

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 004**

51 Int. Cl.:

G01N 33/483 (2006.01)

H01J 49/26 (2006.01)

G01N 27/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2011 PCT/IB2011/002547**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO12056300**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2011 E 11835703 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2633312**

54 Título: **Seguimiento en tiempo real de la síntesis de péptidos en fase sólida por espectrometría de masas**

30 Prioridad:

29.10.2010 US 408072 P

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

22.04.2019

73 Titular/es:

**SCINOPHARM TAIWAN LTD. (50.0%)
No. 1 Nan-ke 8th Road Tainan Southern Taiwan
Science Park Shan-hua Town
Tainan Hsien 74144, TW y
NATIONAL SUN YAT-SEN UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHANG, LI-CHIAO;
SHIEA, JENTAIE y
CHO, YI-TZU**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 710 004 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

Seguimiento en tiempo real de la síntesis de péptidos en fase sólida por espectrometría de masas

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación proporciona sistemas y métodos para llevar un seguimiento en tiempo real de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) en una atmósfera ambiente para caracterizar productos intermedios de péptido o productos en línea. La presente divulgación demuestra también la capacidad de dicho sistema de seguimiento en tiempo real para rastrear el proceso de las reacciones por etapas de la SPPS. Se divulga asimismo en el presente documento una placa de muestras para cargar la muestra sólida que puede influir en la estabilidad y la sensibilidad analítica de la espectrometría de masas de ionización por electroespray y por desorción con láser.

15 **Antecedentes de la invención**

La química combinatoria es una tecnología para crear simultáneamente y rastrear rápidamente un gran número de diferentes compuestos para identificar compuestos útiles. Dichas bibliotecas de péptidos pueden utilizarse para reconocer sustratos enzimáticos e inhibidores o células que se unen a péptidos. A diferencia de la vía de síntesis convencional de manejar un tipo de molécula cada vez, la química combinatoria es una importante herramienta para el descubrimiento de nuevos candidatos de fármacos, catalizadores y materiales. Hoy en día, varios cientos de fármacos a base de péptidos han entrado en fase clínica de análisis o están ya comercializados, ya que los péptidos se consideran fármacos candidatos muy potentes debido a su alta especificidad y su baja toxicidad. En consecuencia, ha aumentado también la demanda para la producción de péptidos en grandes cantidades y los métodos de síntesis química en los que se emplea química combinatoria desempeñan un importante papel.

Entre los diversos métodos de síntesis química, el método de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) descrito por primera vez por Merrifield en 1963 ha pasado a ser un importante hito para el desarrollo de la química combinatoria gracias a su procedimiento de reacción simplificado y las sencillas etapas de purificación/aislamiento para dar los productos diana. El primer aminoácido se une a un soporte insoluble que consiste en pasadores de plástico o resinas y se construye la secuencia deseada, etapa por etapa, a través de sucesivos acoplamientos de los aminoácidos apropiadamente protegidos. Las reacciones pueden completarse mediante el uso de un exceso de reactivos y repetidos lavados para purificación. La metodología da cabida a la preparación de péptidos automática basándose en técnicas químicas eficientes evitando procedimientos de purificación redundantes o que llevan tiempo. Como resultado, la síntesis de las bibliotecas combinatorias con el empleo de química en fase sólida se ha convertido en una estrategia de rutina en la práctica del descubrimiento de fármacos.

Sin embargo sigue existiendo una serie de inconvenientes asociados con el uso de la química en fase sólida, en particular, en su análisis. Si bien la espectrometría de masa puede ofrecer un análisis de alta producción para bibliotecas combinatorias, son demasiadas las moléculas que no tienen propiedades de ionización apropiadas como para que esta técnica sea universalmente aplicable. Por otra parte, el seguimiento online de la síntesis en varias etapas aplicando métodos espectroscópicos convencionales requiere la solubilización de la muestra en estudio que está desprovista de su soporte sólido. La determinación del compuesto se consigue normalmente por tanto al final de la síntesis, ya que es en esta etapa en la que se libera el péptido del soporte insoluble en solución. El hecho de utilizar dicha escisión y estrategia de análisis como medio de control de calidad y llevar un seguimiento de la reacción presenta varios inconvenientes. Este tipo de evaluación del compuesto en una etapa intermedia es destructivo, ya que se consumen las muestras. Es posible que tengan lugar reacciones secundarias con los reactivos de escisión durante esta etapa de escisión adicional, lo cual conlleva dificultades a la hora de determinar los productos peptídicos por EM (espectrometría de masas) debido a los complicados espectros de masas que se obtienen.

Método para llevar un seguimiento de una reacción química en fase sólida utilizando una construcción analítica de engarce dual basada en carbamato fotolábil de McKeown et al. ("A photolabile carbamate based dual linker analytical construct for facile monitoring of solid phase chemistry: 'TLC' for solid phase?", Tetrahedron Letters 40 (1999) 2407-2410). El método requiere una escisión ácida del sustrato para eliminar el engarce N-terc-butoxicarbonil-diaminopentano escindible con ácido.

En varios informes (Michael C. F. et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 6, 979-982, 1996; Stephen C. M. et al., Tetrahedron Letters, Vol. 40, 2407-2410, 1999) se ha demostrado que se podría utilizar el tiempo de vuelo con ionización-desorción con láser asistido por matriz con espectrometría de masas (MALDI-TOF) para analizar aminoácidos o péptidos Fmoc protegidos seleccionados unidos a una resina en fase sólida a través de un engarce fotolábil. Algunos artículos (Delphine M. et al., Journal of the American Society for Mass Spectrometry, Vol. 12, 1099-1105, 2001) han notificado que la espectrometría de masas de iones secundarios en tiempo de vuelo (TOF-S-SIMS) podría utilizarse para caracterizar analitos anclados en soportes sólidos en una sola etapa sin requerir el pretratamiento de la muestra. Sin embargo, la desorción e ionización tanto de MALDI-TOF como de TOF-S-SIMS debe realizarse en un sistema de alto vacío. El seguimiento de la síntesis de péptidos en fase sólida en tiempo real para el control de calidad de la síntesis no es posible con estos tipos de técnicas.

El desarrollo de un método de seguimiento online directo mínimamente destructivo o que no sea destructivo permitiría el seguimiento etapa a etapa de la síntesis de péptidos en fase sólida para un buen control de calidad. La presente divulgación proporciona dichos métodos y aborda algunas de las limitaciones que se han mencionado.

5 Breve resumen de la invención

La presente divulgación proporciona una realización de un método de seguimiento en tiempo real de SPPS utilizando un espectrómetro de masas. Se dispersan las muestras de síntesis en fase sólida en disolventes orgánicos seguido de la exposición a un haz de láser por pulsos para romper el enlace químico entre el péptido y el soporte sólido (por ejemplo una resina) y la exposición a un penacho de electroespray para ionización hacia el espectrómetro de masas (véase Figura 11). Los autores de la invención han observado que esta estrategia es aplicable, por ejemplo, a productos de péptidos conectados con resina para analizar directamente y con éxito moléculas de péptidos por espectrometría de masas sin ningún tratamiento previo de la muestra ni escisión con ácido.

