

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 954**

51 Int. Cl.:

C07F 9/24 (2006.01)

C07F 9/6561 (2006.01)

C07H 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2013 PCT/EP2013/070148**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14053397**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2013 E 13766980 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2914607**

54 Título: **Moléculas conectoras fotoescindibles con esqueleto de diarilsulfuro para la síntesis transitoria de bioconjugados**

30 Prioridad:

04.10.2012 EP 12187286

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

07.03.2018

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)
1910 Innovation Park Drive
Tucson AZ 85755, US**

72 Inventor/es:

STENGELE, NIKOLAUS-PETER

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 657 954 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

Moléculas conectoras fotoescindibles con esqueleto de diarilsulfuro para la síntesis transitoria de bioconjugados

5 **Antecedentes de la invención**

La presente descripción se refiere a compuestos fotoescindibles que se pueden usar como un conector fotoescindible para unir dos biomoléculas, tales como oligonucleótidos y péptidos. La presente descripción se refiere además a un procedimiento para la síntesis de dichos compuestos fotoescindibles.

10 Los compuestos fotoescindibles desempeñan un papel importante como grupos protectores en el bloqueo de grupos funcionales presentes en nucleósidos, nucleótidos, azúcares y aminoácidos, que se usan para la síntesis de biomoléculas, por ejemplo, ácidos nucleicos y sus derivados, proteínas, péptidos e hidratos de carbono. Dichos compuestos tienen la ventaja de que la desprotección del grupo funcional protegido se puede realizar simplemente por exposición a la luz. Por lo tanto, los compuestos fotoescindibles proporcionan la base para la síntesis de oligonucleótidos o péptidos, resuelta espacialmente, basada en fotolitografía sobre soportes sólidos, tales como micromatrices. El uso de compuestos fotolábiles para la síntesis de micromatrices es bien conocido (Pease, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 5022-5026), Hasan, et al. Tetrahedron 53 (1997) 4247-4264).

20 Los compuestos fotoescindibles también se pueden usar como moléculas conectoras fotoescindibles para unir diferentes elementos, tales como dos biomoléculas, una biomolécula y una fase sólida, una biomolécula y estreptavidina. Por ejemplo, dos oligonucleótidos diferentes se pueden conectar a través del compuesto fotoescindible para suministrar una molécula monocatenaria para un ensayo bioquímico o biológico que, tras la irradiación con luz, libera los dos oligonucleótidos individuales que luego pueden formar un ADN bicatenario y exhibir una función biológica. Otra posible aplicación es que un oligonucleótido se puede unir a una molécula de biotina mediante un compuesto fotoescindible tal que el oligonucleótido se pueda capturar mediante purificación por afinidad, por ejemplo, mediante perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina de un ensayo y, en segundo lugar, se puede liberar de la resina de afinidad mediante irradiación con luz.

30 Otra posible aplicación más es que la estructura de oligonucleótido-compuesto fotoescindible-biotina antes mencionada puede ser útil en purificaciones o ensayos de *pull-down*, cuando el oligonucleótido es un aptámero que se une a proteínas.

35 Los elementos, que están conectados de forma fotoescindible por los compuestos mencionados anteriormente, se pueden separar uno del otro simplemente mediante la exposición a la luz. Dichos componentes son bien conocidos (Olejnik, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7590-7594; Olejnik, et al. Nucleic Acids Res. 26 (1998) 3572-3576; Olejnik, et al. Nucleic Acids Res. 27 (1999) 4626-4631).

40 Stengele et al. (Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids, 24(5-7):891-896, 2005) demuestran el desarrollo de monómeros de fosforamidita fotoprotectidos para la síntesis dirigida por luz de micromatrices de oligonucleótidos. Los monómeros son derivados de xantona que comprenden un resto nucleósido-3'-fosforamidito. El documento EP 1 589 024 A1 se refiere a derivados de nucleósidos que tienen un esqueleto de antraceno y grupos protectores fotolábiles que se pueden usar para la síntesis fotolitográfica de chips de ácido nucleicos. El documento WO 2004/074300 divulga compuestos nucleosídicos y nucleotídicos con grupos protectores fotolábiles para la síntesis dirigida por luz de oligonucleótidos, en la que el grupo protector fotolábil tiene un esqueleto 2-(2-nitrofenil)etoxicarbonilo y está unido al grupo 5'- o 3'-hidroxilo de un resto nucleósido.

50 El principal inconveniente de los compuestos fotoescindibles descritos en la técnica es que se debe usar luz en el intervalo de UV cercano (365 nm o inferior) para escindir los enlaces covalentes con el fin de escindir el compuesto fotoescindible. Las fuentes de luz que son adecuadas para generar dicha longitud de onda son, por ejemplo, lámparas de arco de mercurio, láseres exciméricos, LED de UV y láseres de estado sólido de frecuencia multiplicada. Dichas fuentes de luz se caracterizan por altos costes de adquisición, proporcionan una potencia lumínica limitada y tienen una vida útil corta que da lugar a altos costes globales de funcionamiento. Dado que algunas de las fuentes de luz mencionadas anteriormente contienen sustancias peligrosas, por ejemplo, mercurio, son necesarias medidas apropiadas para garantizar la seguridad en el trabajo y la eliminación adecuada, lo que aumenta aún más los costes.

