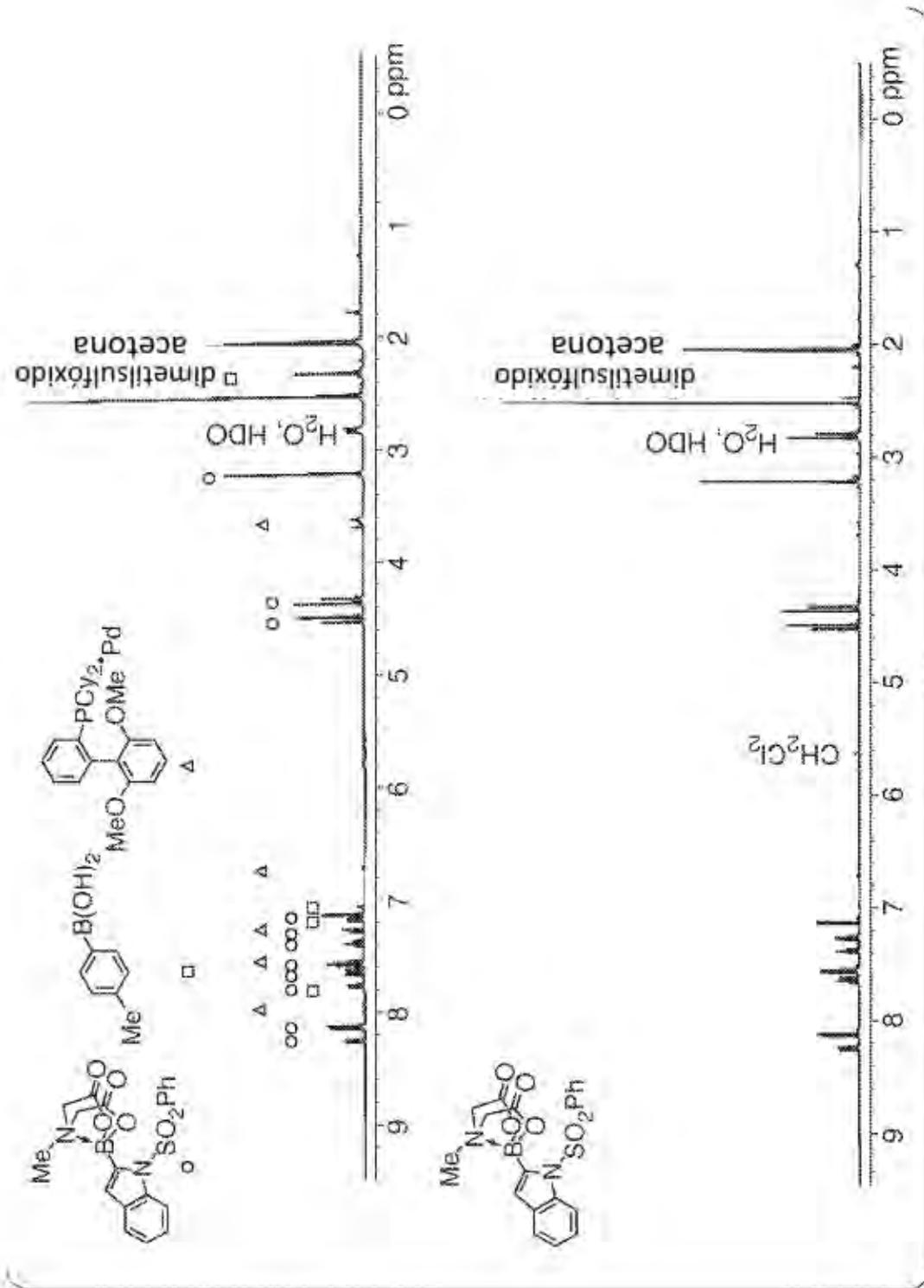


Figura 24

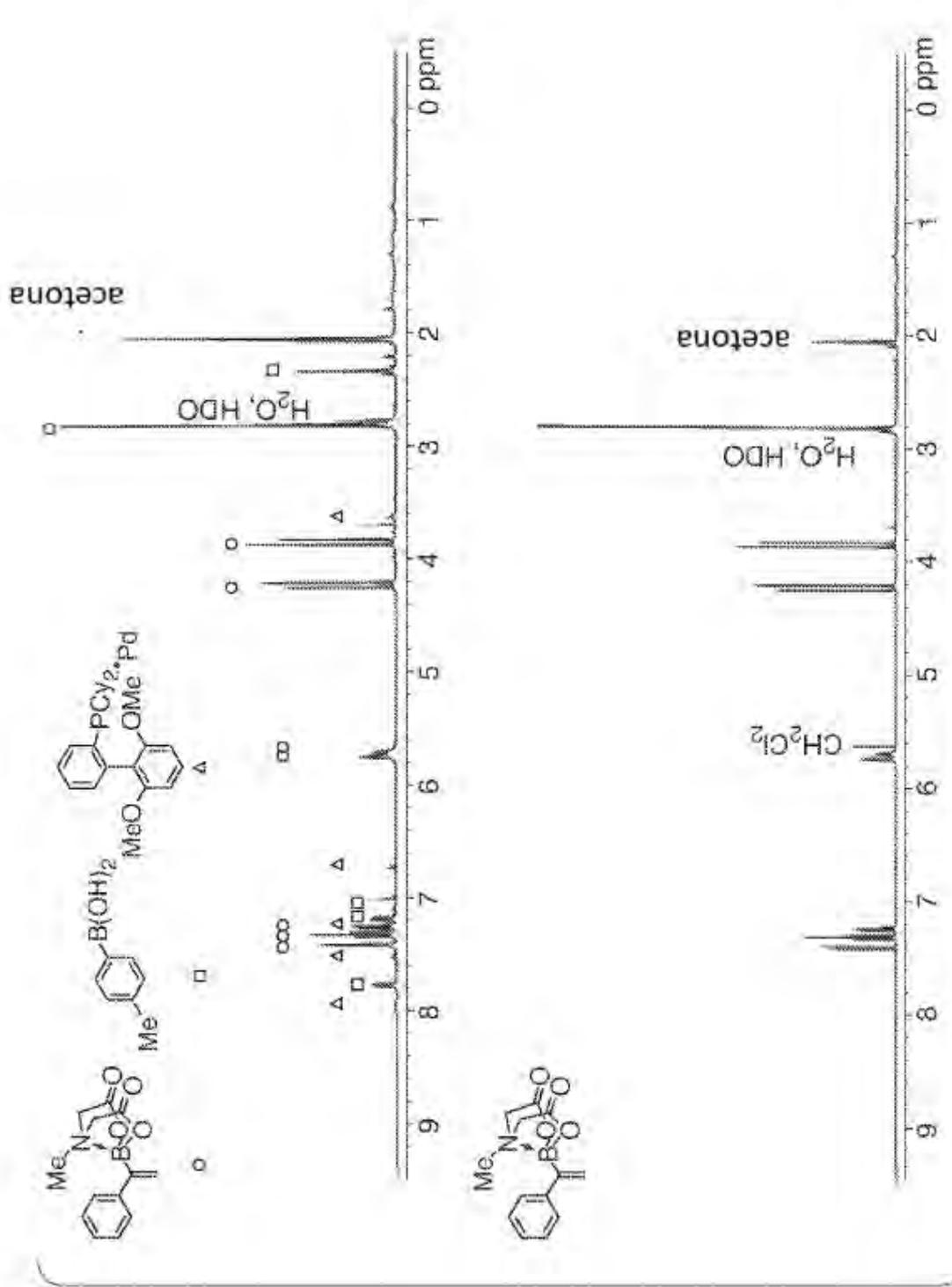