15

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** proporciona un espectro de masas positivo de la muestra 1 dispersada en un disolvente orgánico (diclorometano). Las muestras en disolvente líquido expuestas a haz de láser de pulsos y capilar de electroespray para ionización y analizadas por una trampa de iones.

20

La **Figura 2** proporciona un espectro de masas positivo de la muestra 2 dispersada en un disolvente orgánico (diclorometano). Las muestras en disolvente líquido expuestas a haz de láser de pulsos y capilar de electroespray para ionización y analizadas por una trampa de iones.

25

La **Figura 3** proporciona un espectro de masas positivo de la muestra 3 (de-Fmoc 4 mero) dispersada en un disolvente orgánico (diclorometano). Las muestras en disolvente líquido expuestas a haz de láser de pulsos y capilar de electroespray para ionización y analizadas por una trampa de iones.

La **Figura 4** proporciona un espectro de masas positivo de la muestra 4 (5-mero) dispersada en un disolvente orgánico (diclorometano). Las muestras en disolvente líquido expuestas a haz de láser de pulsos y capilar de electroespray para ionización y analizadas por una trampa de iones.

30

La **Figura 5** proporciona un espectro de masas positivo de la muestra 5 (de-Fmoc 5-mero) dispersada en un disolvente orgánico (diclorometano). Las muestras en disolvente líquido expuestas a haz de láser de pulsos y capilar de electroespray para ionización y analizadas por una trampa de iones.

35

La **Figura 6** proporciona un espectro de masas positivo de la muestra 6 (6 mero) dispersada en un disolvente orgánico (diclorometano). Las muestras en disolvente líquido son expuestas a haz de láser de pulsos y capilar de electroespray para ionización y analizadas por una trampa de iones.

40

La **Figura 7** proporciona un espectro de masas positivo de una muestra mixta (de-Fmoc 5-mero) y una muestra 4 (5-mero) de diferente relación de peso (1:9 3:7, 5:5, 7:3, 9:1, 95:5 y 99:1).

La **Figura 8** proporciona un gráfico de la relación de intensidad del porcentaje en peso de 5-mero/ de-Fmoc 5-mero frente a de-Fmoc 5-mero (a) 10 % ~ 99 %; (b) 30 % ~ 90 %; (c) 91 % ~ 99 %.

45

La **Figura 9** proporciona un espectro de masas de péptido de-Fmoc 4 mero (m/z 603,3) cargado sobre cuatro (4) materiales de placa de muestras, que incluyen (a) lámina de algodón, (b) politereftalato de etileno blanco, (c) acero y (d) politereftalato de etileno negro.

50

La **Figura 10** proporciona un espectro EIC de masas (cromatograma de iones extraído) en cuanto a la estabilidad del uso de diferentes materiales de placa de muestra utilizando péptido de 5-mero (m/z 972,5, línea roja) y péptido de de-Fmoc 5-mero (m/z 750,4, línea azul) en resina como ejemplos. (a) Placa de muestra de acero. (b) Politereftalato de etileno negro.

55

La **Figura 11** proporciona una ilustración de la presente divulgación en la que la muestra unida a soporte está mínimamente interrumpida con un haz de láser para proporcionar moléculas del producto de reacción que se pueden analizar en la corriente del emisor de ESI, utilizando un analizador de masas.

60

Descripción detallada de la invención

Una realización de la presente invención la presente divulgación proporciona un método de análisis vital para detectar directamente los péptidos sintetizados sobre un soporte sólido. En algunos aspectos, el soporte sólido es una resina. Las personas expertas en la materia apreciarán que son útiles diversos materiales de soporte en el proceso y con los sistemas que se describen en el presente documento, si bien son preferentes algunos soportes,

65

como por ejemplo, resinas de tereftalato. Salvo el uso de un disolvente orgánico para dispersar las muestras de péptidos-resina, no se requiere ningún otro pre-tratamiento de la muestra antes de la detección EM. Cuando se utilizan los métodos de análisis destructivos convencionales para caracterizar masas de compuestos sobre soportes sólidos, es necesaria la hidrólisis ácida o la escisión con ácido de las moléculas del péptido para separar las moléculas de la resina insoluble. En consecuencia, las reacciones secundarias, como el desbloqueo o la desprotección causan la formación de fragmentos adicionales en el sistema y la determinación de productos intermedios o los productos se hace confusa y difícil. A diferencia de estos métodos de liberación de ácido, puede obtenerse información del peso molecular de las moléculas de péptido intactas en este sistema de análisis directo reduciéndose asimismo en gran medida el consumo de la muestra. Por otra parte, esta estrategia permite el análisis en un entorno ambiente, que es más directo para el seguimiento en tiempo real de una reacción y el control de calidad que las técnicas que requieren un sistema con alto vacío. Este método de seguimiento online mínimamente destructivo y directo permite llevar un seguimiento en fase sólida del péptido, etapa por etapa, para un mejor control de calidad.

Se divulga en el presente documento un sistema para el seguimiento en tiempo real de una reacción química que comprende:

- a) una muestra;
- b) un depósito de intercambio de disolvente;
- c) una fuente de luz;
- b) una unidad de electroespray; y
- e) un espectrómetro de masas.

Si bien la naturaleza de la muestra que se presenta en el presente documento es para la síntesis de péptidos, los sistemas pueden emplearse para llevar el seguimiento de diversas estrategias de síntesis química que pueden tener lugar sobre soportes sólidos de manera gradual. Tal como se ha señalado, los sistemas descritos en el presente documento pueden proporcionar también un depósito de intercambio de disolvente para facilitar el contacto de la muestra con el disolvente y la fuente de luz (normalmente un láser). El disolvente es normalmente un disolvente de bajo punto de ebullición que no es reactivo en las condiciones del seguimiento en tiempo real. El depósito de intercambio de disolvente puede estar integrado en el sistema para la liberación automática de disolvente sobre la muestra (y soporte) o puede separarse del sistema de manera que se añada el disolvente manualmente a la muestra/soporte. La fuente de luz es normalmente un láser para proporcionar luz enfocada sobre el sitio de la muestra. Son útiles diversos láseres, incluyendo láser Nd-YAG (266-1064 nm, 20 Hz) como un Lotis-Tii LS-2130 con fuente de alimentación de alta tensión (0-30KV, 0-300 μ A, Spellman CZE100PN30) así como otras fuentes de luz de láser comparables. La unidad de electroespray y el espectrómetro de masas se describen más adelante (e incluyen modelos como espectrómetro de masas de trampa de iones Esquire 3000 plus de Bruker).

En el presente documento se divulga un método para el seguimiento en tiempo real de una reacción química mediante el uso de un espectrómetro de masas, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) proporcionar una muestra en un recipiente, o desde él, en el que tiene lugar la síntesis química;
- b) someter la muestra sintetizada a un disolvente orgánico;
- c) utilizar una fuente de luz para romper el enlace químico y transportar las moléculas del analito en un penacho de ionización de electroespray; y
- d) analizar el espectro de iones precursor de las moléculas del analito para determinar el peso molecular de los productos de síntesis.

