

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 889**

51 Int. Cl.:

**C07K 17/06** (2006.01)

**B01J 19/00** (2006.01)

**C40B 50/18** (2006.01)

**B82Y 30/00** (2011.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2012 PCT/EP2012/054503**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2012 WO12126788**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2012 E 12713624 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2686351**

54 Título: **Procedimientos para la síntesis de una micromatriz de oligopéptidos**

30 Prioridad:

**18.03.2011 US 201161454156 P**

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

**24.10.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ALBERT, THOMAS;  
BUEHLER, JOCHEN;  
OTT, MARKUS;  
RICHMOND, TODD;  
RODESCH, MATTHEW y  
STENGELE, KLAUS-PETER**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 638 889 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos para la síntesis de una micromatriz de oligopéptidos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una micromatriz de oligopéptidos y procedimientos para la síntesis de la misma. La presente invención se refiere además a una micromatriz de oligopéptidos que comprende al menos aproximadamente 10 000 casillas de oligopéptidos por  $\text{cm}^2$  o al menos aproximadamente 50 000 casillas de oligopéptidos por  $\text{cm}^2$ .

**Antecedentes de la invención**

Las micromatrices de oligopéptidos son ampliamente usadas en investigación y en asistencia sanitaria. Dentro de estas áreas, las micromatrices de oligopéptidos son adecuadas para muchas aplicaciones diferentes. Las micromatrices de oligopéptidos por ejemplo, proporcionan una herramienta para la identificación de motivos biológicamente activos, por ejemplo, las micromatrices de oligopéptidos pueden imitar motivos activos potenciales de ligandos para cribar la unión a receptores correspondientes. Además, las micromatrices de oligopéptidos podrían reflejar secuencias específicas de antígenos asociados a una enfermedad. Dichas micromatrices de oligopéptidos se pueden utilizar para detectar anticuerpos en muestras de pacientes que sugieren la presencia de ciertas enfermedades inflamatorias e infecciones. Otra aplicación importante de las micromatrices de oligopéptidos es el descubrimiento de interacciones bioquímicas, incluyendo la unión de proteínas o ADN. Las micromatrices de oligopéptidos se pueden usar además para crear perfiles de actividad celular, actividad enzimática, adhesión celular y similares.

En el estado de la técnica se conocen diferentes procedimientos para la producción de micromatrices de oligopéptidos. Prevalece la detección de péptidos prefabricados o la síntesis *in situ* mediante detección de reactivos, por ejemplo, en las membranas. Uno de los procedimientos más comúnmente usados para generar matrices de péptidos de mayor densidad son las denominadas técnicas fotolitográficas, en las que el diseño sintético de los biopolímeros deseados se controla mediante grupos protectores fotolábiles (PLPG) adecuados liberando el sitio de enlace para el componente siguiente respectivo (aminoácido, oligonucleótido) tras la exposición a radiación electromagnética, preferentemente luz (Fodor *et al.*, (1993) *Nature* 364:555-556; Fodor *et al.*, (1991) *Science* 251:767-773).

En el estado de la técnica se conocen dos técnicas fotolitográficas diferentes: 1) Se usa una máscara fotolitográfica para dirigir luz a áreas específicas de la superficie de síntesis, provocando la desprotección localizada del PLPG. El inconveniente de esta técnica es que se requiere un gran número de pasos de enmascaramiento, dando como resultado un rendimiento global relativamente bajo y costes elevados, por ejemplo, la síntesis de un péptido de sólo seis aminoácidos de longitud puede requerir más de 100 máscaras. 2) La segunda técnica es la llamada fotolitografía sin máscara, en la que la luz se dirige a áreas específicas de la superficie de síntesis, provocando la desprotección localizada del PLPG por tecnologías de proyección digital, tales como dispositivos de microespejos (Singh-Gasson *et al.*, *Nature Biotechn.* 17 (1999) 974-978). Así, se elimina la costosa y lenta producción de máscaras de exposición.

El uso de PLPG, que constituye la base para la síntesis basada en fotolitografía de micromatrices de oligopéptidos, es bien conocido en la técnica. Los PLPG comúnmente usados para la síntesis de biopolímeros basada en fotolitografía son, por ejemplo,  $\alpha$ -metil-6-nitropiperonil-oxicarbonilo (MeNPOC) (Pease *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91:5022-5026), 2-(2-nitrofenil)-propoxicarbonilo (NPPOC) (Hasan *et al.* (1997) *Tetrahedron* 53: 4247-4264), nitroveratriloxicarbonilo (NVO) (Fodor *et al.* (1991) *Science* 251:767-773) y 2-nitrobenziloxicarbonilo (NBOC) (Patchornik *et al.* (1970) 21:6333-6335).

Los aminoácidos se han introducido en la síntesis fotolitográfica de péptidos en fase sólida de micromatrices de oligopéptidos, que se protegieron con NPPOC como grupo protector amino fotolábil, en el que se usaron portaobjetos de vidrio como soporte (publicación de patente de EE. UU. n.º. 2005/0101763 A1). El documento US 2010/0137600 A1 divulga NPPOC y derivados del mismo para su uso en síntesis paralela y ensayo de oligopéptidos sobre una superficie de sustrato de acuerdo con un patrón de distribución espacial predeterminado.

El procedimiento que usa aminoácidos protegidos con NPPOC tiene el inconveniente de que la semivida tras la irradiación con luz de todos los aminoácidos protegidos (excepto uno) está dentro del intervalo de aproximadamente 2 a 3 minutos en ciertas condiciones. En contraste, en las mismas condiciones, la tirosina protegida con NPPOC exhibe una semivida de casi 10 minutos. Dado que la velocidad de todo el proceso de síntesis depende del subproceso más lento, este fenómeno aumenta el tiempo del proceso de síntesis en un factor de 3 a 4. Concomitantemente, el grado de daño provocado por los iones radicales fotogenerados a los oligómeros en crecimiento aumenta al incrementar y superar el requerimiento de la dosis de luz.

El objetivo de la presente invención es, por lo tanto, la provisión de una micromatriz de oligopéptidos de alta

densidad con alta sensibilidad y un procedimiento para su síntesis que no muestre los inconvenientes descritos anteriormente. Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es la provisión de una micromatriz de oligopéptidos sensible de alta calidad, que se pueda sintetizar dentro de un periodo de tiempo significativamente más corto en comparación con el estado de la técnica, reduciendo consecuentemente los costes de producción de micromatrices de oligopéptidos.

### Resumen de la invención

La presente invención se refiere a una micromatriz y a un procedimiento para la síntesis de la misma.

Un aspecto de la presente invención es un procedimiento para sintetizar una micromatriz de oligopéptidos, en el que el procedimiento comprende las etapas de:

- a) acoplamiento a un grupo amino reactivo unido directamente o indirectamente a una superficie de un soporte sólido con un aminoácido que comprende un grupo amino protegido por un resto fotolábil seleccionado de entre 2-(2-nitrofenil)-propoxycarbonilo (NPPOC) y 2-(2-nitro-4-benzoilfenil)-2'-propil-1'-oxycarbonilo (benzoil-NPPOC) con la condición de que el grupo amino de tirosina esté protegido por benzoil-NPPOC;
- b) opcionalmente, la adición de caperuza a aminoácidos sin reaccionar;
- c) opcionalmente, el lavado del soporte sólido de plástico;
- d) fotoirradiación del grupo amino protegido de modo que el grupo amino fotoirradiado sea reactivo; y
- e) repetición de las etapas b) a d) durante un número predeterminado de veces, a través de lo cual se sintetiza un oligopéptido.

En un modo de realización, la fotoirradiación se realiza a 350 a 410 nm. En otro modo de realización, la fotoirradiación se resuelve espacialmente. La superficie del soporte sólido de plástico puede comprender ácido  $\epsilon$ -amino-hexanoico que lleva los grupos amino reactivos. En algunos casos, el soporte sólido de plástico comprende una superficie y un cuerpo, donde el cuerpo comprende poliolefina. En algunos casos, la superficie del soporte sólido de plástico tiene al menos un 50 % de transmisión de luz a 350 a 410 nm. En algunos casos, la fotoirradiación se realiza a 350 a 375 nm. En algunos casos, la fotoirradiación se realiza a 360 a 370 nm, a 363 a 367 nm, o a 365 nm. La síntesis se realiza usando fotolitografía sin máscara usando, por ejemplo, un dispositivo digital de microespejos.

En otro modo de realización más, los residuos de aminoácidos están protegidos con diferentes NPPOC y/o derivados de NPPOC. En algunos casos, los derivados del NPPOC son benzoil-NPPOC. En algunos casos, el benzoil-NPPOC es benzoil-NPPOC-tirosina. En algunos casos, sustancialmente todos los oligopéptidos tienen una longitud de 6 a 24 aminoácidos y, en otros casos, sustancialmente todos los oligopéptidos tienen una longitud de 9 a 18 aminoácidos.

En otro modo de realización, la fotoirradiación se lleva a cabo en presencia de un disolvente orgánico polar seleccionado de un grupo que consiste en dimetilsulfóxido, N-metil-2-pirrolidona, dimetilformamida, acetonitrilo, metanol, etanol y propanol. La fotoirradiación se realiza en presencia de una base seleccionada entre hidrazina, hidroxilamina e imidazol. En algunos casos, la fotoirradiación se realiza en presencia de una base reductora débil o nucleofílica débil.

En otro modo de realización, el acoplamiento se produce en menos de 15 minutos, menos de 10 minutos y menos de 5 minutos. El posicionamiento de los haces de fotoirradiación sobre el soporte sólido se controla y se ajusta a lo largo del tiempo, preferentemente antes de al menos cada 4ª etapa de fotoirradiación (por ejemplo, antes de al menos cada 3ª etapa de fotoirradiación, antes de al menos cada 2ª etapa de fotoirradiación, antes de al menos cada etapa de fotoirradiación). Los procedimientos para sintetizar una micromatriz de oligopéptidos pueden comprender además el ajuste de la posición del soporte sólido. El ajuste puede comprender ajustar la posición del dispositivo de microespejos o ajustar las posiciones tanto del dispositivo de microespejos como del soporte sólido.

En otro modo de realización, la micromatriz sobre el soporte sólido comprende al menos aproximadamente 10.000 casillas de oligopéptidos por  $\text{cm}^2$  y, en algunos casos, al menos aproximadamente 50.000 casillas de oligopéptidos por  $\text{cm}^2$ .

En otro aspecto, la presente invención proporciona una micromatriz de oligopéptidos sintetizada de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento. En un modo de realización, una micromatriz proporcionada en el presente documento comprende al menos aproximadamente 10 000 casillas de oligopéptidos por  $\text{cm}^2$  y, en algunos casos, al menos aproximadamente 50 000 casillas de oligopéptidos por  $\text{cm}^2$ . En otro modo de realización, una micromatriz proporcionada en el presente documento comprende residuos de aminoácidos C-terminales de los oligopéptidos unidos a una superficie del soporte sólido a través de enlaces peptídicos. En algunos casos, los residuos de aminoácidos C-terminales de los oligopéptidos se acoplan a la superficie del soporte sólido mediante ácido  $\epsilon$ -amino-hexanoico.

### Breve descripción de los dibujos

**La figura 1** ilustra la síntesis de los siguientes aminoácidos protegidos con NPPOC:

- a) NPPOC-L-fenilalanina
- b) NPPOC-L-leucina
- c) NPPOC-L-valina

5

**La figura 2** ilustra la síntesis de los siguientes aminoácidos protegidos con NPPOC:

- a) NPPOC-L-Glicina
- b) Ácido NPPOC-L-glutámico
- c) NPPOC-(1-tritil)-L-histidina

10

**La figura 3** ilustra la síntesis de los siguientes aminoácidos protegidos con benzoil-NPPOC:

- a) Benzoil-NPPOC-L-fenilalanina
- b) Benzoil-NPPOC-L-metionina
- c) Benzoil-NPPOC-(t-Bu)-L-tirosina

15

**La figura 4** presenta periodos de tiempo de semivida tras la exposición a la luz para diferentes aminoácidos protegidos con NPPOC a una longitud de onda de 365 nm. La exposición a la luz se llevó a cabo durante periodos de tiempo en los que la potencia de la lámpara usada permitió semividas de desprotección dentro de estos periodos de tiempo.

20

**La figura 5** presenta periodos de tiempo de semivida tras la exposición a la luz para diferentes aminoácidos protegidos con benzoil-NPPOC a una longitud de onda de 365 nm. La exposición a la luz se llevó a cabo durante periodos de tiempo en los que la potencia de la lámpara usada permitió semividas de desprotección dentro de estos periodos de tiempo.

25

**La figura 6** presenta información de secuencia: epítomos de 52 anticuerpos seleccionados de la base de datos del Atlas de proteínas humanas en una matriz de péptidos.