Figura 25

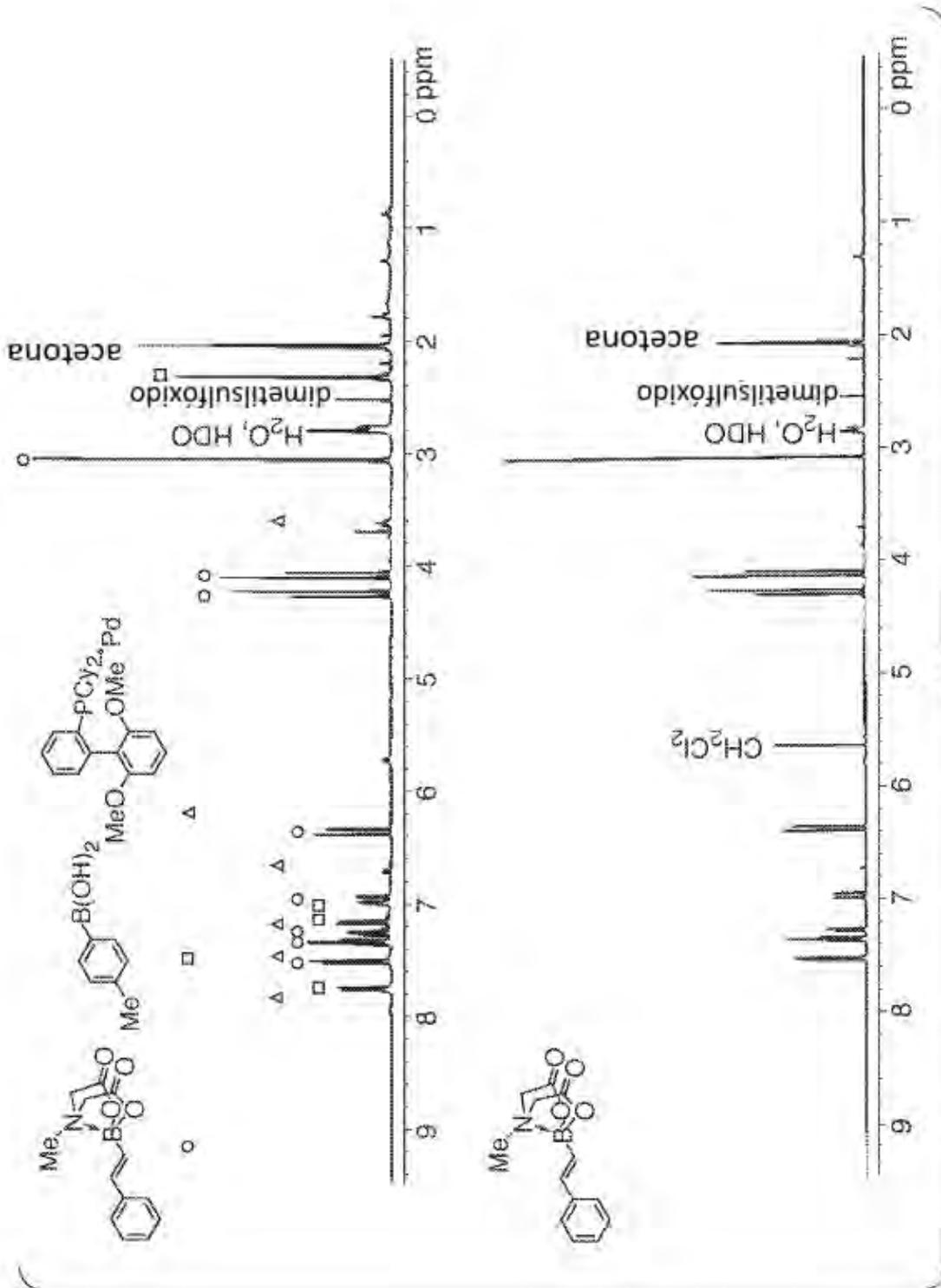