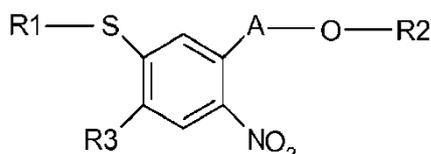
55 Algunas de las fuentes de luz mencionadas anteriormente producen un amplio espectro de longitudes de onda, por ejemplo, las lámparas de arco de mercurio emiten luz desde el intervalo UV hasta el IR, y ambos tienen efectos desfavorables si se usan en el contexto de biomoléculas. La luz UV, por ejemplo, puede ser absorbida por el ADN sintetizado, lo que da lugar a roturas al azar dentro de la cadena por escisión radical de la cadena principal de fosfato, oxidación de la base de guanina y posterior rotura de cadena o fotodimerización, especialmente de bases de timina. Además, la luz ultravioleta también puede dar lugar a la destrucción de ciertos aminoácidos, tales como el triptófano por oxidación radical o la cisteína y la metionina por oxidación del azufre. Como resultado, los experimentos que implican biomoléculas están influenciados por el uso de dicha luz UV para la escisión de los compuestos fotoescindibles. Por el contrario, la luz IR da lugar al calentamiento del equipo experimental, que también influye en los resultados de los experimentos.

El objeto de la presente descripción es, por lo tanto, la provisión de compuestos fotoescindibles que no muestren los inconvenientes mencionados anteriormente.

5 Breve descripción de la invención

La presente descripción se refiere a un compuesto fotoescindible que se puede usar como un conector fotoescindible para unir dos biomoléculas, tales como oligonucleótidos y péptidos. Tras la radiación con luz visible, el conector se escinde, liberando así las dos biomoléculas. Más precisamente, la presente descripción se refiere a un compuesto fotoescindible de la fórmula

[Fórmula 1]



en la que A es $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2-$, y R3 es H, un grupo metilo o un grupo etilo, y O-R2 es un fosoramidito, H-fosfonato, fosfato diéster o fosfato triéster, en el que, cuando O-R2 es un fosfato diéster de la fórmula $-\text{OP}(\text{O})-(\text{OR}_4)-(\text{OH})$, R4 es alquilo o alquilo sustituido o un nucleósido o un oligonucleótido, y en el que, cuando O-R2 es un fosfato triéster de la fórmula $-\text{OP}(\text{O})-(\text{OR}_4)-(\text{OR}_5)$, R4 y R5 son cada uno alquilo o alquilo sustituido o un nucleósido o un oligonucleótido o juntos forman un resto internucleotídico de un oligonucleótido, y R1 es una amida fenilcarboxílica, en el que un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en 4,4'-dimetoxitritil-oxi-alquil-, trifluoroacetil-amino-alquil-, alquilamido-biotina y hapteno se une a través del grupo amino a la amida fenilcarboxílica.

La presente descripción se refiere además a un procedimiento para preparar un compuesto fotoescindible como se describe anteriormente que comprende las etapas de a) provisión de p-dietilbenceno como material de partida, b) bromación del anillo de fenilo, c) nitración del compuesto obtenido en ácido nítrico y sulfúrico en la posición *para* al bromo, d) purificación y cristalización, e) hidroximetilación del compuesto en la posición bencílica, f) conversión del grupo bromo aromático en el arilsulfuro usando tiofenol sustituido, g) purificación, h) conversión del alcohol en clorocarbonato, i) reacción del clorocarbonato con un nucleósido y reacción del nucleósido con un agente de fosfitilación, o reacción del clorocarbonato con un derivado de aminoácido.

30 Figuras

Fig. 1: La figura muestra una amidita espaciadora fotoescindible como un bloque de construcción para la síntesis de oligonucleótidos.

Fig. 2: La figura muestra una amidita modificadora de amino fotoescindible como un bloque de construcción para la síntesis de oligonucleótidos.

Fig. 3: La figura muestra una amidita modificadora de biotina fotoescindible como un bloque de construcción para la síntesis de oligonucleótidos.

Fig. 4: La figura muestra dos oligonucleótidos a modo de ejemplo unidos por un conector fotoescindible e indicación del sitio de escisión tras la irradiación con luz.

45 Descripción detallada de la invención

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

La letra A del grupo $-\text{A}-\text{O}-$ representa un «conector de fragmentación» que comprende de 1 a 2 átomos conectados de forma lineal y covalente, tales como metileno o etileno. El término «conector de fragmentación» se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a un resto que se usa como un resto en fotoquímica que efectúa la fisión inducida por la luz del compuesto fotoescindible transformando el fotoproceso primario en una reacción de escisión química.

El término «alquilo» denota un grupo hidrocarburo saturado lineal o ramificado monovalente de 1 a 12 átomos de carbono. En modos de realización particulares, el alquilo tiene de 1 a 7 átomos de carbono y, en modos de realización más particulares, de 1 a 4 átomos de carbono. Ejemplos de alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo o *terc*-butilo.

El término «amino» denota un grupo de la fórmula -NR'R" en la que R' y R" son independientemente hidrógeno, alquilo, alcoxi, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo. Alternativamente, R' y R", junto con el nitrógeno al que están unidos, pueden formar un heterocicloalquilo. El término «amino primario» denota un grupo en el que tanto R' como R" son hidrógeno. El término «amino secundario» denota un grupo en el que R' es hidrógeno y R" no lo es. El término «amino terciario» denota un grupo en el que tanto R' como R" no son hidrógeno. Las aminas secundarias y terciarias particulares son metilamina, etilamina, propilamina, isopropilamina, fenilamina, bencilamina dimetilamina, dietilamina, dipropilamina y diisopropilamina.