**La figura 7** presenta la titulación de sensibilidad de anti-PAPOLA sobre una matriz de péptidos.

30

### Descripción detallada de la invención

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

35

El término "soporte sólido o semisólido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier material sólido que tiene un área superficial a la que se pueden unir moléculas orgánicas a través de la formación de enlaces o en la que se pueden absorber moléculas orgánicas mediante interacciones electrónicas o estáticas tales como enlace covalente o formación de complejos a través de un grupo funcional específico. El soporte puede ser una combinación de materiales tales como plástico sobre vidrio, carbono sobre vidrio y similares. La superficie funcional puede ser moléculas orgánicas simples, pero también puede comprender copolímeros, dendrímeros, cepillos moleculares y similares.

40

El término "plástico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a materiales sintéticos, tales como homo- o hetero-copolímeros de bloques de construcción orgánicos (monómeros) con una superficie funcionalizada, de modo que las moléculas orgánicas se pueden unir mediante formación de enlaces covalentes o mediante absorción por interacciones electrónicas o estáticas, tales como la formación de enlaces a través de un grupo funcional. Preferentemente, el término "plástico" se refiere a poliolefina, que es un polímero derivado de la polimerización de una olefina (por ejemplo, polímero de monómeros de etileno propileno dieno, poliisobutileno). Más preferentemente, el plástico es una poliolefina con propiedades ópticas definidas, como TOPAS® o ZEONOR/EX®.

50

El término "transmisión de luz", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la propiedad de la materia por la que la materia es transparente hasta cierto punto de modo que la luz puede pasar a través de la materia. La cantidad de luz que pasa es dependiente del grado de transparencia o transmitancia.

55

El término "fotoirradiación resuelta espacialmente", tal como se usa en el presente documento, se refiere al hecho de que la luz es dirigida de manera precisa sobre áreas definidas de una superficie (casillas), preferentemente la superficie de una micromatriz, mediante un dispositivo, tal como una matriz de microespejos de aluminio direccionables individualmente. El dispositivo controla el patrón global de luz proyectada sobre la superficie, preparando de este modo las áreas para la siguiente reacción de acoplamiento. Preferentemente, la exposición a la luz conduce a la escisión de grupos protectores fotolábiles y al desenmascaramiento de grupos funcionales dentro de las áreas donde se va a acoplar el componente siguiente, por ejemplo, un aminoácido o un nucleótido. Este sistema para la exposición controlada de la luz se puede combinar con un sintetizador para producir micromatrices. Este procedimiento de dirigir la luz a microespejos de aluminio direccionables individualmente permite la síntesis de 385 000 a 4,2 millones de casillas de sonda únicas en una única micromatriz de tamaño portaobjetos de microscopio de 75 x 25 mm.

65

El término "fotolitografía sin máscara", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una técnica para la síntesis de micromatrices de ADN u oligopéptidos sin el uso de foto-máscaras. En la fotolitografía sin máscara se usa un dispositivo para dirigir la luz sobre un área definida de una superficie, preferentemente la superficie de una micromatriz, con el fin de inducir fotorreacciones, preferentemente la liberación de grupos protectores fotolábiles. Ejemplos de dicho dispositivo pueden ser un dispositivo de microespejos, una pantalla LCD transmisora de luz o un divisor de haz. En algunos casos, el dispositivo es una matriz de elementos de espejo de aluminio direccionables individualmente que se pueden accionar bajo control de programas informáticos. Dichos elementos de espejo dirigen individualmente la luz sobre un área definida de una superficie, tal como la superficie de una micromatriz. Un ejemplo de dispositivo de microespejos es el Digital Light Processor (DLP) de Texas Instruments, Inc.

Los términos "micromatriz" o "micromatriz de oligopéptidos", tal como se usan en el presente documento, se refieren a una disposición bidimensional de casillas sobre la superficie de un soporte sólido o semisólido. Una sola micromatriz o, en algunos casos, múltiples micromatrices (por ejemplo, 3, 4, 5 o más micromatrices) se puede localizar en un soporte sólido. El tamaño de las micromatrices depende del número de micromatrices en un soporte sólido. Cuanto mayor sea el número de micromatrices por soporte sólido, más pequeñas tienen que ser las matrices para encajar en el soporte sólido. Las matrices se pueden diseñar en cualquier forma, pero preferentemente se diseñan como cuadrados o rectángulos. El producto listo para usar es la micromatriz de oligopéptidos sobre el soporte sólido o semisólido (portabjetos de micromatrices).

El término "casilla", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un área definida en la superficie de una micromatriz. La casilla comprende biomoléculas, tales como péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y similares. Una casilla puede contener biomoléculas con diferentes propiedades, como diferentes secuencias u orientaciones, en comparación con otras casillas. El tamaño de una casilla viene determinado por dos factores: i) el número de casillas de una matriz, cuanto mayor sea el número de casillas de una matriz, menor será cada casilla individual, ii) el número de elementos de espejo de aluminio direccionables individualmente que se usan para la irradiación de una casilla. Cuanto mayor sea el número de elementos de espejo usados para la irradiación de una casilla, mayor será cada casilla. El número de casillas de una matriz está limitado por el número de elementos de espejo (píxeles) presentes en el dispositivo de microespejos. El dispositivo de microespejos de Texas Instruments, Inc. contiene actualmente 4,2 millones de elementos de espejo (píxeles). Por lo tanto, el número de casillas de una única micromatriz está limitado actualmente por este número.

El término "densidad", tal como se usa en el presente documento, se refiere al número de casillas con respecto a toda la superficie del soporte sólido o semisólido. A modo de ejemplo, el área completa de un soporte sólido o semisólido con un tamaño de 75 x 25 mm es 18,75 cm<sup>2</sup>. La micromatriz de acuerdo con la invención puede tener una densidad de al menos aproximadamente 10.000 casillas de oligopéptidos y preferentemente de al menos aproximadamente 50.000 casillas de oligopéptidos por cm<sup>2</sup> con respecto a toda el área de 18,75 cm<sup>2</sup> del soporte sólido o semisólido. En este sentido, la densidad correspondiente al área de una micromatriz en sí es mayor. A modo de ejemplo, la densidad de al menos aproximadamente 10 000 casillas de oligopéptidos y preferentemente de al menos 50 000 casillas de oligopéptidos con respecto a toda el área de 18,75 cm<sup>2</sup> de la micromatriz transportada a un tamaño de ejemplo de 19 x 14 mm (2,66 cm<sup>2</sup>) de la propia micromatriz da como resultado una densidad de al menos aproximadamente 70 000 casillas de oligopéptidos y preferentemente de al menos aproximadamente 350 000 casillas de oligopéptidos por cm<sup>2</sup>. Teóricamente, la densidad está limitada por dos factores: (1) el número de elementos de espejo (píxeles) y (2) la longitud de onda de luz usada para la desprotección.

El término "grupo protector", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un sustituyente, grupo funcional, ligando o similar, que está unido de forma escindible (por ejemplo, a través de enlace covalente, enlace iónico o complejo) a un grupo funcional potencialmente reactivo e impide que el grupo funcional potencialmente reactivo reaccione de una manera no controlada. Preferentemente, el grupo protector está enlazado de forma escindible a través de un enlace covalente. El grupo protector se puede escindir del grupo funcional reactivo respectivo de cualquier modo, tal como por la acción de ácidos, bases, fluoruro, enzimas, reducción u oxidación. Preferentemente, el grupo protector se escinde por exposición a la luz. Los grupos protectores de acuerdo con la invención son grupos protectores fotolábiles, que incluyen, pero no se limitan a, o-nitrobenciloxicarbonilo (NBOC), o-nitrofenil-etoxicarbonilo (NPEOC), 2-(3,4-metilendioxi-2-nitrofenil)-propiloxicarbonilo (MeNPPOC), 2-(3,4-metilendioxi-2-nitrofenil)-oxicarbonilo (MeNPOC), 2-(2-nitrofenil)-propoxicarbonilo (NPPOC), 2-(2-nitro-4-benzoilfenil)-2'-propil-1'-oxicarbonilo (benzoil-NPPOC), dimetoxi-benzo-inilil-oxicarbonilo (DMBOC), 2-(2-nitrofenil)-etilsulfonilo (NPES), (2-nitrofenil)-propilsulfonilo (NPPS) y similares.

El término "grupo funcional", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de numerosas combinaciones de átomos que forman partes de las moléculas químicas, que experimentan reacciones características propias y que influyen en la reactividad del resto de la molécula. Los grupos funcionales típicos incluyen, pero no se limitan a, hidroxilo, carboxilo, aldehído, carbonilo, amino, azida, alquinilo, tiol y nitrilo. Los grupos funcionales potencialmente reactivos incluyen, por ejemplo, aminas, ácidos carboxílicos, alcoholes, dobles enlaces y similares. Los grupos funcionales preferentes son grupos funcionales potencialmente reactivos de aminoácidos tales como grupos amino o grupos carboxilo.

El término "molécula antioxidante", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un agente reactivo con radicales libres. En algunos casos, una molécula antioxidante reacciona con olefinas por medio de una reacción de adición. Una molécula antioxidante puede estar contenida en disolventes orgánicos polares para reaccionar con productos secundarios de la etapa de desprotección. Las moléculas antioxidantes incluyen, pero no se limitan a,

5 aminas nucleofílicas fuertes como piperidina, piperazina, imidazol y similares, así como inactivadores de radicales, tales como hidroxilamina, TEMPO, Oxo-TEMPO, fenoles estéricamente impedidos y tiofenoles.

El término "aminoácido natural", tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno de los 20 aminoácidos usados para la biosíntesis de proteínas, así como a otros aminoácidos que se pueden incorporar a proteínas durante la traducción (incluyendo pirrolisina y selenocisteína). Los 20 aminoácidos naturales incluyen histidina, alanina,

10 valina, glicina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, glutamina, asparagina, treonina, arginina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, cisteína, metionina y lisina.

El término "aminoácido no natural", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto orgánico que no está entre los codificados por el código genético estándar, o que no se incorpora a proteínas durante la traducción. Por lo tanto, los aminoácidos no naturales incluyen aminoácidos o análogos de aminoácidos, pero no están limitados a, los isoestereómeros D de aminoácidos, los análogos beta-amino de aminoácidos, citrulina, homocitrulina, homoarginina, hidroxiprolina, homoprolina, ornitina, 4-amino-fenilalanina, ciclohexilalanina, ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico, N-metil-alanina, N-metil-glicina, norleucina, ácido N-metil-glutámico, terc-butilglicina, ácido  $\alpha$ -aminobutírico, terc-butilalanina, ácido 2-aminoisobutírico, ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico ácido 2-aminoindano-2-carboxílico, selenometionina, deshidroalanina, lantionina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico y derivados de los mismos en los que el nitrógeno amínico ha sido mono- o di-alquilado.

15 Los términos "péptido" u "oligopéptido", tal como se usan en el presente documento, se refieren a compuestos orgánicos compuestos de aminoácidos, que están dispuestos en una cadena lineal y unidos entre sí por enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de residuos aminoácidos adyacentes. Los términos "péptido" u "oligopéptido" también se refieren a compuestos orgánicos compuestos de menos de 70 residuos de aminoácidos, menos de 35 residuos de aminoácidos y menos de 25 residuos de aminoácidos.

El término "grupo amino", tal como se usa en el presente documento, se refiere a grupos amino primarios ( $-\text{NH}_2$ ) o secundarios ( $-\text{NHR}_1$ ). Ejemplos de grupos amino incluyen, pero no se limitan a,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHCH}_3$ ,  $-\text{NHC}(\text{CH}_3)_2$ . Ejemplos de grupos amino cíclicos incluyen, pero no se limitan a, aziridino, azetidino, pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino y tiomorfolino.

25 El término "grupo amino reactivo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una amina que puede reaccionar con un grupo funcional para formar un enlace covalente entre el nitrógeno del grupo amino y el electrófilo del grupo funcional, tal como un enlace peptídico.

El término "disolvente orgánico polar", tal como se usa en el presente documento, se refiere a disolventes que son solubles en agua en el sentido de que es posible obtener una mezcla homogénea del disolvente en agua a temperatura ambiente en condiciones ambientales. Los disolventes orgánicos polares preferentes son metanol, etanol, propanol, metiletilcetona, acetonitrilo, acetona, tetrahidrofurano (THF), dioxano, dimetilsulfóxido (DMSO), n-metil-2-pirrolidona (NMP), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA).

30 El término "base", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia capaz de aceptar un protón en disolventes polares o no polares. La base de elección para una reacción particular depende de los materiales de partida, del disolvente y de la temperatura usada para una reacción específica. Ejemplos de bases incluyen sales de carbonato, fosfatos, haluros, hidróxidos, hidruros, aminas heterocíclicas, disililamidas, trialkilaminas, aminas bicíclicas, hidruros de metales alcalinos, bases que contienen nitrógeno.