Figura 26

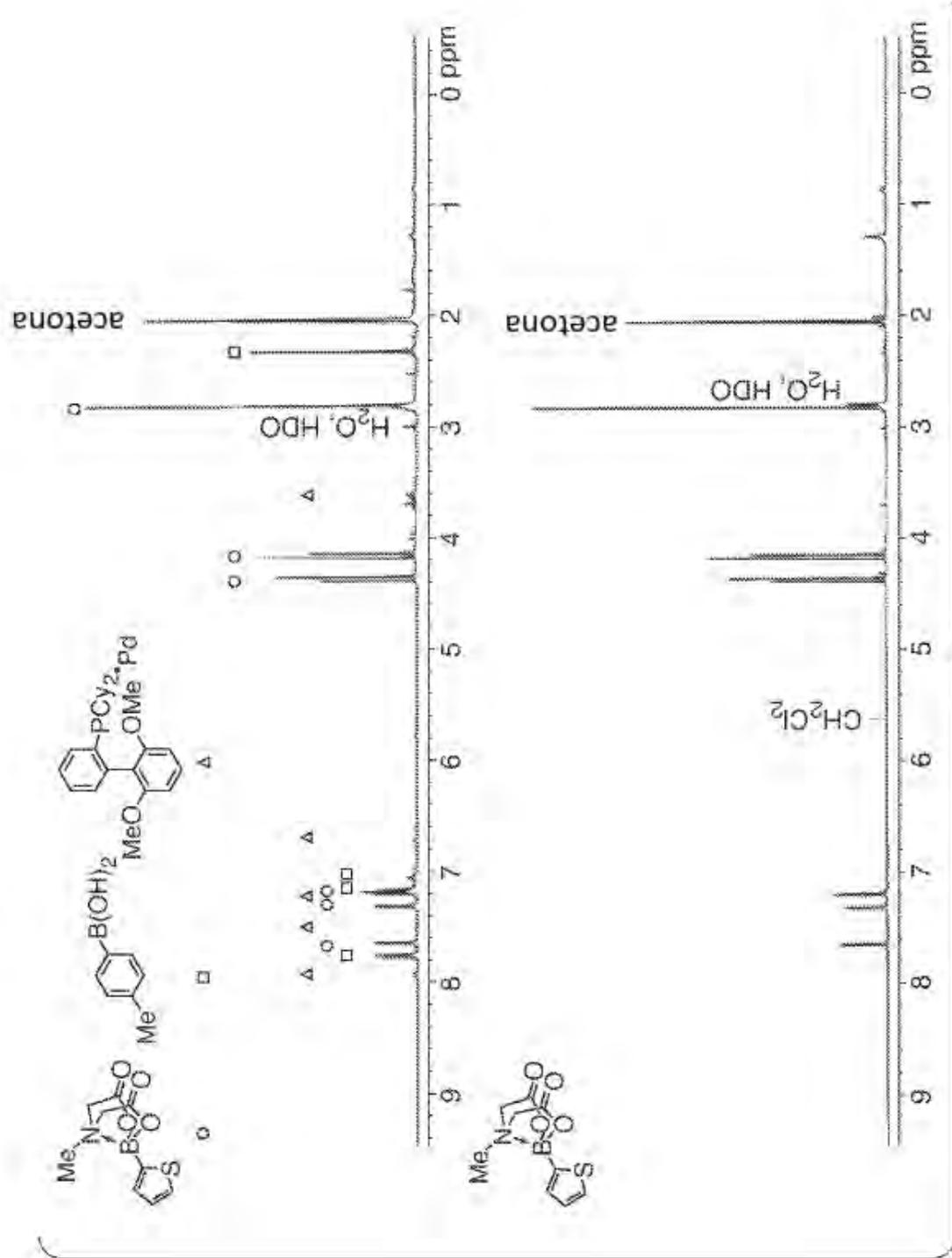


Figura 27