El término «arilo» designa un sistema de anillo mono- o bicíclico carbocíclico aromático monovalente que comprende 6 a 10 átomos de carbono en el anillo. Ejemplos de restos arilo incluyen fenilo y naftilo.

El término «biomolécula» se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a cualquier molécula orgánica que es producida por un organismo vivo o a cualquier derivado producido artificialmente de dichos compuestos, incluyendo moléculas poliméricas grandes tales como proteínas, polisacáridos, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y oligonucleótidos, así como moléculas pequeñas como metabolitos primarios, metabolitos secundarios y productos naturales.

El término «grupo funcional» se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a cualquiera de numerosas combinaciones de átomos que forman parte de moléculas químicas, que experimentan reacciones características por sí mismas y que influyen en la reactividad del resto de la molécula. Los grupos funcionales típicos son hidroxilo, carboxilo, aldehído, carbonilo, amino, azida, alquínilo, tiol y nitrilo.

El término «heteroarilo» denota un sistema de anillo mono- o bicíclico heterocíclico aromático monovalente de 5 a 12 átomos en el anillo, que comprende 1, 2, 3 o 4 heteroátomos seleccionados entre N, O y S, siendo carbonos los restantes átomos del anillo. Ejemplos de restos heteroarilo incluyen pirrolilo, furanilo, tienilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, triazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, tetrazolilo, piridinilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, triazinilo, azepinilo, diazepinilo, isoxazolilo, benzofuranilo, isotiazolilo, benzotienilo, indolilo, isoindolilo, isobenzofuranilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, benzoisoxazolilo, benzotiazolilo, benzoisotiazolilo, benzooxadiazolilo, benzotiadiazolilo, benzotriazolilo, purinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinazolinilo o quinoxalinilo.

El término «resto internucleotídico» se utiliza en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a cualquier átomo o molécula unidos covalentemente, que forman un puente entre dos nucleósidos. Un resto internucleotídico típico en el ADN es un resto fosfodiéster.

Los términos «ácido nucleico» o «polinucleótido» se pueden usar de manera intercambiable y se refieren a un polímero que se puede corresponder con un polímero de ácido nucleico de ribosa (ARN) o ácido nucleico de desoxirribosa (ADN), o un análogo de los mismos. Esto incluye polímeros de nucleótidos, tales como ARN y ADN, así como formas sintéticas, formas modificadas (por ejemplo, modificadas química o bioquímicamente) de los mismos y polímeros mixtos (por ejemplo, que incluyen tanto subunidades de ADN como de ARN). Las modificaciones ejemplares incluyen metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos y similares), restos pendientes (por ejemplo, polipéptidos), intercalantes (por ejemplo, acridina, soraleno y similares), quelantes, alquilantes y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa y similares). También se incluyen moléculas sintéticas que imitan a los polinucleótidos en su capacidad para unirse a una secuencia designada por medio de enlaces de hidrógeno y otras interacciones químicas. Típicamente, los monómeros de nucleótido se enlazan por medio de enlaces fosfodiéster, aunque las formas sintéticas de ácidos nucleicos pueden comprender otros enlaces (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos como se describe en Nielsen, et al., Science 254 (1991) 1497-1500). Por ejemplo, un ácido nucleico puede ser o puede incluir un cromosoma o segmento cromosómico, un vector (por ejemplo, un vector de expresión), un casete de expresión, un polímero de ARN o ADN no marcado, el producto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un oligonucleótido, una sonda y un cebador. Por ejemplo, un ácido nucleico puede ser monocatenario, bicatenario o tricatenario y no está limitado a ninguna longitud particular. A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácidos nucleicos particular comprende o codifica secuencias complementarias, además de cualquier secuencia indicada explícitamente.

El término «nucleósido» se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a moléculas con un resto de base que contiene nitrógeno, tal como purina o pirimidina, en el que el resto de base está unido a una pentosa, tal como desoxirribosa, ribosa, arabinosa, xilosa o lixosa, o en el que el resto de base está unido a un resto de azúcar de hexosa. Las bases típicas de purina o pirimidina que forman nucleósidos incluyen adenina, guanina, citosina, timina, 5-metil citosina y uracilo.

El término «oligonucleótido» se refiere en general a una secuencia de ácido nucleico típicamente diseñada para ser ADN monocatenario y de menos de 75 nucleótidos de longitud.

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

El término «fosforamidita» se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a un nucleósido unido mediante un resto hidroxilo de azúcar a un fósforo de valencia (III), que a su vez está unido por un oxígeno a un grupo protector, como beta-cianoetoxi-, y a un nitrógeno dialquilado.

El término «fotoescindible» se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a un grupo que tiene enlaces específicos que se pueden escindir por irradiación a longitudes de onda específicas. El término «compuesto fotoescindible» se refiere a un compuesto que contiene un resto que se disocia en dos o más moléculas independientes tras la irradiación, en particular, la irradiación con luz.

El término «grupo protector» designa el grupo que bloquea selectivamente un sitio reactivo en un compuesto multifuncional de modo que una reacción química se pueda llevar a cabo selectivamente en otro sitio reactivo no protegido en el significado convencionalmente asociado a él en química sintética. Los grupos protectores se pueden eliminar en el momento apropiado. Grupos protectores ejemplares son grupos protectores de amino, grupos protectores de carboxilo o grupos protectores de hidroxilo.