El término "ciclo de síntesis", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un número predeterminado de etapas de reacción sucesivas que se realizan para llevar a cabo una síntesis de oligopéptidos. Más particularmente, el término "ciclo de síntesis" se refiere a un número predeterminado de etapas de reacción sucesivas que se realizan usando síntesis en fase sólida de oligopéptidos con el fin de unir el respectivo aminoácido siguiente al grupo funcional anterior. Una síntesis de oligopéptidos comprende un número predeterminado de ciclos de síntesis, en el que en cada ciclo se une un aminoácido específico al grupo funcional anterior. Por lo tanto, el número de ciclos depende del número de aminoácidos del oligopéptido. Por ejemplo, para la síntesis de una micromatriz de péptidos que contiene 20 bloques de construcción de aminoácidos, se requieren 20 ciclos para alargar cada casilla de la micromatriz de péptidos en un residuo de aminoácido. La combinación de residuos de aminoácidos dentro de un oligopéptido depende de los aminoácidos específicos, que se unen uno tras otro al respectivo grupo funcional anterior durante los sucesivos ciclos de síntesis.

35 El término "grupo amino reactivo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una amina que puede reaccionar con un grupo funcional para formar un enlace covalente entre el nitrógeno del grupo amino y el electrófilo del grupo funcional, tal como un enlace peptídico.

El término "disolvente orgánico polar", tal como se usa en el presente documento, se refiere a disolventes que son solubles en agua en el sentido de que es posible obtener una mezcla homogénea del disolvente en agua a temperatura ambiente en condiciones ambientales. Los disolventes orgánicos polares preferentes son metanol, etanol, propanol, metiletilcetona, acetonitrilo, acetona, tetrahidrofurano (THF), dioxano, dimetilsulfóxido (DMSO), n-metil-2-pirrolidona (NMP), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA).

40 El término "base", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia capaz de aceptar un protón en disolventes polares o no polares. La base de elección para una reacción particular depende de los materiales de partida, del disolvente y de la temperatura usada para una reacción específica. Ejemplos de bases incluyen sales de carbonato, fosfatos, haluros, hidróxidos, hidruros, aminas heterocíclicas, disililamidas, trialkilaminas, aminas bicíclicas, hidruros de metales alcalinos, bases que contienen nitrógeno.

El término "ciclo de síntesis", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un número predeterminado de etapas de reacción sucesivas que se realizan para llevar a cabo una síntesis de oligopéptidos. Más particularmente, el término "ciclo de síntesis" se refiere a un número predeterminado de etapas de reacción sucesivas que se realizan usando síntesis en fase sólida de oligopéptidos con el fin de unir el respectivo aminoácido siguiente al grupo funcional anterior. Una síntesis de oligopéptidos comprende un número predeterminado de ciclos de síntesis, en el que en cada ciclo se une un aminoácido específico al grupo funcional anterior. Por lo tanto, el número de ciclos depende del número de aminoácidos del oligopéptido. Por ejemplo, para la síntesis de una micromatriz de péptidos que contiene 20 bloques de construcción de aminoácidos, se requieren 20 ciclos para alargar cada casilla de la micromatriz de péptidos en un residuo de aminoácido. La combinación de residuos de aminoácidos dentro de un oligopéptido depende de los aminoácidos específicos, que se unen uno tras otro al respectivo grupo funcional anterior durante los sucesivos ciclos de síntesis.

45 El término "ciclo de síntesis", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un número predeterminado de etapas de reacción sucesivas que se realizan para llevar a cabo una síntesis de oligopéptidos. Más particularmente, el término "ciclo de síntesis" se refiere a un número predeterminado de etapas de reacción sucesivas que se realizan usando síntesis en fase sólida de oligopéptidos con el fin de unir el respectivo aminoácido siguiente al grupo funcional anterior. Una síntesis de oligopéptidos comprende un número predeterminado de ciclos de síntesis, en el que en cada ciclo se une un aminoácido específico al grupo funcional anterior. Por lo tanto, el número de ciclos depende del número de aminoácidos del oligopéptido. Por ejemplo, para la síntesis de una micromatriz de péptidos que contiene 20 bloques de construcción de aminoácidos, se requieren 20 ciclos para alargar cada casilla de la micromatriz de péptidos en un residuo de aminoácido. La combinación de residuos de aminoácidos dentro de un oligopéptido depende de los aminoácidos específicos, que se unen uno tras otro al respectivo grupo funcional anterior durante los sucesivos ciclos de síntesis.

El término "ciclo de síntesis", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un número predeterminado de etapas de reacción sucesivas que se realizan para llevar a cabo una síntesis de oligopéptidos. Más particularmente, el término "ciclo de síntesis" se refiere a un número predeterminado de etapas de reacción sucesivas que se realizan usando síntesis en fase sólida de oligopéptidos con el fin de unir el respectivo aminoácido siguiente al grupo funcional anterior. Una síntesis de oligopéptidos comprende un número predeterminado de ciclos de síntesis, en el que en cada ciclo se une un aminoácido específico al grupo funcional anterior. Por lo tanto, el número de ciclos depende del número de aminoácidos del oligopéptido. Por ejemplo, para la síntesis de una micromatriz de péptidos que contiene 20 bloques de construcción de aminoácidos, se requieren 20 ciclos para alargar cada casilla de la micromatriz de péptidos en un residuo de aminoácido. La combinación de residuos de aminoácidos dentro de un oligopéptido depende de los aminoácidos específicos, que se unen uno tras otro al respectivo grupo funcional anterior durante los sucesivos ciclos de síntesis.

Un aspecto de la presente invención es un procedimiento para sintetizar una micromatriz de oligopéptidos, en el que el procedimiento comprende las etapas de:

65 a) acoplamiento a un grupo amino reactivo unido directamente o indirectamente a una superficie de un soporte sólido con un aminoácido que comprende un grupo amino protegido por un resto fotolábil seleccionado de entre 2-

(2-nitrofenil)-propoxicarbonilo (NPPOC) y 2-(2-nitro-4-benzoilfenil)-2'-propil-1'-oxicarbonilo (benzoil-NPPOC) con la condición de que el grupo amino de tirosina esté protegido por benzoil-NPPOC;

b) opcionalmente, la adición de caperuza a aminoácidos sin reaccionar;

c) opcionalmente, el lavado del soporte sólido de plástico;

5 d) fotoirradiación del grupo amino protegido de modo que el grupo amino fotoirradiado sea reactivo; y

e) repetición de las etapas b) a d) durante un número predeterminado de veces, a través de lo cual se sintetiza un oligopéptido.

En otro modo de realización, un procedimiento para sintetizar una micromatriz de oligopéptidos comprende las etapas de:

10 a) acoplamiento a un grupo amino reactivo unido directamente o indirectamente a una superficie de un soporte sólido con un aminoácido que comprende un grupo amino protegido por un resto fotolábil seleccionado de entre 2-(2-nitrofenil)-propoxicarbonilo (NPPOC) y 2-(2-nitro-4-benzoilfenil)-2'-propil-1'-oxicarbonilo (benzoil-NPPOC) con la condición de que el grupo amino de tirosina esté protegido por benzoil-NPPOC;

15 b) opcionalmente, la adición de caperuza a aminoácidos sin reaccionar;

c) opcionalmente, el lavado del soporte sólido;

d) fotoirradiación selectiva del lugar del grupo amino protegido a 350 a 410 nm usando una máscara o un dispositivo sin máscara, preferentemente en un disolvente orgánico polar, lo más preferentemente conteniendo una molécula antioxidante que reacciona con productos secundarios de la etapa de fotoirradiación; y

20 e) repetición de las etapas b) a d) durante un número predeterminado de veces.

En otro modo de realización, un procedimiento para sintetizar una micromatriz de oligopéptidos comprende las etapas de:

25 a) acoplamiento a un grupo amino reactivo unido directamente o indirectamente a una superficie de un soporte sólido con un aminoácido que comprende un grupo amino protegido por un resto fotolábil seleccionado de entre 2-(2-nitrofenil)-propoxicarbonilo (NPPOC) y 2-(2-nitro-4-benzoilfenil)-2'-propil-1'-oxicarbonilo (benzoil-NPPOC) con la condición de que el grupo amino de tirosina esté protegido por benzoil-NPPOC;

b) opcionalmente, la adición de caperuza a aminoácidos sin reaccionar;

c) opcionalmente, el lavado del soporte sólido;

30 d) fotoirradiación selectiva del lugar del grupo amino protegido a 350 a 410 nm usando una máscara o un dispositivo sin máscara, preferentemente en un disolvente orgánico polar, lo más preferentemente conteniendo una molécula antioxidante que reacciona con productos secundarios de la etapa de fotoirradiación;

e) repetición de las etapas b) a d) durante un número predeterminado de veces.

35 f) fotoirradiación de todos los "grupos de protección permanente" situados en las cadenas laterales de aminoácidos, por ejemplo, lisina (ε-amino-BOC)-; y

g) opcionalmente, revertir el daño oxidativo que se produce en el azufre de cisteína o metionina mediante el tratamiento de la micromatriz de oligopéptidos con un agente reductor.

40 La evidencia experimental de los inventores ha demostrado que el plástico proporciona ventajas sobre el vidrio en la tecnología de matriz de péptidos. Los soportes derivados de plástico muestran una reducción significativa de la unión no específica de proteínas dentro de una muestra. La unión no específica, especialmente de proteínas de baja abundancia, puede conducir a la pérdida de información importante, en el caso de que dichas proteínas desempeñen un papel en el fenómeno que se analiza en la matriz de péptidos.

45 El soporte de acuerdo con la invención es un soporte sólido de plástico. En un modo de realización, el soporte comprende una superficie y un cuerpo, en el que el cuerpo consiste en poliolefina. La superficie del soporte puede comprender grupos amino reactivos. En algunos casos, la superficie comprende ácido ε-amino-hexanoico. El soporte se puede proporcionar en cualquier forma, tal como perlas, geles, placas, membranas, portaobjetos o, preferentemente, chips. En un modo de realización, los residuos de aminoácidos C-terminales están unidos a la superficie del soporte (por ejemplo, un soporte sólido plástico) a través de enlaces peptídicos. En otro modo de realización, los aminoácidos C-terminales de los oligopéptidos se acoplan a la superficie del soporte usando ácido ε-amino-hexanoico.

55 La superficie del soporte comprende grupos funcionales capaces de formar enlaces tales como enlaces peptídicos. Preferentemente, la superficie del soporte se puede recubrir con un compuesto respectivo que proporciona posteriormente los grupos funcionales capaces de formar los enlaces. En otro modo de realización más, la superficie comprende ácido ε-amino-hexanoico.

60 El primer aminoácido, que está acoplado al soporte, y los siguientes aminoácidos acoplados al mismo están protegidos por cualquier grupo protector capaz de impedir que el grupo funcional potencialmente reactivo del aminoácido reaccione en ciertas condiciones de reacción. Los grupos protectores preferentes son o-nitrobenciloxicarbonilo (NBOC), o-nitrofenil-etoxicarbonilo (NPEOC), 2-(3,4-metilenodioxi-2-nitrofenil)-propiloxicarbonilo (MeNPPOC), 2-(3,4-metilenodioxi-2-nitrofenil)-oxicarbonilo (MeNPOC), dimetoxi-benzo-inilil-oxicarbonilo (DMBOC), 2-(2-nitrofenil)-etilsulfonilo (NPES) y (2-nitrofenil)-propilsulfonilo (NPPS). Ejemplos de grupos protectores son 2-(2-nitrofenil)-propoxicarbonilo (NPPOC), o derivados del mismo tales como 2-(2-nitro-4-benzoilfenil)-2'-propil-1'-oxicarbonilo (benzoil-NPPOC). En algunos modos de realización, los grupos protectores son

NPPOC y/o derivados de NPPOC. En algunos casos, los derivados son 2-(2-nitro-4-benzoil-fenil)-propoxycarbonilo (benzoil-NPPOC).

5 En un modo de realización, cualquier aminoácido natural o no natural protegido por los grupos protectores antes mencionados se puede usar para la síntesis de micromatrices de péptidos. Preferentemente, se usan aminoácidos naturales para la síntesis de micromatrices de oligopéptidos. En un modo de realización específico, los aminoácidos están protegidos por NPPOC y/o derivados de NPPOC, tales como benzoil-NPPOC. Los aminoácidos, incluyendo la tirosina protegida con benzoil-NPPOC, que están protegidos con benzoil-NPPOC, muestran una semivida de aproximadamente 2 a 3 minutos. El inconveniente de usar exclusivamente aminoácidos protegidos con benzoil-NPPOC es que los grupos protectores disociados se adhieren al soporte sólido, inhibiendo así el proceso de síntesis de los oligopéptidos. Este fenómeno es desconocido para las matrices de ADN y se ha atribuido a la adición inducida por luz del resto de benzofenona liberado a la cadena peptídica en crecimiento o al propio soporte sólido. En la tecnología de matrices de péptidos, son preferentes los soportes derivados de plástico debido a su baja unión no específica a las muestras de proteínas. Sin embargo, se sabe que los restos de benzofenona se unen a los hidocarburos presentes en las superficies de plástico mediante un mecanismo radical que inhibe por tanto el proceso de síntesis, lo que da como resultado una baja calidad de los oligopéptidos sintetizados.