En una realización, se proporciona un método de seguimiento en tiempo real de la síntesis de péptido en fase sólida mediante el uso de un espectrómetro de masas, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) proporcionar un péptido sobre una resina en un recipiente, o desde él, en el que tiene lugar la síntesis química;
- b) someter el péptido sintetizado sobre una placa, a un disolvente orgánico;
- c) utilizar una fuente de luz para romper el enlace químico y transportar las moléculas de analito en un penacho de ionización de electroespray; y
- d) analizar el espectro de iones precursor de las moléculas del analito para determinar el peso molecular de los productos de síntesis.

La reacción química se puede llevar a cabo en un reactor de síntesis química. Las reacciones químicas incluyen síntesis de péptido. En una de dichas realizaciones, la síntesis de péptido es una síntesis de péptido en fase sólida. Es posible emplear cualquier número de soportes sólidos, incluyendo resinas, como resinas a base de poliestireno y poliamida. Los péptidos se unen covalentemente a un soporte sólido, normalmente, en su extremo C-terminal a través de engarces como un ácido inestable y engarces fotolábiles. En algunas realizaciones, el engarce es un engarce inestable ácido. En otras realizaciones, el engarce es un engarce de título como por ejemplo un engarce de 2-clorotritilo. La síntesis de péptidos se lleva a cabo normalmente por acoplamiento de un aminoácido protegido con el extremo N-terminal de la muestra unida. El aminoácido protegido puede contener grupos protectores N-terminales

como grupos Boc (terc-butiloxicarbonilo) o Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonilo), así como grupos protectores de cadena lateral.

5 La muestra o el reactor de síntesis química, el depósito de intercambio de disolvente, la fuente de luz, la unidad de electroespray y el analizador espectrómetro de masas pueden formar un solo aparato. El reactor de síntesis química puede estar en comunicación fluida con el depósito de intercambio de disolvente. La cámara del reactor y el depósito de intercambio de disolvente puede ser el mismo, es decir, la cámara de reacción es también el depósito de intercambio de disolvente.

10 El depósito de intercambio de disolvente contiene un disolvente para su suministro a la cámara de reacción, de manera que la muestra entra en contacto con el disolvente antes de su exposición a la fuente de luz. En una realización, el disolvente es un disolvente orgánico, incluyendo disolventes orgánicos polares y no polares. El disolvente puede ser cloruro de metileno. En otros aspectos, el disolvente es un disolvente prótico polar como metanol. El disolvente puede estar sustancialmente desprovisto de matrices sólidas o moléculas orgánicas de bajo peso molecular cristalizables que tienen capacidad de sublimación y/o de transferencia de la carga a la muestra tras la exposición a la fuente de luz, como por ejemplo las matrices empleadas en MALDI (ionización por desorción con láser asistida con matriz). Estas matrices de bajo peso molecular incluyen aquellas que tienen pesos moleculares inferiores a 1000, 500, 400 o 300 gramos/mol e incluyen ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico), ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (alfa-ciano o matriz-alfa) y ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB).

20 La fuente de luz, unidad de electroespray, y el espectrómetro están todos próximos al reactor de síntesis química y entre sí. La fuente de luz está situada para suministrar luz a la cámara de reacción. La cámara de reacción puede estar localizada en el trayecto del penacho de electroespray generado por la unidad del electroespray. El penacho de electroespray puede pulverizarse a través de la cámara de reacción.

25 La fuente de luz puede ser un láser, como por ejemplo un láser por pulsos. El láser tiene la energía suficiente como para causar la escisión del (los) enlace(s) covalente(s) entre la muestra y el soporte sólido al que están unidos. Tras la escisión, se exponen las moléculas del analito resultante y son barridas hacia el penacho de ionización de electroespray que se origina desde la unidad de electroespray.

30 El término "unidad de electroespray" y "emisor de electroespray" se utilizan indistintamente en la presente solicitud. La unidad de electroespray puede adoptar cualquiera entre una serie de formas y puede presentarse en forma de una aguja o capilar. La unidad de electroespray es conductora y contiene un electrodo. El espectrómetro de masas que contiene un detector para la detección de masa iónica puede servir también como contra electrodo para establecer un campo de tensión en relación con la unidad de electroespray. El líquido del emisor se pulveriza hacia el espectrómetro de masas y se convierte en un penacho de ionización de electroespray que comprende gotitas monodispersadas. A diferencia de los métodos ESI (ionización por electroespray) convencionales, el líquido de electroespray de la presente solicitud antes de la pulverización está desprovisto de analitos y los analitos se incorporan únicamente tras la formación del penacho, lo cual ioniza y transporta el analito al espectrómetro de masas para su detección y posterior análisis.

40 Los sistemas, materiales y métodos divulgados en el presente documento se llevan a cabo a presión ambiente. El término presión ambiente, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la presión del aire natural que existe a una altura determinada, por ejemplo 760 mm Hg a nivel del mar.

45 Tal como se divulga en el presente documento, se proporciona una placa que entra en contacto con la muestra antes y durante la síntesis química. Alternativamente, es posible proporcionar la placa y ponerla en contacto con la muestra antes de exponer la muestra a la fuente de luz.

50 La placa puede ser una placa de poliéster. En algunos aspectos, se selecciona el poliéster entre acero y politereftalato de etileno. En otros aspectos el politereftalato de etileno es negro.

Ejemplos

55 Los siguientes ejemplos tienen como único fin ilustrar con mayor detalle no pretendiéndose que limiten la invención divulgada.

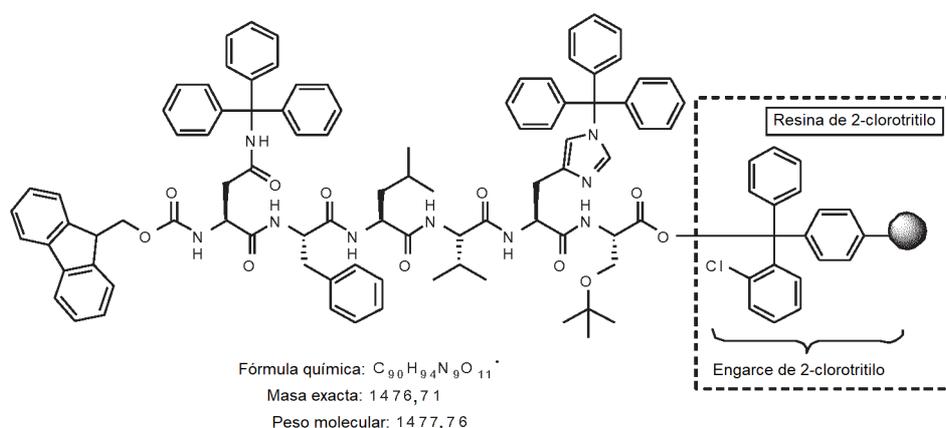
Ejemplo 1

60 Se llevó a cabo con éxito el análisis directo de seis productos de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) (muestra 1 a muestra 6) dispersada en disolventes orgánicos, aplicando desorción con láser o espectrometría de masas por ionización con electroespray sin ningún tratamiento previo de la muestra ni escisión con ácido. En la Figura 1 a Figura 6, se presentan los espectros de masa de las muestras de partículas, habiéndose sintetizado las cadenas de péptidos deseada etapa por etapa en una resina de soporte a través de un engarce utilizado comúnmente. Se caracterizaron fácilmente las moléculas de péptidos de síntesis gracias a los iones de molécula $[M+H]^+$ dominados en los correspondientes espectros.