Los grupos protectores fotolábiles del estado de la técnica de acuerdo con la descripción incluyen, pero no se limitan a, 2-nitrobenzoxicarbonil- (NBOC), 2-nitrofenil-etiloxicarbonilo (NPEOC), 2-(3,4-metilendioxi-2-nitrofenil)-propiloxicarbonilo (MeNPPOC), 2-(3,4-metilendioxi-2-nitrofenil)-oxicarbonilo (MeNPOC), 2-(2-nitrofenil)-propiloxicarbonilo (NPPOC), dimetoxi-benzo-inilil-oxicarbonilo (DMBOC), 2-(2-nitrofenil)-etilsulfonilo (NPES), (2-nitrofenil)-propilsulfonilo (NPPS) y similares.

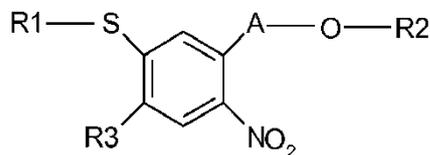
El término «saturado», en el contexto de la definición del término grupo de enlace, se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a un grupo de enlace en el que todos los miembros del grupo están conectados a los átomos adyacentes respectivos a través de enlaces simples. Por consiguiente, una cadena hidrocarbonada saturada se representa por la fórmula $-(CH_2)_n-$ siendo n un número entero que varía de 1 a 2.

El término «soporte sólido» se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a cualquier material inorgánico u orgánico insoluble y rígido o semirrígido que tenga un área superficial grande a la que se puedan unir moléculas orgánicas de superficie mediante la formación de enlaces o que se puedan absorber a través de interacciones electrónicas o estáticas, tal como a través de la formación de enlaces a través de un grupo funcional.

El término «sustituido» denota que un grupo específico tiene uno o más sustituyentes. Cuando cualquier grupo puede portar múltiples sustituyentes y se proporciona una variedad de posibles sustituyentes, los sustituyentes se seleccionan independientemente y no es necesario que sean los mismos. El término «no sustituido» significa que el grupo especificado no lleva sustituyentes. El término «opcionalmente sustituido» significa que el grupo especificado no está sustituido o está sustituido con uno o más sustituyentes, independientemente elegidos entre el grupo de posibles sustituyentes. Cuando se indica el número de sustituyentes, el término «uno o más» significa desde un sustituyente hasta el número más alto posible de sustitución, es decir, desde la sustitución de un hidrógeno hasta la sustitución de todos los hidrógenos por sustituyentes.

La presente descripción se refiere a compuestos fotoescindibles de la fórmula

[Fórmula 1]



en la que A es $-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, $-CH(CH_3)-CH_2-$, y R3 es H, un grupo metilo o un grupo etilo, y O-R2 es un fosforamidito, H-fosfonato, fosfato diéster o fosfato triéster, en el que, cuando O-R2 es un fosfato diéster de la fórmula $-OP(O)-(OR_4)-(OH)$, R4 es alquilo o alquilo sustituido o un nucleósido o un oligonucleótido, y en el que, cuando O-R2 es un fosfato triéster de la fórmula $-OP(O)-(OR_4)-(OR_5)$, R4 y R5 son cada uno alquilo o alquilo sustituido o un nucleósido o un oligonucleótido o juntos forman un resto internucleotídico de un oligonucleótido, y R1 es una amida fenilcarboxílica, en el que un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en 4,4'-dimetoxitritil-oxi-alquil-, trifluoroacetil-amino-alquil-, alquilamido-biotina y hapteno se une a través del grupo amino a la amida fenilcarboxílica.

En un modo de realización, el grupo funcional se selecciona del grupo que consiste en 4,4'-dimetoxitritil-oxi-alquil-, trifluoroacetil-amino-alquil-, alquilamido-biotina y hapteno.

En un modo de realización, A es $-CH(CH_3)-CH_2-$. En un modo de realización, R3 es un grupo etilo. En un modo de realización, O-R2 es una fosforamidita.

En otro modo de realización, una primera molécula se une al grupo funcional y una segunda molécula se une a la fosforamidita. La primera molécula se puede unir al grupo funcional a través de un grupo amino-alquilo o un grupo oxi-alquilo. La segunda molécula se puede unir a la fosforamidita por síntesis estándar de oligonucleótidos.

En otro modo de realización más, la primera molécula y la segunda molécula pueden ser cualquier biomolécula. En un modo de realización, la primera y la segunda moléculas se seleccionan independientemente del grupo que consiste en proteínas, péptidos, polisacáridos, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, metabolitos primarios, metabolitos secundarios y productos naturales. En un modo de realización específico, la primera y la segunda moléculas se seleccionan independientemente del grupo que consiste en péptidos y oligonucleótidos. En otro modo de realización, la primera molécula es ADN y la segunda molécula es ADN. En otro modo de realización, la primera molécula es un péptido y la segunda molécula es ADN, o viceversa.

El compuesto fotoescindible de acuerdo con la descripción se puede escindir usando luz visible en un intervalo de 375 nm a 420 nm. En un modo de realización específico, la luz visible se usa en el intervalo de 390 a 405 nm. En un modo de realización más específico, la luz visible se usa a 390 nm o 405 nm, respectivamente. Ambas longitudes de onda se pueden generar usando fuentes de luz que son mucho menos costosas en comparación con las fuentes de luz necesarias para realizar la desprotección en el intervalo de UV cercano a aproximadamente 365 nm. En un modo de realización se usan láseres de estado sólido dentro del intervalo de 375 nm a 420 nm, especialmente a 390 nm y 405 nm, como fuentes de luz para realizar la reacción de escisión de acuerdo con la descripción. En un modo de realización más específico, se usan LED (diodos emisores de luz) con emisión suficiente dentro del intervalo de 375 nm a 420 nm, especialmente a 390 nm y 405 nm, como fuentes de luz para realizar la reacción de escisión de acuerdo con la descripción. Especialmente los LED son productos de bajo coste, ya que se producen en grandes cantidades, por ejemplo, para su uso en reproductores Blu-ray.