20 Se usan 16-19 aminoácidos diferentes, tales como histidina, alanina, valina, glicina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, glutamina, asparagina, treonina, arginina, prolina, fenilalanina, triptófano, cisteína, tirosina, metionina y lisina, que están protegidos con NPPOC y/o derivados de NPPOC. En un modo de realización específico, los grupos amino de algunos aminoácidos están protegidos con benzoil-NPPOC. Por ejemplo, el grupo amino de la tirosina se puede proteger con benzoil-NPPOC.

25 Los grupos protectores están unidos de forma escindible a grupos funcionales potencialmente reactivos de aminoácidos con el fin de evitar que los grupos funcionales potencialmente reactivos reaccionen de manera no controlada. Los grupos protectores se unen preferentemente a los aminoácidos mediante una unión covalente. Los grupos protectores se pueden escindir del grupo funcional respectivo de cualquier modo, tal como por la acción de ácidos, bases, fluoruro, enzimas, reducción u oxidación. Es preferente el uso de grupos protectores fotolábiles, que se escinden por exposición a la luz o irradiación, respectivamente.

30 En un modo de realización, se puede usar la irradiación para escindir los grupos protectores fotolábiles, que abarca todo el espectro de radiación electromagnética. Para escindir el grupo protector fotolábil se usa preferentemente el intervalo desde luz UV a luz IR, que oscila aproximadamente entre 200 nm y 700 nm. En algunos casos, la desprotección se realiza entre 200 nm y 400 nm. En un modo de realización específico, la desprotección se realiza a 35 350 a 410 nm, a 350 a 375 nm, a 360 a 370 nm, o a aproximadamente 365 nm.

40 El soporte puede ser no transparente o transparente para la luz en el intervalo de luz UV a luz IR. En algunos casos, el soporte tiene al menos un 50 % de transmisión de luz, al menos un 60 % de transmisión de luz y al menos un 75 % de transmisión de luz en el intervalo de UV a IR. En otro modo de realización, el soporte tiene al menos un 50 % de transmisión de luz, al menos un 60 % de transmisión de luz y al menos un 75 % de transmisión de luz a una longitud de onda de 350 a 410 nm. En algunos casos, el soporte tiene al menos un 50 % de transmisión de luz, al menos un 60 % de transmisión de luz y al menos un 75 % de transmisión de luz a longitudes de onda de 350 a 375 nm, 360 a 370 nm o aproximadamente 365 nm.

45 En un modo de realización no hay ninguna etapa de lavado del soporte entre la etapa de adición de caperuza y la etapa de desprotección del procedimiento para la síntesis de una micromatriz de oligopéptidos. En algunos casos, hay una o más etapas de lavado entre la etapa de adición de caperuza y la etapa de desprotección del procedimiento para la síntesis de una micromatriz de oligopéptidos. El lavado del soporte se puede realizar mediante un disolvente orgánico polar o una mezcla de disolventes orgánicos.

50 En otro modo de realización, la síntesis de las micromatrices de oligopéptidos se realiza usando técnicas basadas en fotolitografía. En tales casos, se usa una máscara fotolitográfica para exponer las casillas respectivas a la luz con el fin de desproteger los grupos funcionales, preferentemente los grupos alfa-amino de los péptidos, para el acoplamiento del siguiente aminoácido. Preferentemente, se usa fotolitografía sin máscara para dirigir la luz hacia las respectivas casillas en una micromatriz de oligopéptidos. Para este propósito, la fotolitografía sin máscara usa dispositivos controlables, por ejemplo, dispositivos controlados por ordenador, que tienen elementos direccionables individualmente para dirigir luz hacia las casillas respectivas. Dichos dispositivos controlables se seleccionan entre, pero no se limitan a, pantallas LCD transmisoras de luz y divisores de haz. Preferentemente, se usa un dispositivo digital de microespejos como un dispositivo controlable, que es una matriz de elementos de espejo de aluminio direccionables individualmente que son operables bajo control de programas informáticos. Dichos elementos redirigen la luz hacia las respectivas casillas de una micromatriz. En modos de realización específicos, un dispositivo de microespejos es el Digital Light Processor (DLP) de Texas Instruments, Inc.

60 La fotoirradiación se puede limitar espectralmente a longitudes de onda de 350 a 410 nm, 350 a 375 nm, 360 a 370 nm, 363 a 367 nm o 365 nm.

La resolución espacial dirigiendo la luz hacia las respectivas casillas a través de los microespejos de aluminio direccionables individualmente puede conducir a muchas densidades de oligopéptidos de elección por área de superficie. En un modo de realización la micromatriz tiene una densidad de al menos aproximadamente 10 000 casillas de oligopéptidos y preferentemente de al menos aproximadamente 50 000 casillas de oligopéptidos por  $\text{cm}^2$  con respecto a toda el área del soporte sólido. El soporte sólido de acuerdo con la invención puede tener cualquier tamaño adecuado para los portaobjetos de micromatrices, preferentemente el tamaño del soporte sólido es de 75 x 25 mm (18,75  $\text{cm}^2$ ). Una única micromatriz puede contener al menos aproximadamente 385 000 casillas de oligopéptidos únicas, al menos aproximadamente 720 000 casillas de oligopéptidos únicas, o al menos aproximadamente 2,1 millones de casillas de oligopéptidos únicas. El dispositivo de microespejos de Texas Instruments, Inc. contiene actualmente 4,2 millones de elementos de espejo (píxeles). Por lo tanto, el número de casillas de oligopéptidos de una única micromatriz está limitado actualmente a 4,2 millones de casillas de oligopéptidos únicas.

Las micromatrices de la presente invención son micromatrices de alta densidad que tienen un extenso número de casillas en un área compacta. Los modos de realización de las presentes micromatrices pueden tener una variedad de densidades de casillas. Por ejemplo, las micromatrices de la presente invención pueden tener una densidad de al menos 10 000 casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$ , al menos 50 000 casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$ , al menos 100 000 casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$ , al menos 200 000 casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$ , al menos 300 000 casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$ , al menos 400 000 casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$ , al menos 500 000 casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$  o al menos 1 000 000 de casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$ . Además, ciertos modos de realización de micromatrices tienen la densidad de casillas dentro de una variedad de intervalos de densidades de casillas. Por ejemplo, la densidad puede comprender un intervalo de aproximadamente 10 000 a 1 000 000 casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$ , de aproximadamente 50 000 a 1 000 000 casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$ , de aproximadamente 100 000 a 1 000 000 casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$ , de aproximadamente 200 000 a 1 000 000 casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$ , de aproximadamente 300 000 a 1 000 000 casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$ , de aproximadamente 400 000 a 1 000 000 casillas/ $\text{cm}^2$ , de aproximadamente 500 000 a 1 000 000 casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$ , de aproximadamente de 10 000 a 500 000 casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$ , de aproximadamente 50 000 a 500 000 casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$ , de aproximadamente 100 000 a 500 000 casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$ , de aproximadamente 200 000 a 500 000 casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$  o cualquier intervalo que se encuentre dentro de un nivel inferior a 10 000 y un nivel superior a 1 000 000 casillas de oligopéptidos/ $\text{cm}^2$ .

Los oligopéptidos sintetizados en la micromatriz pueden tener cualquier longitud y pueden contener cualquier número del mismo o de diferentes residuos de aminoácidos. Preferentemente, los oligopéptidos sintetizados en la micromatriz tienen al menos 25 o al menos 35 residuos de aminoácidos. En algunos casos, sustancialmente todos los oligopéptidos sintetizados en la micromatriz son de entre 6 y 24 aminoácidos o de entre 9 y 18 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 %, o un 100 % de las casillas de oligopéptidos de una micromatriz proporcionada en el presente documento puede comprender entre 6 y 24 aminoácidos o entre 9 y 18 aminoácidos.

En otro modo de realización, la fotoirradiación se lleva a cabo en presencia de un disolvente orgánico, preferentemente un disolvente orgánico polar. En algunos casos, la fotoirradiación se realiza en presencia de un disolvente orgánico polar o una mezcla de disolventes incluyendo, sin limitarse a, dimetilsulfóxido, n-metil-2-pirrolidona, dimetilformamida, acetonitrilo, metanol, etanol y propanol.

La desprotección, especialmente por fotoirradiación, se puede realizar en ausencia y en presencia de una base. Las bases adecuadas incluyen sales de carbonato, sales de amonio, fosfatos, sales de tiolatos, hidróxidos, hidruros, aminas heterocíclicas, disilamidas, trialkilaminas, aminas bicíclicas, sales de ácidos orgánicos y bases que contienen nitrógeno. En un modo de realización específico, la base en la que se lleva a cabo la fotoirradiación se selecciona entre hidrazina, hidroxilamina o imidazol. Más preferentes son básicas débiles, especialmente nucleofílicas, y bases reductoras débiles.

Los procedimientos usados para la síntesis de oligopéptidos o micromatrices de oligopéptidos están diseñados en ciclos repetitivos, que comprenden las etapas básicas de acoplamiento, opcionalmente adición de caperuza, opcionalmente lavado y desprotección. Durante cada ciclo, otro aminoácido se acopla al oligopéptido. Por lo tanto, el número de ciclos viene determinado por la longitud de los oligopéptidos sintetizados. Cada paso tiene una duración definida que depende de la velocidad de la reacción química asociada. Un factor limitante con respecto a la síntesis de oligopéptidos o micromatrices de oligopéptidos es la etapa de desprotección junto con la etapa de acoplamiento. La escisión del grupo protector por la exposición a la luz depende, por una parte, de parámetros físicos, tales como el pH, la temperatura, el contenido de sal, la intensidad de la luz y las longitudes de onda. Por otra parte, la escisión del grupo protector mediante la exposición a la luz depende del aminoácido que se use en el ciclo respectivo junto con el grupo protector. Por ejemplo, el tiempo de desprotección de la tirosina protegida con NPPOC se incrementa en un factor de 3 a 4 en comparación con los aminoácidos naturales restantes. De este modo, la tirosina protegida con NPPOC es el principal factor limitante del tiempo de la síntesis de oligopéptidos o micromatrices de oligopéptidos. En contraste, el tiempo de desprotección de la tirosina protegida con benzoil-NPPOC está en el mismo nivel que los restantes aminoácidos naturales protegidos con NPPOC. De este modo, el uso de tirosina protegida con benzoil-NPPOC junto con los 19 aminoácidos naturales restantes protegidos con NPPOC conduce a

la eliminación del principal factor limitante del tiempo de la síntesis de oligopéptidos o micromatrices de oligopéptidos y, por tanto, a un aumento significativo de la velocidad. En un modo de realización, la etapa de acoplamiento de cada ciclo de síntesis tiene lugar en menos de 15 minutos, menos de 10 o menos de 5 minutos.

5 Es esencial tener una alineación activa de la micromatriz de oligopéptidos y las casillas, respectivamente, con la parte óptica entre los ciclos de síntesis con el fin de garantizar la exposición a la luz únicamente en las casillas respectivas. Por lo tanto, es necesario ajustar con precisión la posición de la micromatriz de oligopéptidos durante una duración de más de 36 horas en una y única posición con una tolerancia de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . Para conseguir este objetivo, la matriz de oligopéptidos y la matriz de microespejos se alinean activamente mediante un sistema de control. En otro modo de realización, el posicionamiento de los haces de fotoirradiación sobre el soporte se controla y se ajusta a lo largo del tiempo. En algunos casos, el posicionamiento de los haces de fotoirradiación sobre el soporte se controla y se ajusta antes de al menos cada 4ª fotoirradiación (etapa de desprotección) y, en algunos casos, antes de cada irradiación.

15 En un modo de realización, el soporte puede estar hecho de cualquier material conocido por el experto usado para la síntesis de una micromatriz de oligopéptidos, preferentemente el soporte está hecho de plástico, vidrio, carbono sobre vidrio, metal sobre vidrio o plástico sobre vidrio. Preferentemente, se usa plástico como soporte. Más preferente es un soporte sólido plástico. En otro modo de realización, el ajuste se realiza mediante el ajuste de la posición del soporte sólido de plástico.