Para demostrar la capacidad de este sistema de seguimiento en tiempo real para rastrear el proceso de las reacciones etapa por etapa de SPPS, se aplicó también a este sistema un ejemplo de simulación de la reacción por etapa de-Fmoc (desde la molécula pentámera a la molécula de-Fmoc pentámera). En la Figura 7 se muestran espectros de masas positivos de las muestras mezcladas, muestra 5 (de-Fmoc 5-mero) y muestra 4 (5-mero) en diferentes relaciones de peso (1:9, 3:7, 5:5, 7:3, 9:1, 95:5, and 99:1). Se aumenta la intensidad de de-Fmoc 5-mero (m/z 750,4) al mismo tiempo que disminuye la del 5-mero (m/z 972,5) de acuerdo con el aclarado del porcentaje en peso de de-Fmoc 5-mero en el de-Fmoc en peso de de-Fmoc 5-mero en diferentes intervalos. La Figura 8 es el gráfico de la relación de intensidad de de-Fmoc 5mero/5mero frente al porcentaje en peso de de-Fmoc 5-mero puede seguir rastreándose incluso aunque el porcentaje en peso del 5-mero sea inferior a 5% (es decir, el de-Fmoc 5mero está por encima de 95%). Esto indica que este sistema de detección puede servir efectivamente para llevar un seguimiento de reacciones SPPS y juzgar que se han completado las reacciones etapa por etapa.

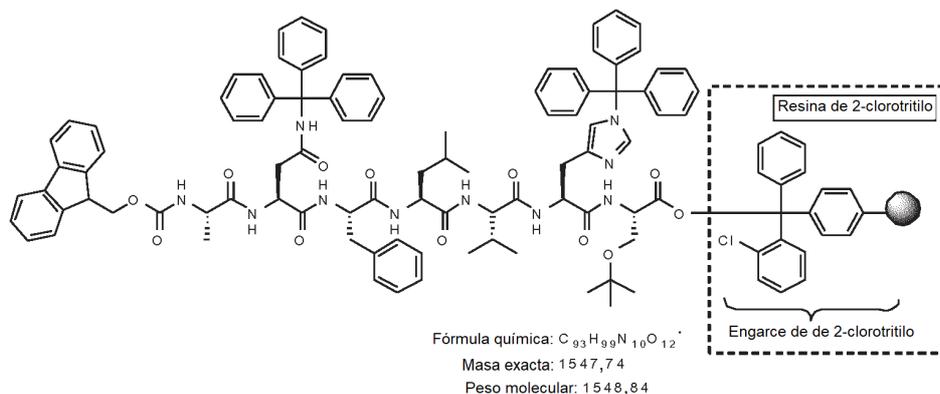
Muestra 1

15 Estructura:



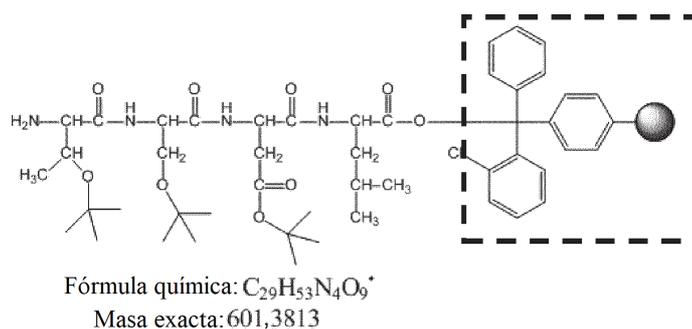
Muestra 2

20 Estructura:



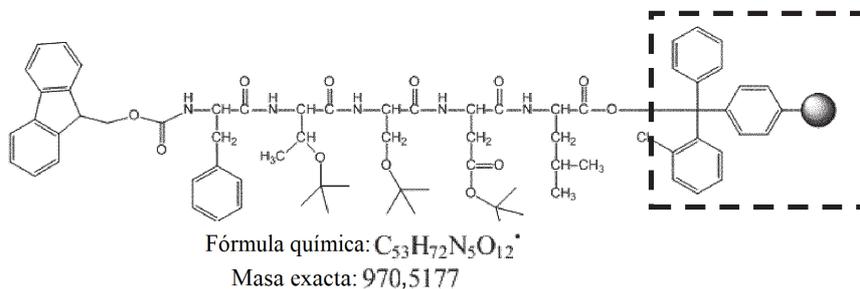
Muestra 3 (de-Fmoc 4-mero)

25 Estructura:



Muestra 4 (5-meros)

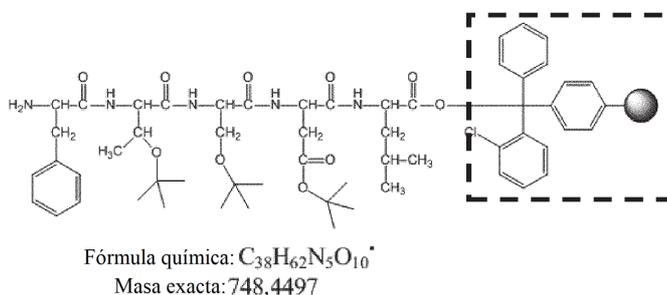
Estructura:



5

Muestra 5 (de-Fmoc 5-mero)

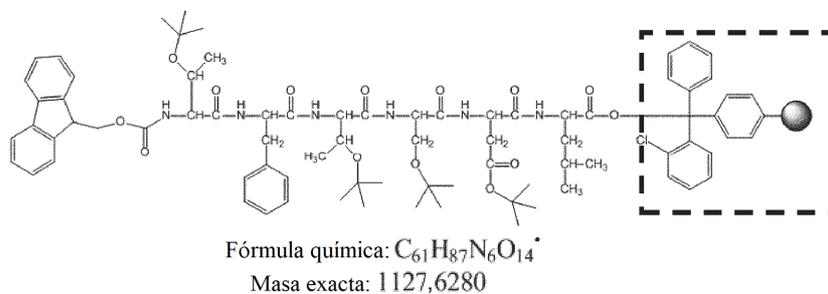
Estructura:



10

Muestra 6 (6-mero)

Estructura:



15

Ejemplo 2

Se observó que un material de placa de muestra utilizado para cargar la muestra sólida influye en la estabilidad analítica y la sensibilidad de espectrometría de masas por ionización con electroespray desorción con láser. En la figura 9 se presenta la utilización de la muestra 3 (de-Fmoc 4-mero, m/z 603,3) en el péptido de resina para demostrar las sensibilidades de cuatro (4) materiales de placa, incluyendo lámina de algodón, politereftalato de etileno blanco, acero y politereftalato de etileno negro. Los resultados demuestran que se observa una sensibilidad mayor cuando se carga la muestra sobre acero o politereftalato de etileno.