Dentro de la reacción de escisión del compuesto fotoescindible de acuerdo con la descripción, pueden estar presentes agentes estabilizantes conocidos por el experto, que aumentan la eficacia de la reacción de escisión y suprimen las reacciones secundarias de los radicales generados por la luz. Como agentes estabilizantes se puede usar una combinación de una base y un compuesto reductor, tal como Imidazol, Hidroxilamina, Benzalacetona y similares.

En un modo de realización específico, el grupo funcional se selecciona del grupo que consiste en 4,4'-dimetoxitritil-oxi-alquil-, trifluoroacetil-amino-alquil- y alquilamido-biotina, A es $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$, R3 es un grupo etilo, R2 es una fosforamidita, una primera molécula está unida al grupo funcional y una segunda molécula está unida a la fosforamidita, en el que la primera y la segunda moléculas se seleccionan independientemente del grupo que consiste en péptidos y oligonucleótidos y en el que la reacción de escisión se puede realizar a una longitud de onda de 375 nm a 420 nm.

En un modo de realización se puede usar una amidita espaciadora fotoescindible como se representa en la Fig. 1 para extender un oligonucleótido en su extremo 5' durante la síntesis química de oligonucleótidos. Posteriormente, el grupo DMT se elimina mediante procedimientos estándar en la síntesis de oligonucleótidos y se puede sintetizar un segundo oligonucleótido en el grupo OH libre, obteniendo al final de la síntesis un oligonucleótido como se muestra en la Fig. 4, en el que el compuesto fotoescindible está presente y puede ser escindido por la luz en la posición indicada por la flecha.

En un modo de realización, el compuesto como se muestra en la Fig. 2 liberará un oligonucleótido con un grupo 5'-amino libre que se puede acoplar, por ejemplo, a un péptido o un anticuerpo para realizar un ensayo conocido como «Inmuno-PCR», que luego se puede escindir fotolíticamente en el oligonucleótido y el anticuerpo, por ejemplo, para un análisis de multiplexación basado en matriz. Además, la inmovilización de anticuerpos o proteínas dirigida por ADN se puede realizar de manera fotorreversible.

En un modo de realización, el compuesto como se muestra en la Fig. 3 se puede usar para procedimientos en los que se utilizan oligonucleótidos similares a aptámeros portadores de una molécula de biotina a través de un conector fotoescindible para purificar la proteína diana apropiada de una muestra biológica compleja, como una estrategia de enriquecimiento de muestra, cuando los complejos aptámero-proteína capturados son escindidos por la luz de la matriz de afinidad.

La presente descripción se refiere además a un procedimiento para preparar un compuesto fotoescindible como se describe anteriormente que comprende las etapas de a) provisión de p-dietilbenceno como material de partida, b) bromación del anillo de fenilo, c) nitración del compuesto obtenido en ácido nítrico y sulfúrico en la posición *para* al bromo, d) purificación y cristalización, e) hidroximetilación del compuesto en la posición bencílica, f) conversión del grupo bromo aromático en el arilsulfuro usando tiofenol sustituido, g) purificación, h) conversión del alcohol en clorocarbonato, i) reacción del clorocarbonato con un nucleósido y reacción del nucleósido con un agente de fosfitilación, o reacción del clorocarbonato con un derivado de aminoácido.

En un modo de realización, A es $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$. En un modo de realización, R3 es un grupo etilo. En un modo de realización, O-R2 es una fosforamidita.

En un modo de realización, el grupo funcional se selecciona del grupo que consiste en 4,4'-dimetoxitritil-oxi-alkil-, trifluoroacetil-amino-alkil-, alquilamido-biotina y hapteno.

Ejemplo 1:

5 Síntesis de una amidita espaciadora fotoescindible como un bloque de construcción para la síntesis de oligonucleótidos

10 Se calientan a reflujo 231 g de 2,5-dietil-4-nitrobenceno (0,895 mol), 106,2 g de ácido tiosalicílico (0,688 mol) y 285 g de carbonato de potasio (2,064 mol) en 1,2 l de dimetilformamida (DMF) durante 1 h. Después, el DMF se destila a vacío, el residuo se diluye con agua hasta un volumen total de 3,5 l y se extrae 6 veces con 0,5 l con hexano/acetato de etilo 1:1. El residuo acuoso se ajusta a pH 6,0 con HCl diluido y se extrae dos veces con 0,5 l de acetato de etilo, que se combinan y se lavan con 1 l de agua. El acetato de etilo se elimina en un rotavapor, el residuo se disuelve en diclorometano y se purifica por cromatografía en columna sobre sílice / diclorometano.