20 Otro aspecto de la presente invención es una micromatriz de oligopéptidos sintetizada de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

25 Otro aspecto más de la presente invención es una micromatriz de oligopéptidos, que está situada sobre un soporte, preferentemente un soporte sólido plástico, que comprende una densidad de al menos aproximadamente 10 000 casillas de oligopéptidos y preferentemente al menos aproximadamente 50 000 casillas de oligopéptidos por  $\text{cm}^2$ . Aplicado al área de una micromatriz, una única micromatriz de oligopéptidos puede contener al menos aproximadamente 385 000 casillas de oligopéptidos únicas, preferentemente al menos aproximadamente 720 000 casillas de oligopéptidos únicas, más preferentemente al menos aproximadamente 2,1 millones de casillas de oligopéptidos únicas.

35 En un modo de realización, los residuos de aminoácidos C-terminales están unidos covalentemente a la superficie del soporte, preferentemente un soporte sólido plástico, a través de enlaces peptídicos. En otro modo de realización, los aminoácidos C-terminales de los oligopéptidos están acoplados a la superficie del soporte, preferentemente un soporte sólido de plástico, con un resto enlazador de ácido  $\epsilon$ -amino-hexanoico.

40 La micromatriz de oligopéptidos de acuerdo con la invención se puede usar para cualquier aplicación conocida por el experto, por ejemplo, la micromatriz de oligopéptidos se puede usar como un inmunoensayo, donde la superficie de la matriz se bloquea en una primera etapa. Es aconsejable el bloqueo para evitar la unión no específica de proteínas o anticuerpos de la muestra a la superficie de la matriz basándose en una simple adsorción o precipitación. El bloqueo se puede realizar con albúminas, caseína, leche en polvo o similares. En algunos casos, se pueden usar ciertas fracciones hidrolizadas como la caseína soluble en álcali. Posteriormente, la matriz se puede incubar con una muestra que contiene anticuerpos, los cuales se unen selectivamente a los epítopos representados en la matriz. En un modo de realización, la muestra se diluye en un tampón que contiene el reactivo de bloqueo. Los anticuerpos de la muestra se pueden entonces detectar usando anticuerpos secundarios que llevan un marcador conocido por el experto. Dichos marcadores incluyen, pero no se limitan a, colorantes fluorescentes, tales como (Cy2, Cy3 o Cy5) <sup>TM</sup> y enzimas, tales como HRP o fosfatasa alcalina. Después de un lavado extensivo con ácido diluido, guanidina o detergente, la matriz se puede secar y analizar.

50 Los siguientes ejemplos 1 a 5 se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos establecidos sin apartarse del espíritu de la invención.

## Ejemplos

55

### Ejemplo 1:

#### Síntesis de aminoácidos protegidos con NPPOC

#### 60 NPPOC-L-fenilalanina

65 Se añadieron 27,1 g de L-fenilalanina a una solución de 38,2 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en 200 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . A la solución transparente se añadieron 200 ml de tetrahidrofurano (THF). Se añadió gota a gota sobre hielo una solución de 40,0 g de clorocarbonato de 2-nitrofenil-2-propan-1-ol (NPPOC-Cl) en 160 ml de THF. Después de agitar durante 2 horas a 0 °C, el THF se retiró en un evaporador rotatorio bajo vacío y el residuo se extrajo 4 veces con 200 ml de una mezcla de acetato de etilo-hexanos 1:1. El residuo acuoso se acidificó a pH 2,5 con HCl diluido y se extrajo dos

veces con aproximadamente 400 ml de acetato de etilo. Los extractos combinados se lavaron con H<sub>2</sub>O y se evaporaron a vacío hasta sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano y se purificó por cromatografía en columna (aproximadamente 120 g de gel de sílice). El rendimiento ascendió a 52,9 g (87 %) de un aceite denso amorfo incoloro. La pureza se midió por HPLC y es de un 99 %.

5

#### **NPPOC-L-leucina**

Se añadieron 21,5 g de L-leucina a una solución de 38,2 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 800 ml de H<sub>2</sub>O. Posteriormente, se añadieron 800 ml de THF a la solución transparente. Se añadió gota a gota sobre hielo una solución de 40,0 g de NPPOC-Cl en 160 ml de THF. Después de agitar durante 0,5 horas a 0 °C, el THF se retiró en un evaporador rotatorio bajo vacío y el residuo se extrajo 3 veces con 200 ml de una mezcla de acetato de etilo-hexanos 1:1. El residuo acuoso se acidificó a pH 2,5 con HCl diluido y se extrajo dos veces con aproximadamente 400 ml de acetato de etilo. Los extractos combinados se lavaron con H<sub>2</sub>O y se evaporaron a vacío hasta sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano y se purificó por cromatografía en columna corta (aproximadamente 50 g de gel de sílice). El rendimiento ascendió a 53 g (95 %) de un aceite transparente amorfo de color rojo-parduzco. La pureza se midió por HPLC y es de un 97,4 %. El m/z se determinó mediante LC/MS y es MH<sup>+</sup>: 339,4.

10

15

#### **NPPOC-L-valina**

Se añadieron 100 g de L-valina a una solución de 199 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 5000 ml de H<sub>2</sub>O. Se añadieron 2500 ml de THF a la solución transparente. Se añadió gota a gota sobre hielo una solución de 207,9 g de NPPOC-Cl en 1250 ml de THF. Después de agitar durante 0,5 horas a 0 °C, se eliminó THF en un evaporador rotatorio bajo vacío y el residuo se extrajo 4 veces con 1000 ml de una mezcla de acetato de etilo-hexanos 1:1. El residuo acuoso se acidificó a pH 2,5 con HCl diluido/ácido cítrico 1:1 y se extrajo dos veces con aproximadamente 1500 ml de acetato de etilo. Los extractos combinados se lavaron con H<sub>2</sub>O y se evaporaron a vacío hasta sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano y se purificó por cromatografía en columna corta (aproximadamente 300 g de gel de sílice). El rendimiento ascendió a 226,8 g (82 %) de un aceite denso amorfo incoloro. La pureza se midió por HPLC y es de un 98,5 %. El m/z se determinó mediante LC/MS y es MH<sup>+</sup>: 325,3.

20

25

#### **NPPOC-L-glicina**

Se añadieron 12,3 g de glicina a una solución de 38,2 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 200 ml de H<sub>2</sub>O. Se añadieron 800 ml de THF a la solución transparente. Se añadió gota a gota sobre hielo una solución de 40,0 g de NPPOC-Cl en 160 ml de THF. Después de agitar durante 0,5 horas a 0 °C, el THF se retiró en un evaporador rotatorio bajo vacío y el residuo se extrajo 4 veces con 200 ml de acetato de etilo-hexanos 1:1 cada vez. El residuo acuoso se acidificó a pH 2,5 con HCl diluido y se extrajo dos veces con aproximadamente 300 ml de acetato de etilo. Los extractos combinados se lavaron con H<sub>2</sub>O y se evaporaron a vacío hasta sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano y se purificó por cromatografía en columna (aproximadamente 80 g de gel de sílice). El rendimiento ascendió a 23,7 g (51 %) de un aceite denso amorfo de color rojizo. La pureza se midió por HPLC y es de un 99,1 %.

35

40

#### **NPPOC-L-ácido glutámico**

Se añadieron 24,2 g de ácido L-glutámico a una solución de 55,7 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 800 ml de H<sub>2</sub>O. Se añadieron 800 ml de THF a la solución transparente. Se añadió gota a gota sobre hielo una solución de 40,0 g de NPPOC-Cl en 160 ml de THF. Después de agitar durante 0,5 horas, el THF se eliminó en un evaporador rotatorio bajo vacío y el residuo se extrajo 4 veces con 200 ml de acetato de etilo-hexanos 1:1 cada vez. El residuo acuoso se acidificó a pH 2,5 con HCl diluido y se extrajo dos veces con aproximadamente 400 ml de acetato de etilo. Los extractos combinados se lavaron con H<sub>2</sub>O y se evaporaron a vacío hasta sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano y se purificó por cromatografía en columna corta (aproximadamente 100 g de gel de sílice). El rendimiento ascendió a 48,5 g (83 %) de una espuma amorfa rosa. La pureza se midió por HPLC y es de un 96,3 %. El m/z se determinó mediante LC/MS y es MH<sup>+</sup>: 355,3.

45

50

#### **NPPOC-(1-tritil)-L-histidina**

En la primera etapa, se añadieron 140 ml de piperidina a una solución de 100 g de FMOC-tritil-L-histidina en 2000 ml de THF. Después de agitar durante 2 horas a TA, se añadieron 2500 ml de H<sub>2</sub>O y se agitó durante 0,5 horas adicionales. El precipitado se eliminó por filtración, se eliminó el THF por destilación en un evaporador rotatorio y la solución se acidificó a pH 2,5 con HCl diluido. Después de la incubación durante la noche, el precipitado se recogió por filtración, se lavó con pequeñas cantidades de agua, se resuspendió en una mezcla de 20 ml de ácido acético en 800 ml de H<sub>2</sub>O y se agitó durante 0,5 horas. La filtración y el secado al aire proporcionaron 64 g de un polvo incoloro (95 %), que se usó en la siguiente etapa.

55

60

En la segunda etapa, se añadieron 64 g de tritil-L-histidina a una solución de 37,5 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 2000 ml de H<sub>2</sub>O. Se añadieron 2000 ml de THF a la solución transparente. Se añadió gota a gota sobre hielo una solución de 39,0 g de NPPOC-Cl en 160 ml de THF. Después de agitar durante 0,5 horas a 0 °C, se eliminó el THF en un evaporador rotatorio bajo vacío y el residuo se ajustó a pH 10,6 con NaOH, se extrajo 3 veces con 1000 ml de acetato de etilo-

65

hexanos 1:1.

El residuo acuoso se acidificó a pH 2,5 con HCl diluido y se extrajo dos veces con aprox. 400 ml de acetato de etilo. Los extractos combinados se lavaron con agua y se evaporaron a vacío hasta sequedad.

5 El residuo se disolvió en diclorometano y se purificó por cromatografía en columna corta (aproximadamente 120 g de gel de sílice). El rendimiento ascendió a 132 g (78 %) de una espuma amorfa incolora. La pureza se midió por HPLC y es de un 97 %.

10 Otros ejemplos de aminoácidos que se pueden proteger con NPPOC usando procesos similares de 1 o 2 pasos como se indica en las figs. 1 y 2 y que se describen anteriormente son alanina, valina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, serina, glutamina, asparagina, treonina, arginina, prolina, triptófano, cisteína, lisina, norleucina, acetil lisina, hidroxilprolina y ácido 6-amino-hexanoico. Sin embargo, otros ejemplos de aminoácidos disponibles a partir de estas secuencias de reacción incluirían D-aminoácidos, beta-aminoácidos y otros aminoácidos modificados no naturales.

### Ejemplo 2:

#### Síntesis de aminoácidos protegidos con benzoil-NPPOC

##### Benzoil-NPPOC-L-fenilalanina

20 Se añadieron 28,1 g de L-fenilalanina a una solución de 39 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 830 ml de H<sub>2</sub>O. Se añadieron 830 ml de THF a la solución transparente. Se añadió gota a gota sobre hielo una solución de 59,1 g de benzoil-NPPOC-Cl en 150 ml de THF bajo agitación vigorosa. Después de la adición, se mantuvo la agitación durante 0,5 horas a 0 °C, se eliminó el THF en un evaporador rotatorio bajo vacío y el residuo se extrajo 4 veces con 200 ml de éter etílico cada vez. El residuo acuoso se acidificó a pH 4 con HCl diluido y se extrajo dos veces con aproximadamente 400 ml de acetato de etilo. Los extractos combinados se lavaron con H<sub>2</sub>O y se evaporaron a vacío hasta sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano y se purificó por cromatografía en columna corta (aproximadamente 80 g de gel de sílice). El rendimiento ascendió hasta 55,6 g (68 %) de una espuma amorfa incolora. La pureza se midió por HPLC y es de un 97 %.

##### Benzoil-NPPOC-L-metionina

35 Se añadieron 75,9 g de L-metionina a una solución de 118,7 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 1700 ml de H<sub>2</sub>O. Se añadieron 1500 ml de THF a la solución transparente. Se añadió gota a gota sobre hielo una solución de 177 g de benzoil-NPPOC-Cl en 300 ml de THF. Después de agitar durante 0,5 horas a 0 °C, se eliminó el THF en un evaporador rotatorio bajo vacío y el residuo se extrajo 4 veces con 200 ml de éter etílico cada vez. El residuo acuoso se acidificó a pH 3 con HCl diluido y se extrajo dos veces con aproximadamente 400 ml de acetato de etilo. Los extractos combinados se lavaron con H<sub>2</sub>O y se evaporaron a vacío hasta sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano y se purificó por cromatografía en columna corta con diclorometano y diclorometano/metanol (aproximadamente 100 g de gel de sílice). El rendimiento ascendió a 132,8 g (57 %) de una espuma amorfa incolora. La pureza se midió por HPLC y es de un 95 %.