Por otra parte, se utilizan los péptidos de la muestra 4 (5-mero, m/z 972,5) y la muestra 5 (de-Fmoc 5-mero, m/z 750,4) para demostrar la estabilidad de análisis de acero y politereftalato de etileno negro. En la figura 10, la carga de muestra sobre politereftalato de etileno presenta una mayor estabilidad que la carga sobre acero según una triple repetición. Por lo tanto, el material de placa de la muestra puede influir en la sensibilidad y la estabilidad del análisis.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para llevar un seguimiento en tiempo real de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) utilizando un espectrómetro de masas, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 10 a) proporcionar una muestra sintetizada unida a un soporte de síntesis en fase sólida con un engarce de tritilo en un recipiente, o desde él, en donde tiene lugar la síntesis química;
- b) proporcionar una placa que está en contacto con la muestra sintetizada, en donde la placa se selecciona del grupo que consiste en una placa de acero y una placa de politereftalato de etileno negro;
- 15 c) someter la muestra sintetizada, en la placa, a un disolvente orgánico;
- d) utilizar una fuente de luz para romper el engarce de tritilo entre la muestra y el soporte y transportar las moléculas de analito a un penacho de ionización de electroespray; y
- e) analizar el espectro de iones precursor de las moléculas de analito para determinar el peso molecular de los productos de síntesis.
- 20 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el disolvente orgánico se selecciona entre diclorometano o metanol.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el disolvente orgánico es diclorometano.
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho engarce tritilo es un engarce 2-clorotritilo.
- 25 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la placa de la etapa (b) está en contacto con la muestra antes y durante la síntesis de péptido en fase sólida.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde se proporciona la placa de la etapa (b) transfiriendo la muestra a la placa antes de la exposición de la muestra a la fuente de luz.
- 30 7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el seguimiento en tiempo real de la síntesis de péptido en fase sólida, en donde la muestra sintetizada es un péptido y el soporte de síntesis en fase sólida es una resina.