Figura 28 (continuación)

C

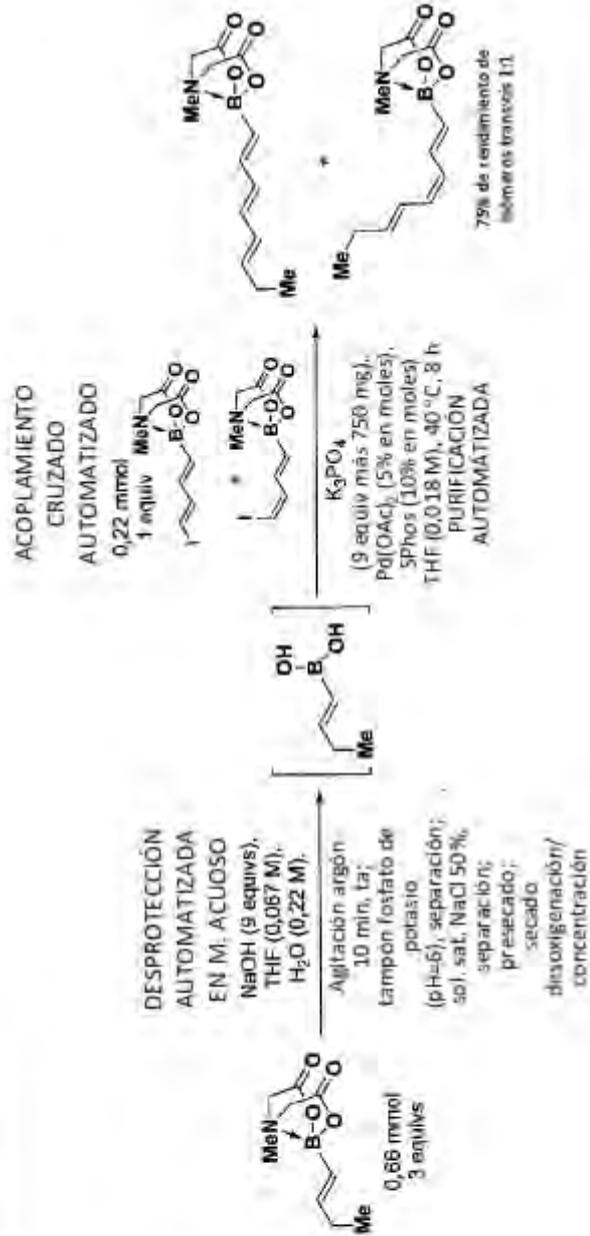


Figura 29