##### Benzoil-NPPOC-(t-Bu)-L-tirosina

45 En la primera etapa, se añadieron 92,6 g de piperidina a una solución de 100 g de FMOC-(tBu)-L-tirosina en 1600 ml de THF. Después de agitar durante 2 horas a TA, se eliminaron los disolventes por destilación en un evaporador rotatorio y el residuo se recogió en diclorometano y se extrajo dos veces con una solución de 23 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 600 ml de H<sub>2</sub>O. Los extractos acuosos combinados se acidificaron a pH 3 con HCl diluido. Después de la incubación durante la noche, el precipitado se recogió por filtración, se lavó con pequeñas cantidades de H<sub>2</sub>O y posteriormente se secó al aire. El licor madre se concentró hasta un pequeño volumen para producir otra fracción de precipitado. El rendimiento combinado ascendió a 43,9 g de agujas incoloras (85 %), que se usaron en la siguiente etapa.

55 En la segunda etapa, se añadieron 42,0 g de H-Tyr(t-Bu)-OH a una solución de 41,3 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 500 ml de H<sub>2</sub>O. Se añadieron 500 ml de THF a la solución transparente. Se añadió gota a gota sobre hielo una solución de 61,6 g de benzoil-NPPOC-Cl en 200 ml de THF. Después de agitar durante 0,5 horas a TA, el THF se eliminó en un evaporador rotatorio bajo vacío y el residuo se extrajo 4 veces con 200 ml de acetato de etilo-hexanos 1:1 cada vez.

60 El residuo acuoso se acidificó a pH 3 con HCl diluido y se extrajo dos veces con aproximadamente 400 ml de acetato de etilo. Los extractos combinados se lavaron con agua y se evaporaron a vacío hasta sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano y se purificó por cromatografía en columna corta con diclorometano y diclorometano/metanol (aproximadamente 100 g de gel de sílice). El rendimiento ascendió a 83 g (85 %) de una espuma amorfa incolora. La pureza se midió por HPLC y es de un 95 %.

### Ejemplo 3:

**Semividas de los aminoácidos protegidos con NPPOC tras la exposición a la luz**

5 Para evaluar las semividas, se proporcionaron aminoácidos protegidos con NPPOC en una concentración de  $c = 0,3$  mmol/l disueltos en n-metilpirrolidona (NMP) + 0,5 % de hidroxilamina en UltraVettes®. La exposición a la luz se realizó a 365 nm durante 2, 4, 6, 8 y 10 minutos para inducir la desprotección de los respectivos aminoácidos. Posteriormente, la solución se analizó por HPLC para evaluar el periodo de tiempo necesario para desproteger el 50 % de la cantidad inicial del aminoácido protegido. A continuación, se extrapolaron las semividas a partir de las duraciones resultantes a partir de los tiempos de exposición de 2, 4, 6, 8 y 10 minutos. Como se puede deducir de la fig. 4, en el caso de la semivida de NPPOC-Tyr(t-Bu)-OH, se extrapoló un periodo de tiempo de 9,6 minutos. De este modo, el periodo de tiempo de NPPOC-Tyr(t-Bu)-OH se incrementó en un factor de 3 a 4 en comparación con los restantes aminoácidos protegidos con NPPOC.

**Ejemplo 4:****Semividas de los aminoácidos protegidos con benzoil-NPPOC tras la exposición a la luz**

15 Para evaluar las semividas, se proporcionaron aminoácidos protegidos con benzoil-NPPOC en una concentración de  $c = 0,3$  mmol/l disueltos en NMP + 0,5 % de hidroxilamina en UltraVettes®. La exposición a la luz se realizó a 365 nm durante 2, 4, 6, 8 y 10 minutos para inducir la desprotección de los respectivos aminoácidos. Posteriormente, la solución se analizó por HPLC para evaluar el periodo de tiempo necesario para desproteger el 50 % de la cantidad inicial del aminoácido protegido. A continuación, se extrapolaron las semividas a partir de las duraciones resultantes a partir de los tiempos de exposición de 2, 4, 6, 8 y 10 minutos. Como se puede deducir de la fig. 5, en el caso de la semivida de benzoil-NPPOC-Tyr(t-Bu)-OH, se extrapoló un periodo de tiempo de 2,7 minutos. Por lo tanto, el periodo de tiempo de benzoil-NPPOC-Tyr(t-Bu)-OH estaba dentro del mismo intervalo en comparación con los restantes aminoácidos protegidos con NPPOC descritos en el ejemplo 3.

**Ejemplo 5:****Síntesis de una micromatriz de oligopéptidos usando el sintetizador de matrices de péptidos sin máscara (MAS)**

30 Se sintetizaron micromatrices de oligopéptidos de acuerdo con la invención. La celda de flujo se lavó con NMP (grado de síntesis de péptidos). Posteriormente, se añadieron de 0,5 a 0,7 ml de una solución 60 mM del  $\alpha$ -aminoácido protegido con NPPOC en DMF (grado de síntesis de péptidos) y 0,25 a 0,35 ml de HBTU anhídrido (hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio) 0,12 M y HOBt anhídrido (N-hidroxibenzotriazol), así como 0,25 a 0, ml de N,N-diisopropiletilamina 0,12 M en DMF (grado de síntesis de péptidos) en la cámara de reacción respectiva y se mezclaron en ella. La mezcla de reacción permaneció dentro de la cámara de reacción durante el tiempo de activación de 5 minutos y se bombeó posteriormente a la celda de flujo para la reacción de acoplamiento, mientras que la celda de flujo se llenó en un exceso de aproximadamente un 30 a 50 % y otro 10 a 40 % del volumen de la celda de flujo permaneció como tampón en el tubo de entrada de la celda de flujo. Después de un tiempo de acoplamiento de 2 minutos, la celda de flujo se lavó inicialmente con NMP puro (grado de síntesis de péptidos) y, posteriormente, la celda de flujo se llenó con NMP que contenía un 0,1 % de hidroxilamina y un 0,1 % de H<sub>2</sub>O. La celda de flujo rellena se irradió con luz de la longitud de onda de 365 nm durante aproximadamente de 40 a 60 segundos; directamente después de la irradiación, se lavó de nuevo con NMP puro (grado de síntesis de péptidos) y se preparó así para la siguiente etapa de acoplamiento. El software del MAS garantizó, durante la síntesis mediante la selección apropiada del mapa de bits para la máscara fotolitográfica, que el soporte sólido se exponía a la luz sólo en las casillas, donde se requería el acoplamiento del siguiente aminoácido.

**Ejemplo 6:****Síntesis de las secuencias de antígeno de 52 anticuerpos seleccionados**

55 Cincuenta y dos anticuerpos (véase la fig. 6) se seleccionaron de la base de datos del Atlas de proteínas humanas (proteinatlas.org en la World Wide Web). Las secuencias de antígeno respectivas se generaron de acuerdo con el ejemplo 5 en 164 ciclos de síntesis sucesivos como péptidos 10-mer con una superposición de 9 aminoácidos. Cada péptido tenía un resto de serina adicional en cada extremo con el fin de mejorar la hidrofilia del péptido unido a soporte y de permitir un fácil acceso de anticuerpos. En algunos casos, la superposición fue más corta, pero ninguna fue inferior a 6 aminoácidos. Las matrices de oligopéptidos desprotegidas se incubaron con mezclas de anticuerpos con factores de dilución según la recomendación de la hoja de datos para el análisis WESTERN en el tampón recomendado por el fabricante y sus epítomos de unión se determinaron como las señales de intensidad más alta mediante marcado fluorescente con un anticuerpo secundario anti-conejo. En algunos casos, las matrices se lavaron con tampón que contenía SDS al 0,1 % con el fin de eliminar anticuerpos unidos no específicos.

**Ejemplo 7:**

**Titulación de sensibilidad de anti-PAPOLA en tampón**

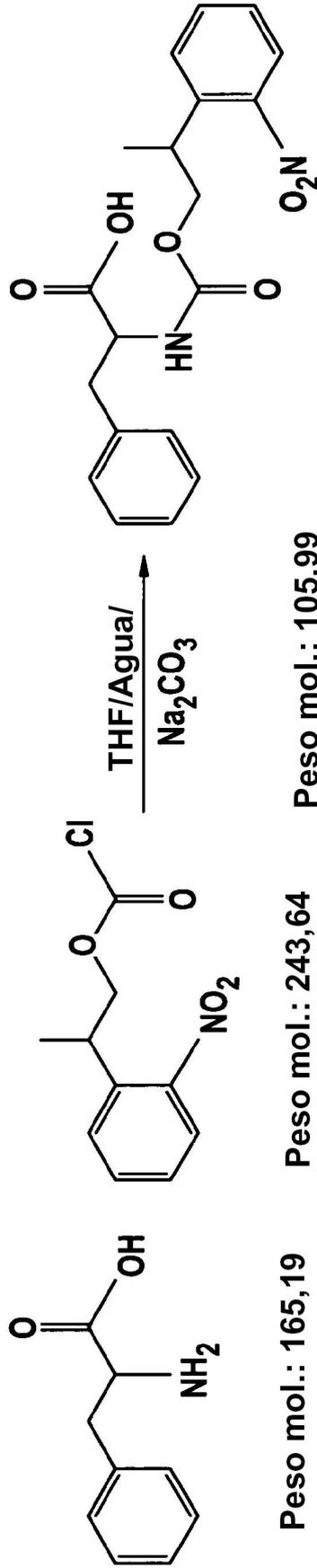
5 Se incubó una matriz de péptidos fabricada como se describe en el ejemplo 6 anterior con diluciones escalonadas del anticuerpo anti-PAPOLA (PoliA polimerasa alfa, HPA001788), desde 1:10 000 hasta 1:240 000 en submatrices separadas formadas por cámaras de muestras Roche Nimblegen 12 plex ensambladas. La tinción y el lavado se realizaron como se describió anteriormente. Como se representa en la fig. 7, los datos sin procesar tras el escaneado fluorescente con un escáner de micromatrices de Roche Nimblegen MS 200 revelaron los epítomos claramente visibles incluso a la dilución más alta, comparado con una concentración de anticuerpo de 10 aproximadamente 200 pg/ml, con una relación señal/ruido relativa de 4:1.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para sintetizar una micromatriz de oligopéptidos que contiene tirosina, en el que el procedimiento comprende las etapas de:
- 5 a) acoplamiento a un grupo amino reactivo unido directamente o indirectamente a una superficie de un soporte sólido de un aminoácido que comprende un grupo amino protegido por un resto fotolábil seleccionado de entre 2-(2-nitrofenil)-propoxicarbonilo (NPPOC) y 2-(2-nitro-4-benzoilfenil)-2'-propil-1'-oxicarbonilo (benzoil-NPPOC) en el que el grupo amino de la tirosina está protegido por benzoil NPPOC;
- 10 b) opcionalmente, la adición de caperuza a aminoácidos sin reaccionar;
- c) opcionalmente, el lavado del soporte sólido;
- d) fotoirradiación del grupo amino protegido de modo que el grupo amino fotoirradiado sea reactivo; y
- e) repetición de las etapas b) a d) durante un número predeterminado de veces, a través de lo cual se sintetiza un oligopéptido.
- 15 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el soporte sólido es plástico.
3. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, en el que la fotoirradiación se resuelve espacialmente.
4. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, en el que la superficie comprende ácido  $\epsilon$ -amino-hexanoico.
- 20 5. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en el que el soporte sólido tiene al menos un 50 % de transmisión de luz cuando se realiza fotoirradiación entre 350 y 410 nm.
6. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, en el que la fotoirradiación se realiza a una longitud de onda seleccionada de entre 350 y 410 nm, entre 350 y 375 nm, entre 360 y 370 nm, entre 363 y 367 nm y 365 nm.
- 25 7. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en el que la fotolitografía sin máscara comprende el uso de un dispositivo digital de microespejos.
- 30 8. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, en el que sustancialmente todos los oligopéptidos comprenden de 6 a 24 aminoácidos o de 9 a 18 aminoácidos.
9. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, en el que la fotoirradiación se lleva a cabo en presencia de un disolvente orgánico polar seleccionado del grupo que consiste en dimetilsulfóxido, N-metil-2-pirrolidona, dimetilformamida, acetonitrilo, metanol, etanol y propanol, o una base seleccionada del grupo que consiste en hidrazina, hidroxilamina e imidazol.
- 35 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además la colocación de haces de fotoirradiación sobre el soporte sólido antes de al menos cada 4ª etapa de fotoirradiación.
- 40 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la micromatriz de oligopéptidos comprende al menos aproximadamente 10 000 casillas de oligopéptidos por  $\text{cm}^2$  o al menos aproximadamente 50 000 casillas de oligopéptidos por  $\text{cm}^2$ .