Figura 1

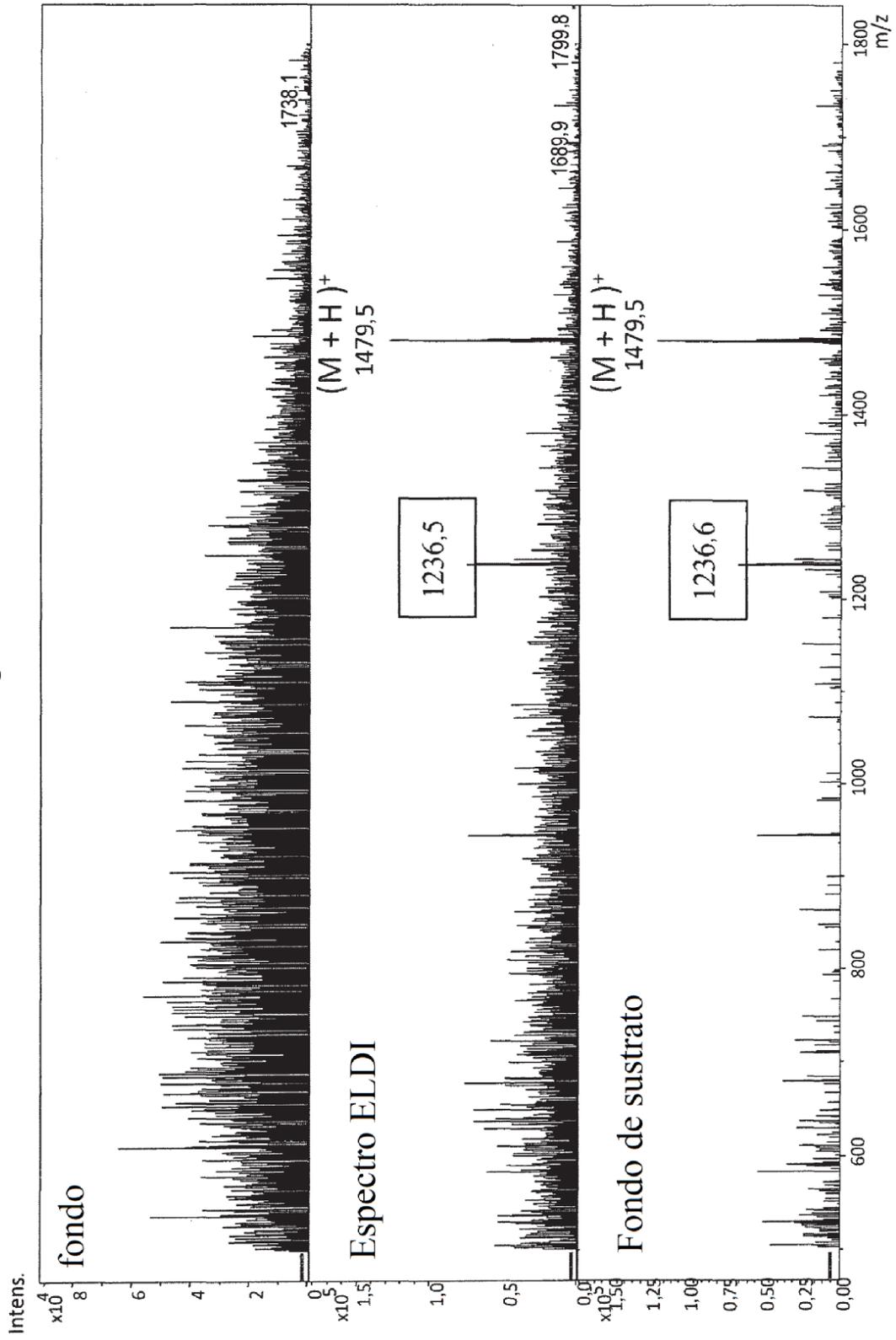


Figura 2

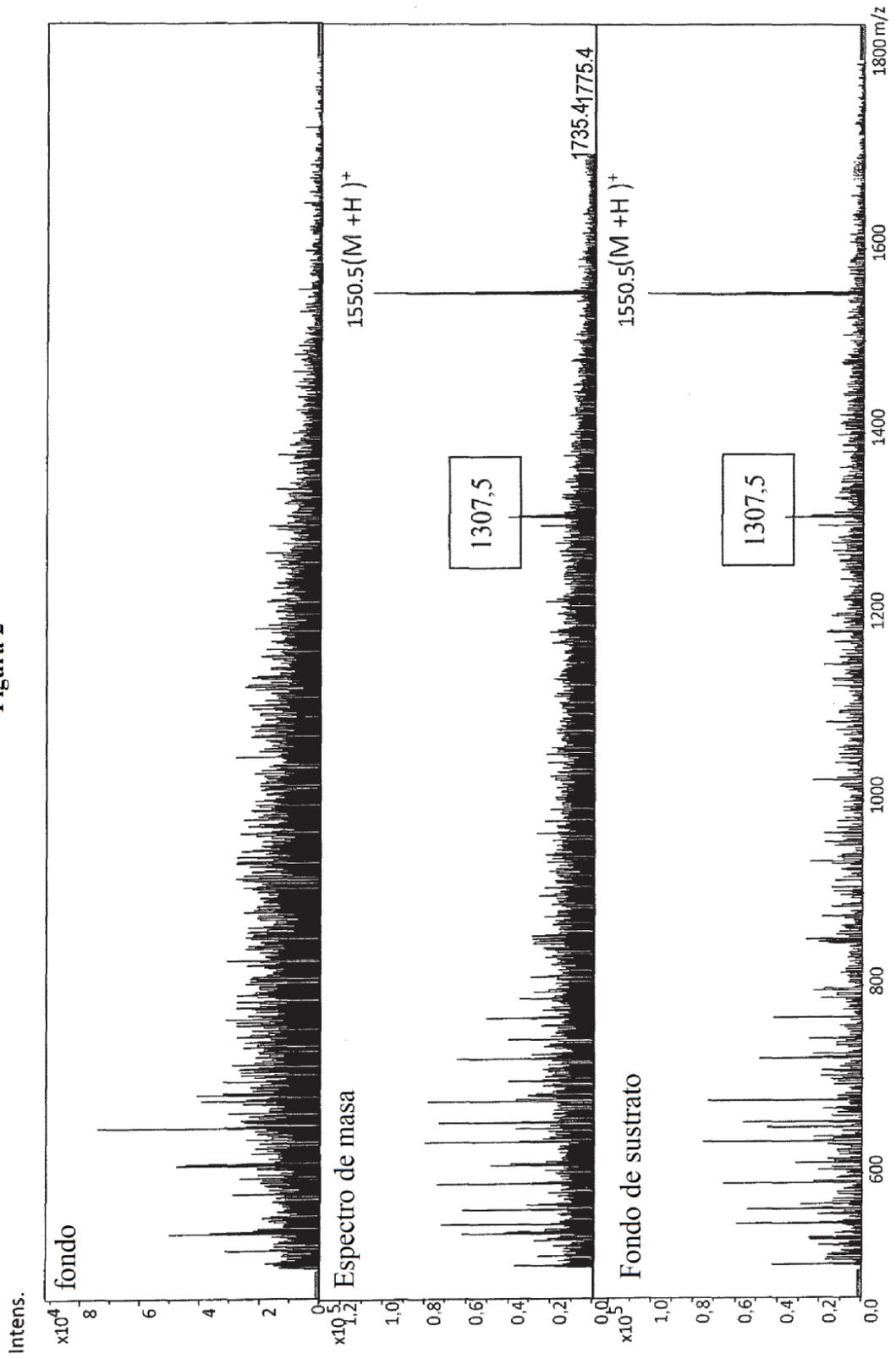


Figura 3

Fórmula química: $C_{29}H_{53}N_4O_9$
Masa exacta: 601,3813

de-Fmoc 4 mero

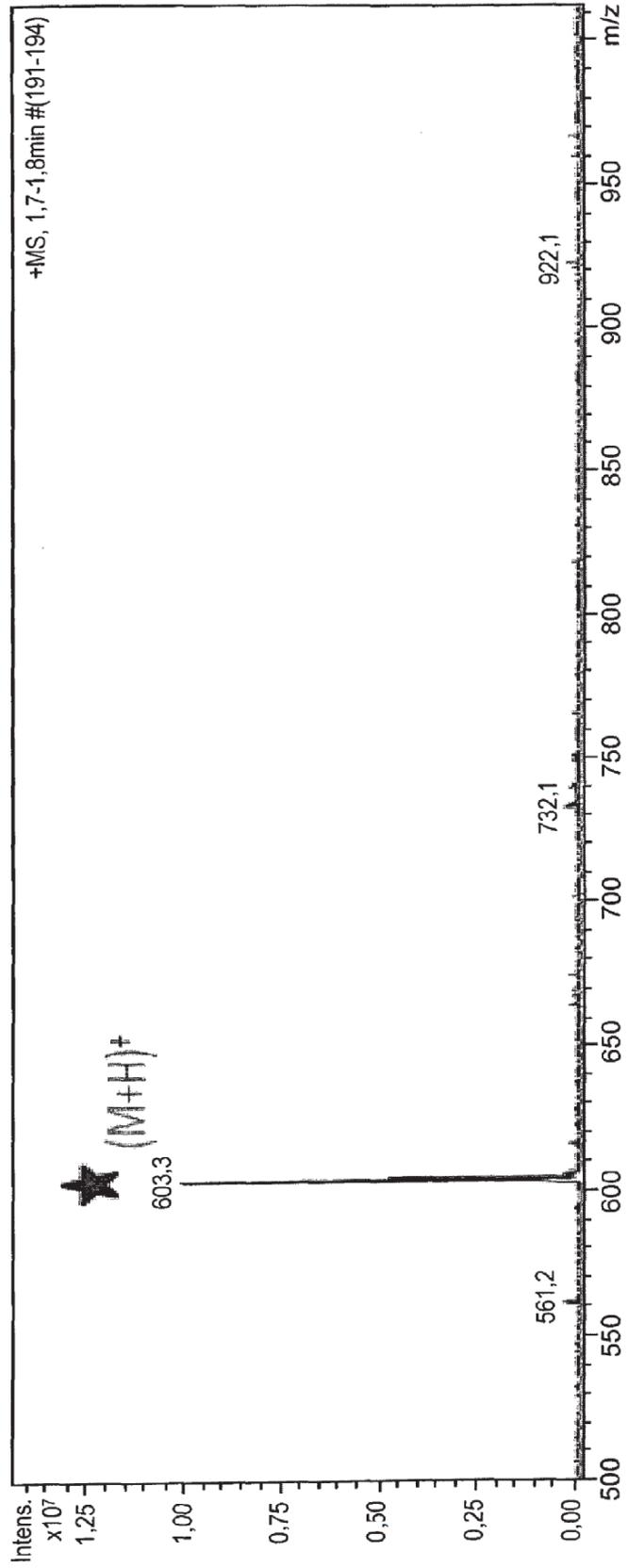