15 Rendimiento: 173,1 g (76 %) de espuma rojiza amorfa después de la evaporación (P3-ácido).

20 Se calientan 173 g de P3-ácido (0,522 mol), 59 g de paraformaldehído (0,652 mol) y 437 g de tritón B (40 % en MeOH = 1,044 mol) a 90 °C en 1,4 l de DMSO durante 2 h. Después de enfriar, se añaden 0,2 l de ácido acético y 6 l de agua. Se extrae con 1 l de diclorometano, se lava dos veces con 0,2 l de agua y se evapora a vacío. El residuo sólido cristaliza al dejarlo reposar, se tritura en un poco diclorometano y se filtra con succión.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO):

25 13,32 ppm (s, 1H, COOH); 7,95 ppm (dd, 1H, Ar-H tiosalicilo); 7,83 ppm (s, 1H, Ar-H nitroaromát.); 7,56 ppm (s, 1H, Ar-H nitroaromát.); 7,46-7,38 ppm (m, 1H, Ar-H tiosalicilo); 7,32-7,25 ppm (m, 1H, Ar-H tiosalicilo); 6,73 ppm (d, 1H, Ar-H tiosalicilo); 4,75 ppm (s, 1H, OH); 3,44 ppm (d, 2H, Ar-C(CH₃)H-CH₂-OH); 3,26-3,11 ppm (m, 1H, Ar-C(CH₃)H-CH₂-OH); 2,68 ppm (q, 2H, CH₂ de Ar-Et); 1,19-1,08 ppm (m, 6H, 2 x CH₃)

30 Rendimiento: 82 g (43 %) de cristales amarillentos (P3-ácido-alcohol)

35 Se agitan 16,0 g de P3-ácido-alcohol (44,3 mmol), 16,0 g de t-BdMS-Cl (106 mmol) y 14,5 g de *N*-metilimidazol (177 mol) a temperatura ambiente (TA) en 0,1 l de diclorometano durante la noche. La mezcla se extrae 3 veces con 0,4 l de agua cada vez y se evapora. El residuo sólido se disuelve en 0,2 l de metanol, se añaden 16 g de carbonato de potasio y se agita durante 90 min a 40 °C. Aproximadamente el 70 % del metanol se elimina a vacío, se añaden 0,2 l de agua, se acidifica con ácido cítrico a aproximadamente pH 2,0 y se extrae con acetato de etilo. Los extractos se lavan con agua y se evaporan para dar un aceite de color parduzco claro (22,7 g; 108 %, P3-ácido-(tBdMS-éter) que se usa en la etapa siguiente sin purificación y caracterización adicionales.

40 Se disuelven 4,9 g de P3-ácido-(tBdMS-éter) en 30 ml de diclorometano y se cargan con 2,2 g de *N*-etil-*N'*-dietilaminopropil-carbodiimida*HCl y se agitan durante 45 minutos a TA. Se añade una solución de 4,9 g de *O*-dimetoxitritil-1-amino-6-hexanol en 15 ml de diclorometano y se mantiene la agitación durante la noche. La mezcla se lava con agua, el residuo orgánico se extrae dos veces con solución sat. de NaCl/agua y se evapora a vacío.

45 El residuo se purifica por cromatografía en columna (sílice, gradiente diclorometano-metanol) y se evapora para producir una espuma amarilla.

4,4 g (50 %) de espaciador fotoescindible protegido con tBdMS

50 ¹H-RMN (300 MHz, DMSO):

55 8,39 ppm (t, 1H, amid-H); 7,72 ppm (s, 1H, Ar-H nitroaromát.); 7,55-7,47 ppm (m, 1H, Ar-H); 7,40-7,32 ppm (m, 4H, Ar-H); 7,30-7,16 (m, 9H, Ar-H); 7,08-7,02 ppm (m, 1H, Ar-H); 6,90-6,82 ppm (m, 4H, Ar-H); 3,72 ppm (s, 6H, 2 x metoxi de DMT); 3,59-3,46 ppm (m, 2H, Ar-C(CH₃)H-CH₂-OTBDMS); 3,33-3,24 ppm (m, 1H, Ar-C(CH₃)H-CH₂-OTBDMS); 3,25-3,14 ppm (m, 2H, RCH₂-O-DMT); 2,97-2,91 ppm (m, 2H, RCH₂-NH-CO-R'); 2,67 ppm (q, 2H, CH₂ de Ar-Et); 1,56-1,20 ppm (m, 8H, 4 x CH₂ «Mittelteil Hexyl»); 1,12-1,04 ppm (m, 6H, CH₃ de Ar-Et + Ar-C(CH₃)H-CH₂-OTBDMS); 0,71 ppm (s, 9H, t-Bu de TBDMS); 0,14 ppm (d, 6H, Si(CH₃)₂ de TBDMS).

60 La eliminación del grupo tBdMS se lleva a cabo agitando en una mezcla de 3 g de TBAF*3xH₂O en 30 ml de THF durante 1 h a TA.

La mezcla se lavó con una solución de bicarbonato de sodio, se evaporó a vacío y se purificó por cromatografía en columna (sílice, gradiente diclorometano-metanol al 2 %) y se evaporó para producir una espuma amarilla.