Fig. 1

## a) NPPOC-L-fenilalanina



Peso mol.: 165,19

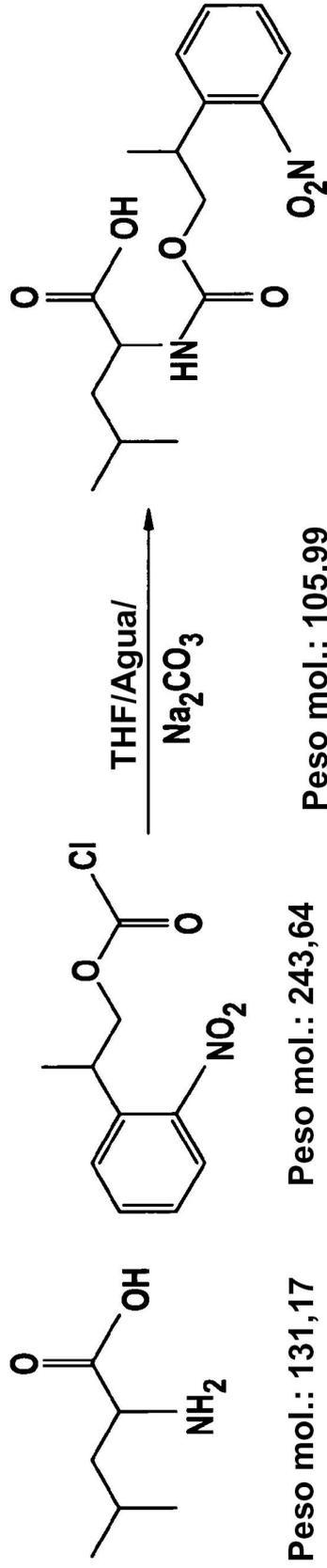
Peso mol.: 243,64

Peso mol.: 105,99

Peso mol.: 372,37

Fig. 1

## b) NPPOC-L-leucina



Peso mol.: 131,17

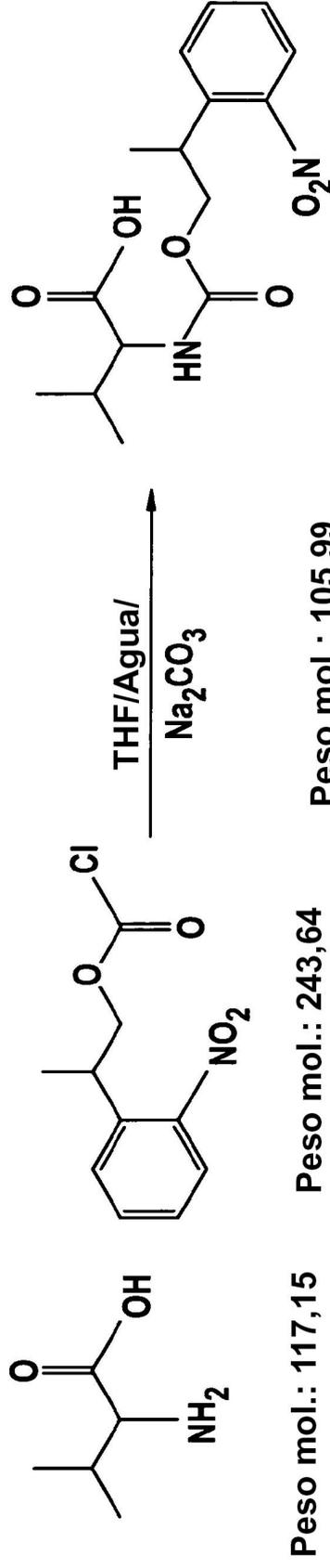
Peso mol.: 243,64

Peso mol.: 105,99

Peso mol.: 338,36

**Fig. 1**

**c) NPPOC-L-valina**



Peso mol.: 117,15

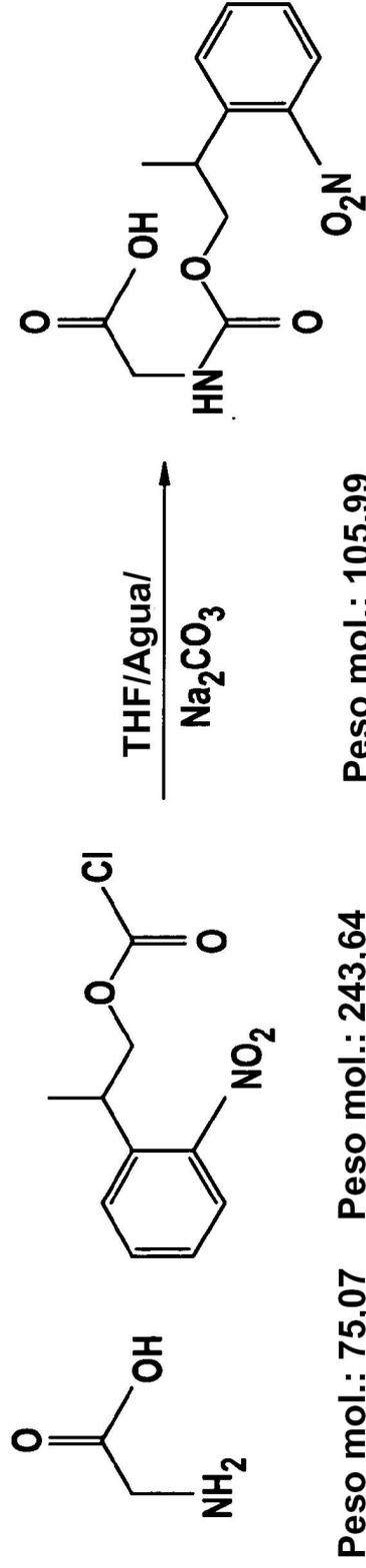
Peso mol.: 243,64

Peso mol.: 105,99

Peso mol.: 324,33

**Fig. 2**

**a) NPPOC-L-glicina**



Peso mol.: 75,07

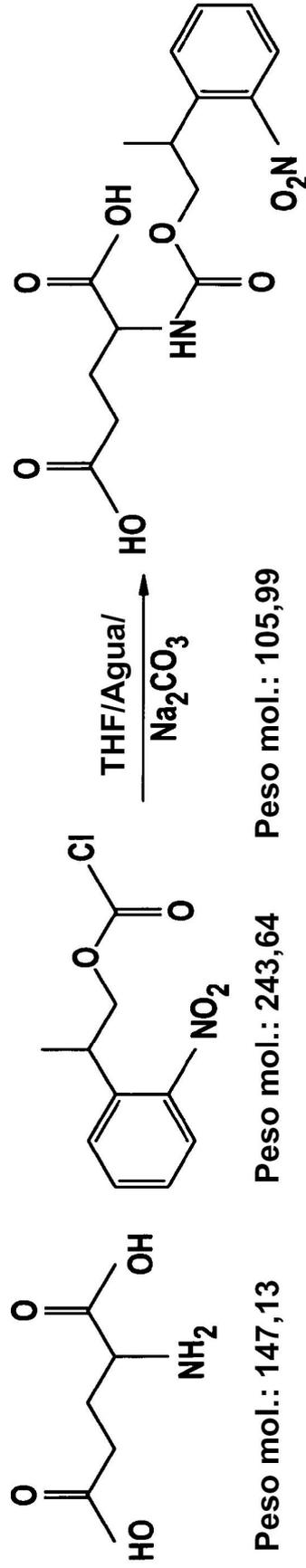
Peso mol.: 243,64

Peso mol.: 105,99

Peso mol.: 282,25

Fig. 2

## b) Ácido NPPOC-L-glutámico



Peso mol.: 147,13

Peso mol.: 243,64

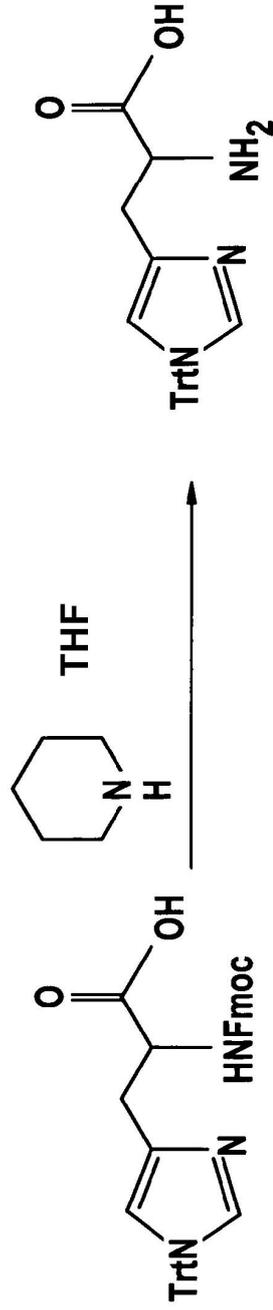
Peso mol.: 105,99

Peso mol.: 354,31

Fig. 2

c) NPPOC-(1-tritil)-L-histidina

Etapa 1:

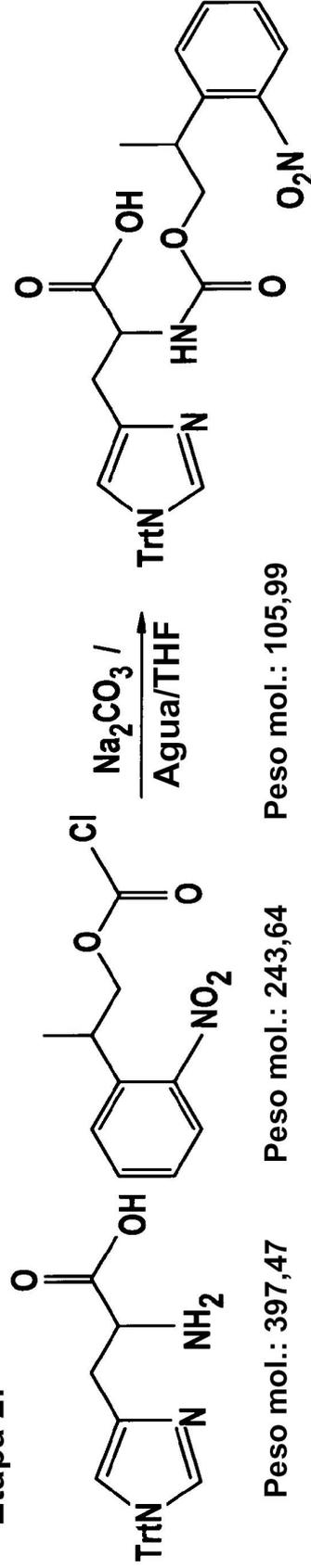


Peso mol.: 619,71

Peso mol.: 85,15

Peso mol.: 397,47

Etapa 2:



Peso mol.: 397,47

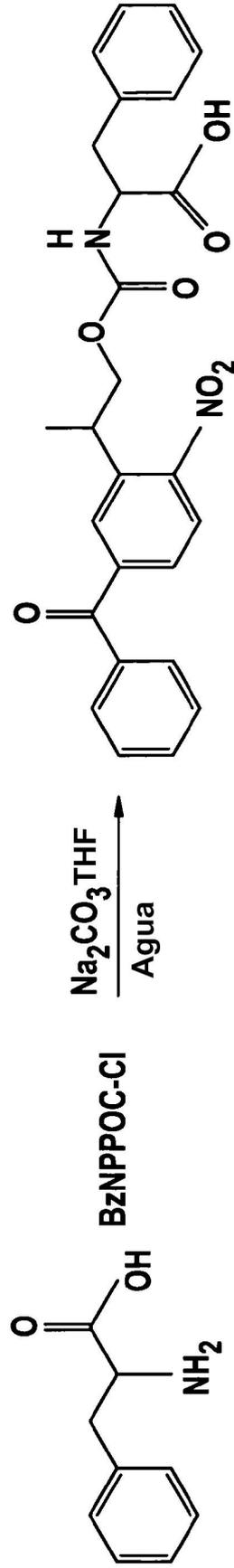
Peso mol.: 243,64

Peso mol.: 105,99

Peso mol.: 604,65

Fig. 3

## a) Benzoil-NPPOC-fenilalanina

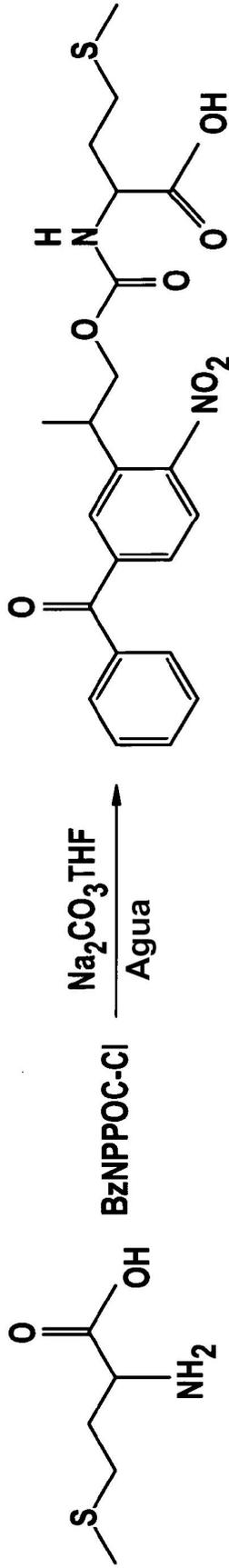


Peso mol.: 165,19    Peso mol.: 347,75    Peso mol.: 105,99

Peso mol.: 476,48

Fig. 3

## b) BzNPPOC-L-metionina

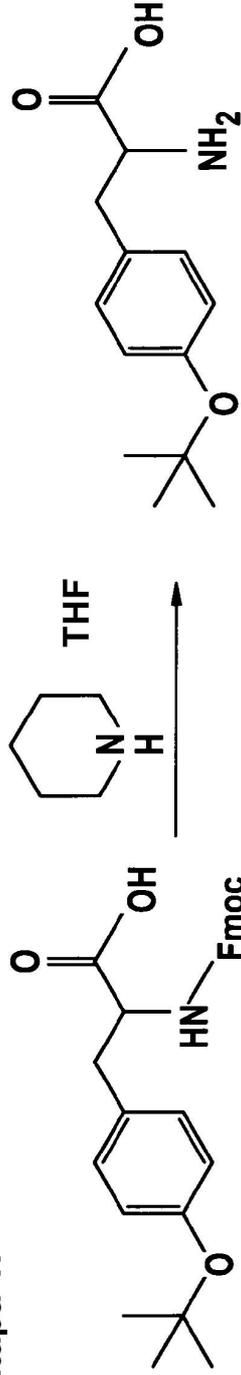


Peso mol.: 149,21    Peso mol.: 347,75    Peso mol.: 105,99

Peso mol.: 460,50

**c) Benzoil-NPPOC-(t-Bu)-L-tirosina** **Fig. 3**

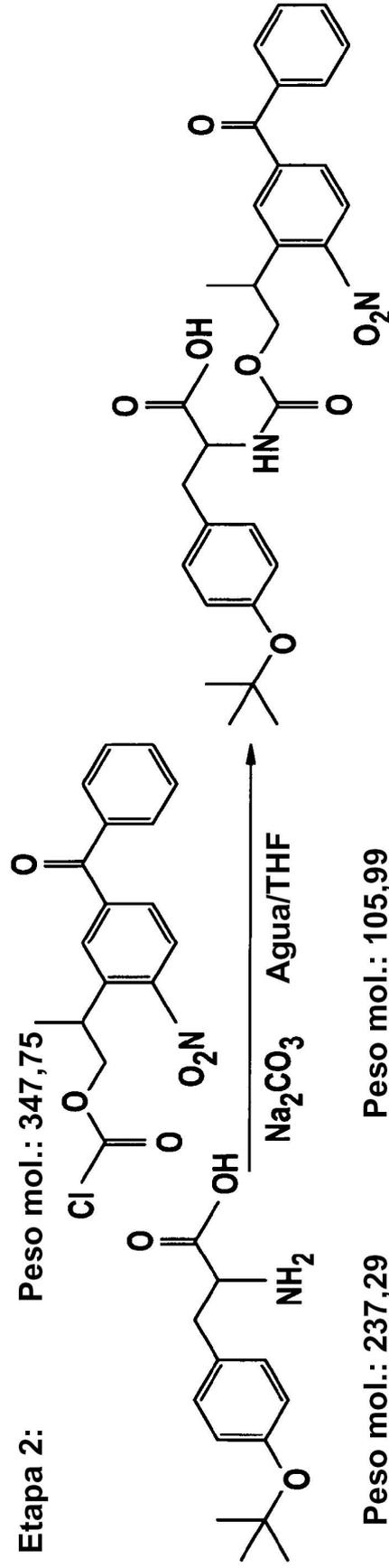
**Etapa 1:**



**Peso mol.: 459,53**

**Peso mol.: 237,29**

**Etapa 2:**



**Peso mol.: 237,29**

**Peso mol.: 105,99**

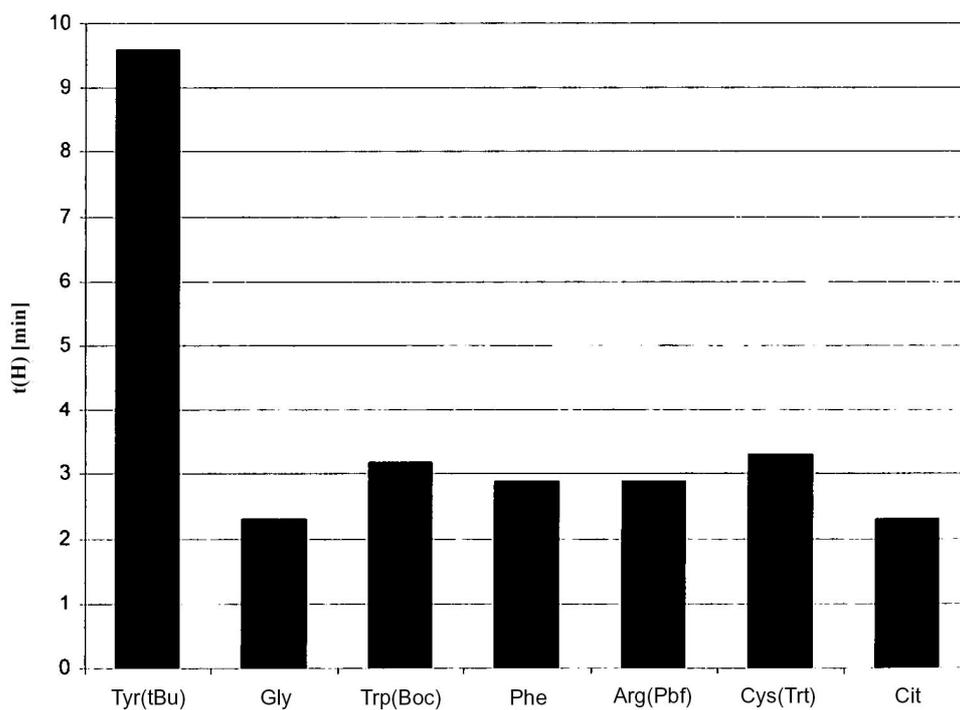
**Peso mol.: 548,58**

**Fig. 4**

a)

Aminoácido	Semivida [min]	Longitud de onda	Tiempo de exposición
NPPOC-Tyr(t-Bu)-OH	9,6	365 nm	2, 4, 6, 8, 10 min
NPPOC-Gly-OH	2,6	365 nm	
NPPOC-Trp(Boc)-OH	3,2	365 nm	
NPPOC-L-Phe-OH	2,9	365 nm	
NPPOC-Arg(Pbf)-OH	2,9	365 nm	
NPPOC-Cys(Trt)-OH	3,3	365 nm	
NPPOC-Cit-OH	2,3	365 nm	

b)



**Fig. 5**

a)

Aminoácido	Semivida [min]	Longitud de onda	Tiempo de exposición
BzNPPOC-Tyr(t-Bu)-OH:	2,7	365 nm	2, 4, 6 , 8, 10 min
BzNPPOC-Cys(Trt)-OH	1,8	365 nm	
BzNPPOC-Cit-OH	2,4	365 nm	

b)

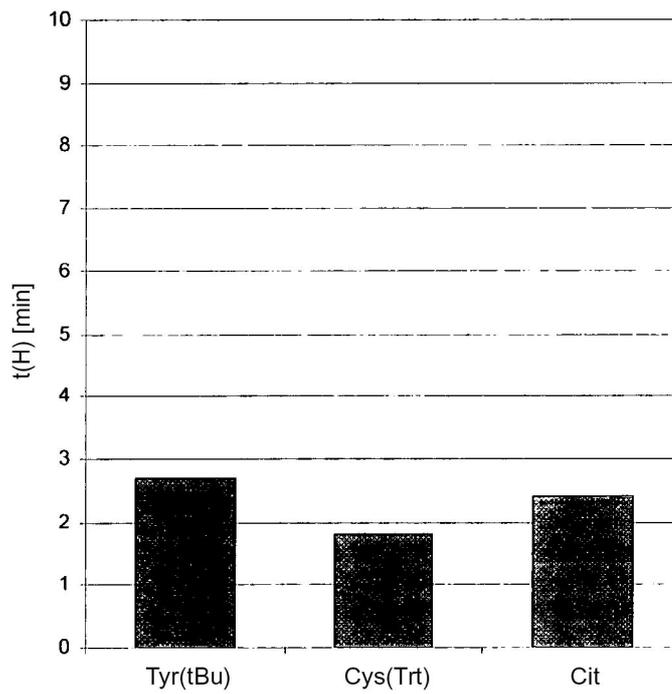


Fig. 6

Anticuerpo	Epítipo(s) tentativo(s)		
HPA007244	QAVASIAGGIRNGYD	ITSENVAERFGIS	
HPA006198	GCTGVQTAIEGNSLG	QMPIIIAGNDQQ	
HPA005552	SRPTPSDMAIV		
HPA001399	SLLPGHVQAYQEAVK	HTLEDQALYN	
HPA000525	NDLIERIQVDAY		
HPA008333	SVLQNGGREMMLVTSGAV		
HPA005554	LDAAVTFGPS		
HPA010793	WGEDDDIAT		
HPA001328	FRDGGSTTGLSATPPA		
HPA001198	KHMTRSQAELLLK		
HPA005992	RRRRFRDMETIGFA		
HPA002384	FWEGDFHRDMEALNVLV		
HPA001223	ERDGLKPGDTI	ILQQCDGKLDMLV	
HPA001254	QGQAIDDLMPAQK		
HPA008835	GKNKQSLDAVE		
HPA001566	SVGMIAGGTGIT	AIMKDPDDHTV	MIQYAACLPLNDH
HPA000793	WTSFLSGVNI		
HPA006461	GLKMVVPGLDGAQI		
HPA007641	MQTQQMLLNKEEAV		
HPA006148	EDGGIRRIQTRGE		
HPA000237	HISPAKALLQDK	DPLGKQGYQLRQGD	IGGPRSYTIAVA
HPA004701	HPCRQPDPT		
HPA001249	ATQCISDGKLNIGHT		
HPA003494	WWKAQSLTTGQEG	RQLLAPGNT	
HPA006723	CNPDDMARDLEQ		

Figura 6 (cont.)

HPA001334	SFVPWQPRFMIHMCPS	KEVFGIKNSNE	RYSWDCSPLSMFRRH
HPA001231	NTERTIYVRDPTS		
HPA008247	WPESASSPPV		
HPA001240	DGGLRHWRQLNP	EPRDGIPEGHI	
HPA000704	NSINTEEVIN		
HPA008467	LSTLGIVFQG	PISSCDTGMANCERT	IKPDGVQRGLVGE
HPA001303	QKLQDIQRAMELLSACQ		
HPA007308	TTGGSGSMYS	LTYIGHTPADARI	LFDLNFQAGFLMKK
HPA000571	LQERAVLGANDP	TAIRPHGIFGRDPQLVP	
HPA001788	SGSSQGRNSPAPAVT	NAATKIPTPIGVK	
HPA006314	ISDGPVSALINGFDTPEERYQ	YDEKRSQANGAGA	
HPA006277	SLDSLPAVREFLE	QRDTVPIKGTLSQLGRWMSEEDFEK	FPGCMKGRMTMYVIPFSM
HPA002645	GSNYWRNRVMMVAK		
HPA003230	PTLKIFRDGEEAGAYDGPRTADGIVSHLKKQAGPASVPLRTEEEFKKFISDKDASIVGFFDDSFSEAHSLKAASNLRDNYRFAHTM		
HPA003982	TLCKPAPLTGTLEV	DSRPPFLSRPA	LYSRSGSLSG
HPA006782	PETRTVAVKQLGVNPSTTG	LVNGLHPLTLRWEET	QPDTPPGTPLVQDE
HPA002947	LEPMAAKAWDKESI		
HPA003049	KFDWTFEQTVETAIT		
HPA006700	QTEARDLVERCMRVL		
HPA007981	DPHQRLTAKQVLQHPWVTQKD	QLKPIESSILQRRVRKLPSTTL	
HPA002867	SCAMNINGGNTLACTR	TNLNKVSKIYPLPH	VPDLSNFYAQ
HPA001401	PVQGIINFEQKESNGPVKWSIKGL	EFGDNTAGCTSAGPHFN	
HPA003323	IGLDTTIMMRSIPL	GFDQQMSSMV	DSTTKEDTGT
HPA005993	KQTIGNSCGT	DGHLYELDGRMPFPV	
HPA004769	TQSKEAFAIGL	VARMIEALD	SMDSFYKVLTEQ
HPA000660	SAKRHLAEQFAVGEIITD	KVESDNGPLFTELK	NGKSYRFMIMDRFGSDLQK
HPA006988	SETFEKSRLYLQDKS		

**Fig. 7**