Figura 4

Fórmula química: $C_{53}H_{72}N_5O_{12}$

Masa exacta: 970,5177

5 meros

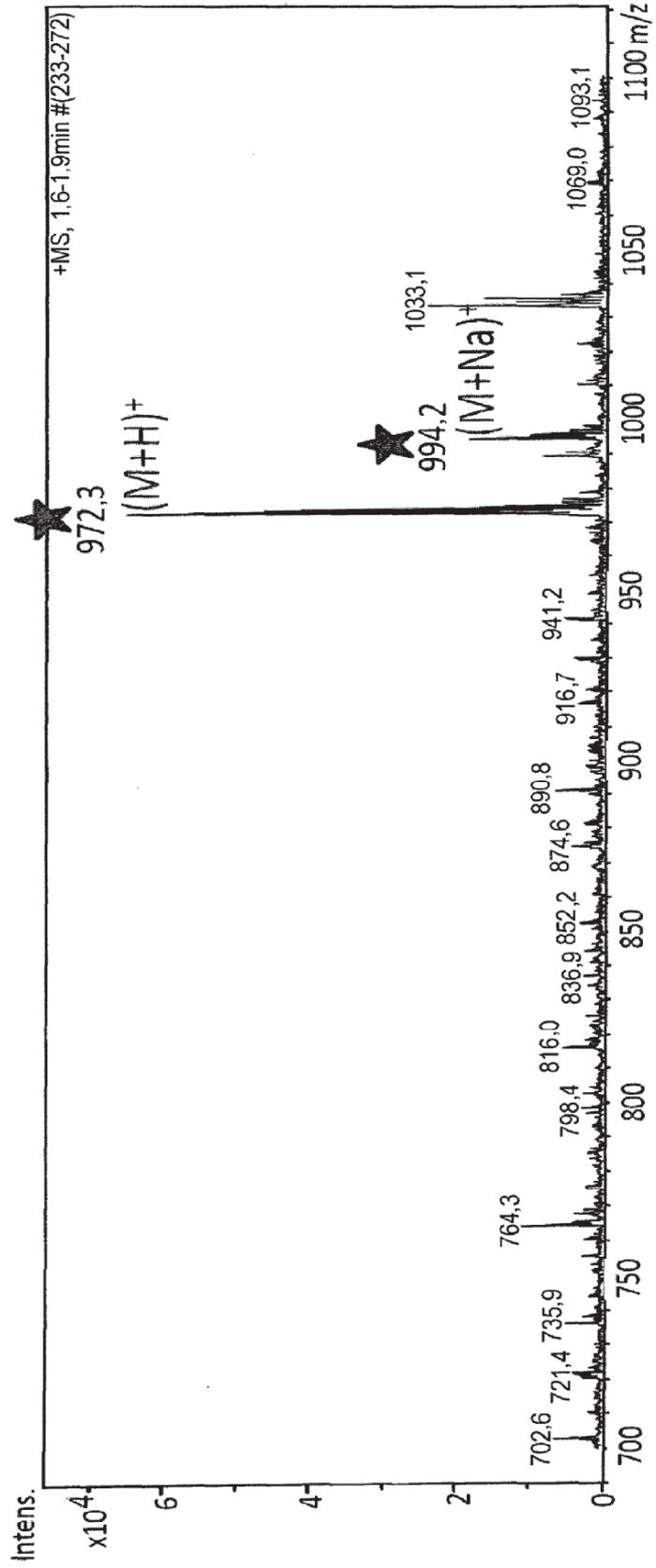


Figura 5
Fórmula química: $C_{38}H_{62}N_5O_{10}$
Masa exacta: 748,4497

de-Fmoc 5 mero