65 Rendimiento: 2,9 g (76 %) de alcohol espaciador fotoescindible

¹H-RMN (300 MHz, DMSO):

8,33 ppm (t, 1H, amid-H); 7,71 ppm (s, 1H, Ar-H nitroaromát.); 7,53-7,46 ppm (m, 1H, Ar-H); 7,44-7,33 ppm (m, 4H, Ar-H); 7,33-7,11 ppm (m, 10H, Ar-H); 6,92-6,84 ppm (m, 4H, Ar-H); 4,74 ppm (t, 1H, R-OH); 3,73 ppm (s, 6H, 2 x metoxi de DMT); 3,35- 3,31 ppm (m, 2H, Ar-C(CH₃)H-CH₂-OH); 3,25-3,11 ppm (m, 3H, R-CH₂-O-DMT + Ar-C(CH₃)H-CH₂-OH); 2,98-2,90 ppm (m, 2H, R-CH₂-NH-CO-R'); 2,67 ppm (q, 2H, CH₂ de Ar-Et); 1,56-1,18 ppm (m, 8H, 4 x CH₂ parte central de hexilo); 1,13 ppm (t, 3H, CH₃ de Ar-Et); 1,03 ppm (d, 3H, Ar-C(CH₃)H-CH₂-OH)

Se disuelven 2,9 g de alcohol espaciador fotoescindible en 30 ml de diclorometano seco y se cargan con 0,68 g de cianoetil-tetraisopropil-fosforodiamidita y 0,22 g de dicianoimidazol y se agitan durante la noche en atmósfera de argón.

La mezcla de reacción se diluyó con hexanos hasta que permaneció una ligera turbidez y se purificó mediante cromatografía en columna (sílice, gradiente hexanos-acetato de etilo 4:1 a 1:1) y se evaporó para producir una espuma amarilla.

Rendimiento: 0,95 g (25 %) de amidita espaciadora fotoescindible de la Figura 1

HPLC: 92,4 % puro

¹H-RMN (300 MHz, DMSO):

8,38 ppm (m, 1H, amid-H); 7,74 ppm (s, 1H, Ar-H nitroaromát.); 7,54-7,46 ppm (m, 1H, Ar-H); 7,40-7,16 ppm (m, 12H, Ar-H); 7,12-7,00 ppm (m, 1H, Ar-H); 6,92-6,82 ppm (m, 4H, Ar-H); 3,72 ppm (s, 6H, 2 x metoxi de DMT); 3,68-3,34 ppm (m, 7H, Ar-C(CH₃)H-CH₂-OPA + Ar-C(CH₃)H-CH₂-OH + 2 x CH₂ de cianoetilo); 3,24-3,14 ppm (m, 2H, R-CH₂-O-DMT); 2,97-2,90 ppm (m, 2H, R-CH₂-NH-CO-R'); 2,73-2,61 ppm (m, 4H, CH₂ de Ar-Et + 2 x CH de iso-propilo); 1,57-1,39 ppm (m, 4H, 2 x CH₂ parte central de hexilo); 1,39-1,21 ppm (m, 4H, 2 x CH₂ parte central de hexilo); 1,21-0,90 ppm (m, 18H, 6 x CH₃).

³¹P-RMN (121,53 MHz, DMSO):

143,76 ppm; 143,24 ppm.

Ejemplo 2:

Síntesis del compuesto de la Fig. 2: amidita modificadora de amino fotoescindible

De manera similar, el modificador de amino fotoescindible se preparó a partir de P3-ácido-(tBdMS-éter) y *N*-trifluoroacetil-1,6-diaminohexano para producir el compuesto del título con un rendimiento global del 12 % (4 etapas).

Ejemplo 3:

Síntesis del compuesto de la Fig. 3: amidita modificadora de biotina fotoescindible

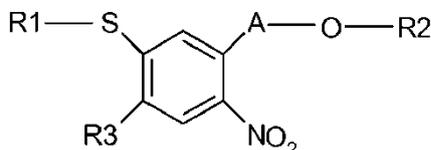
De manera similar, el modificador de biotina fotoescindible se preparó a partir de P3-ácido-(tBdMS-éter) y *N*-dimetoxitritil-biotin-6-aminocaproilamida para producir el compuesto del título con un rendimiento global del 9 % (4 etapas).

50

REIVINDICACIONES

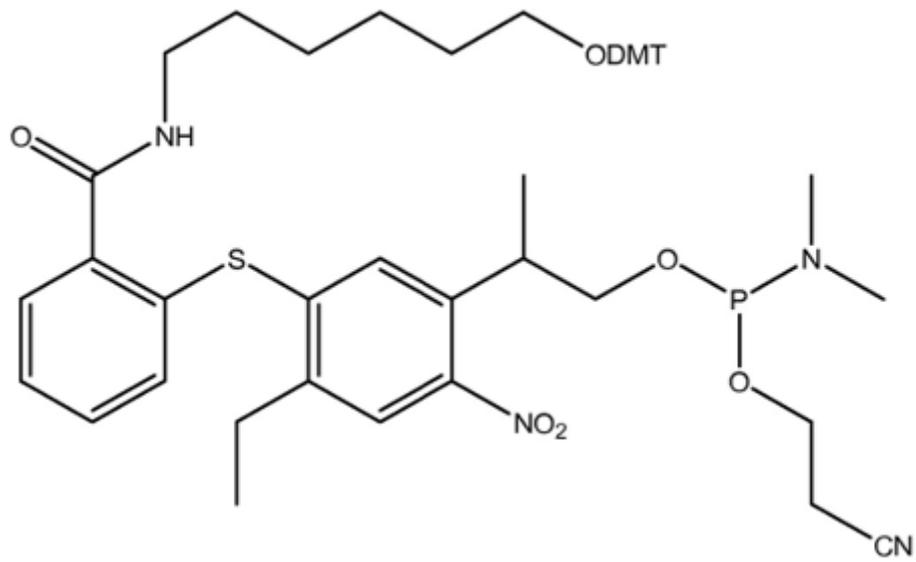
1. Un compuesto fotoescindible de la fórmula

[Fórmula 1]



- 5
- en el que A es -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH(CH₃)- o -CH(CH₃)-CH₂-,
- R3 es H, un grupo metilo o un grupo etilo,
- 10 O-R2 es un fosforamidito, H-fosfonato, fosfato diéster o fosfato triéster,
- en el que, cuando O-R2 es un fosfato diéster de la fórmula -O-P(O)-(OR4)-(OH), R4 es un alquilo o un nucleósido o un oligonucleótido, y
- 15 en el que, cuando O-R2 es un fosfato triéster de la fórmula -OP(O)-(OR4)-(OR5), R4 y R5 son cada uno alquilo o un nucleósido o un oligonucleótido o forman juntos un resto internucleotídico de un oligonucleótido,
- R1 es una amida fenilcarboxílica, y
- 20 en el que un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en 4,4'-dimetoxitritil-oxi-alquil-, trifluoroacetil-amino-alquil-, alquilamido-biotina y hapteno se une a través del grupo amino a la amida fenilcarboxílica.
- 25
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque A es -CH(CH₃)-CH₂-.
3. El compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque R3 es un grupo etilo.
4. El compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 3, caracterizado porque O-R2 es una fosforamidita.
- 30
5. El compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque una primera molécula se une al grupo funcional y una segunda molécula se une a la fosforamidita.
6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque la primera molécula y la segunda molécula se seleccionan independientemente del grupo que consiste en oligonucleótido y péptido.
- 35
7. El compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la escisión del compuesto fotoescindible se puede realizar a una longitud de onda de 375 nm a 420 nm.
- 40
8. Un procedimiento para preparar un compuesto fotoescindible de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende las etapas de
- a) provisión de p-dietilbenceno como material de partida
- b) bromación del anillo de fenilo
- c) nitración del compuesto obtenido en ácido nítrico y sulfúrico en la posición *para* al bromo
- 45 d) purificación y cristalización
- e) hidroximetilación del compuesto en la posición bencílica
- f) conversión del grupo bromo aromático en el arilsulfuro usando tiofenol sustituido
- g) purificación
- h) conversión del alcohol en clorocarbonato
- 50 i) reacción del clorocarbonato con un nucleósido y reacción del nucleósido con un agente de fosfitación, o reacción del clorocarbonato con un derivado de aminoácido.

FIG. 1



Masa mol.: 907,06

FIG. 2

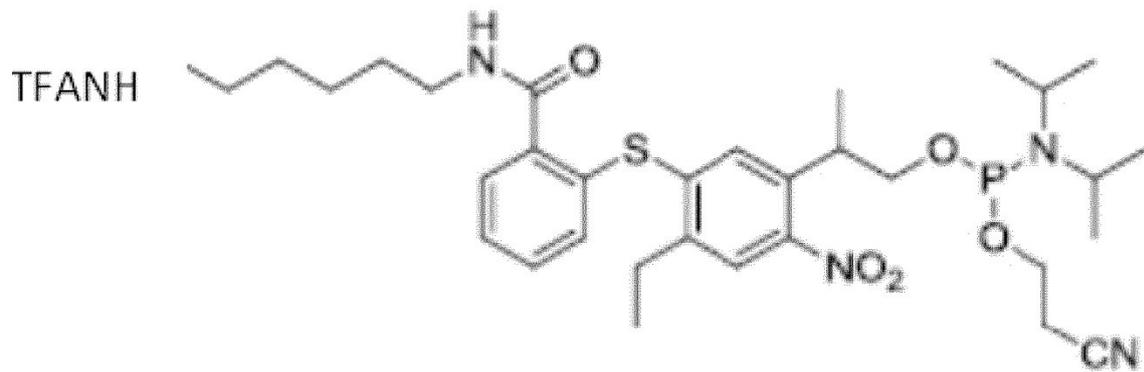
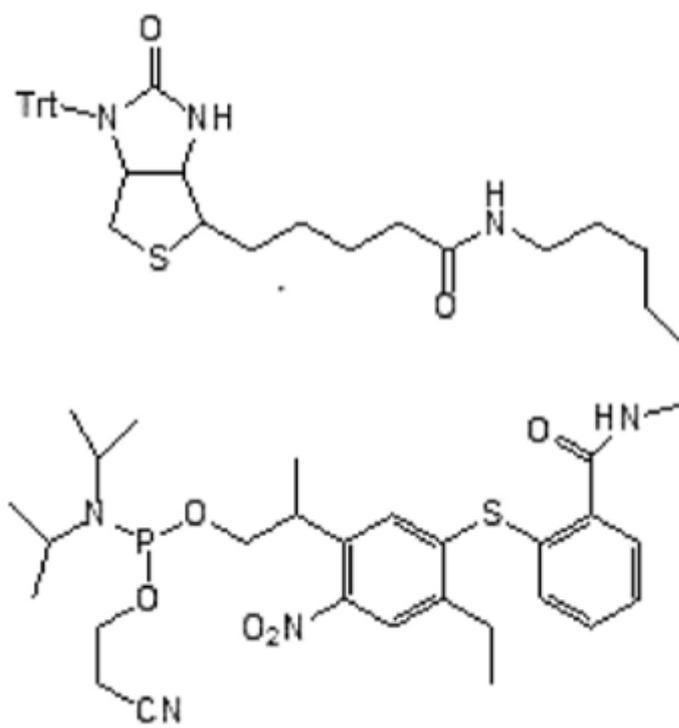


FIG. 3



Masa mol.: 1128,43

FIG. 4