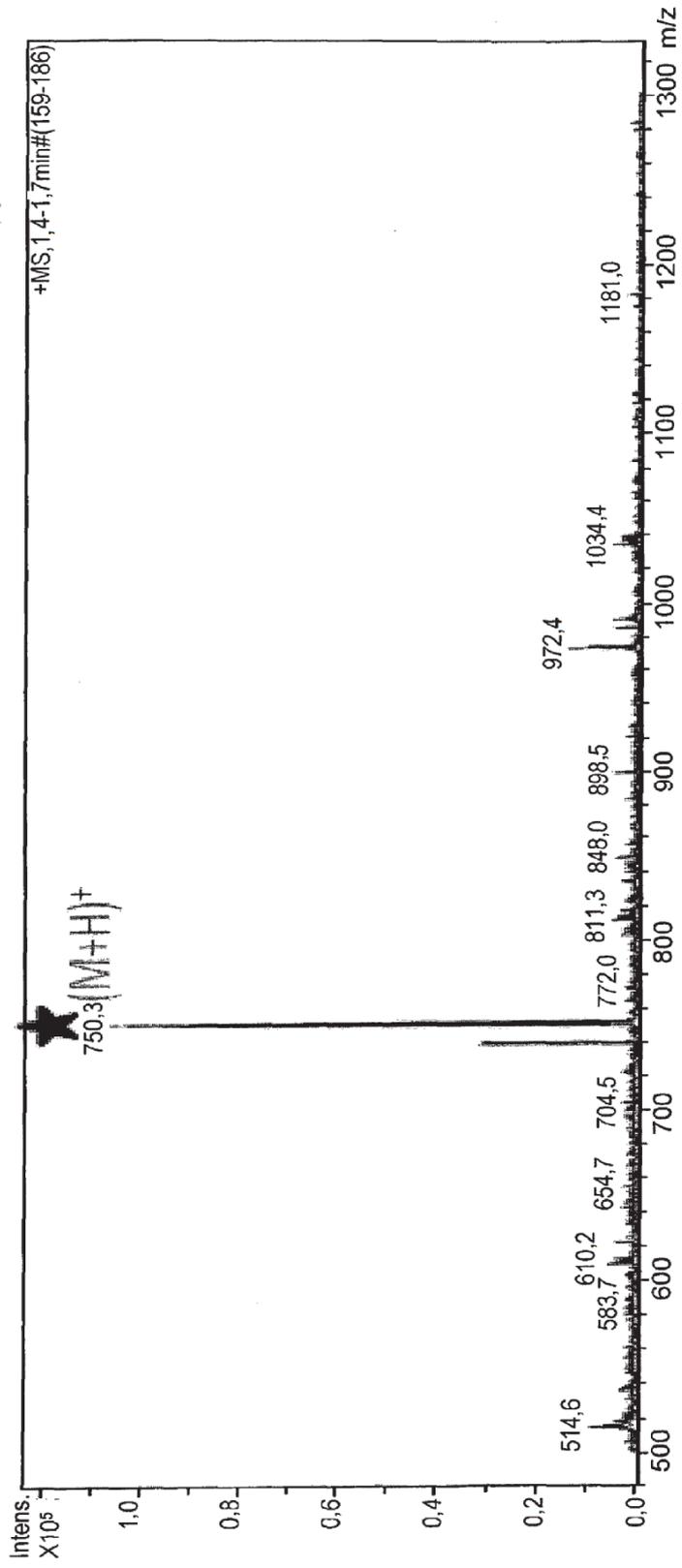


Figura 6

6 meros

Fórmula química: $C_{61}H_{87}N_6O_{14}$

Masa exacta: 1127,6280

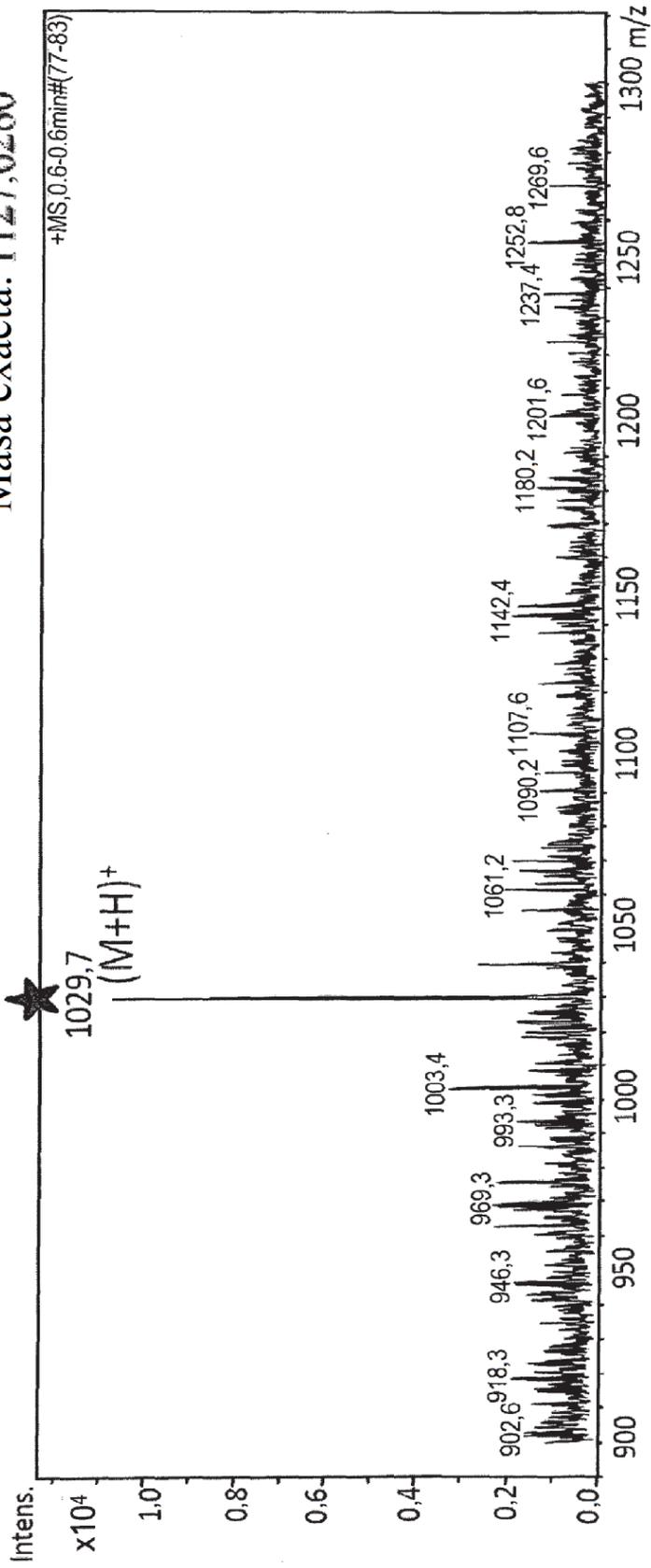


Figura 7

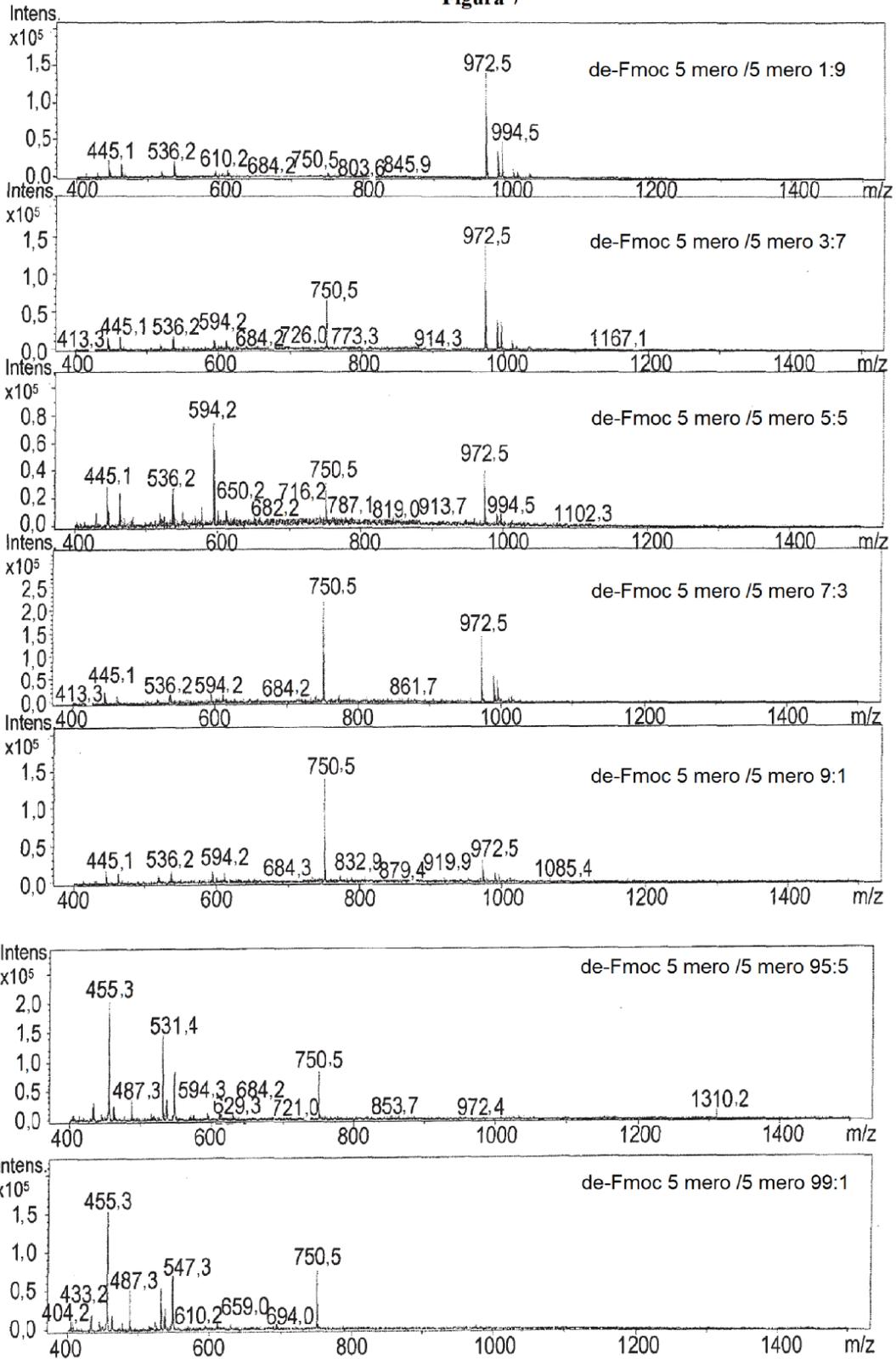
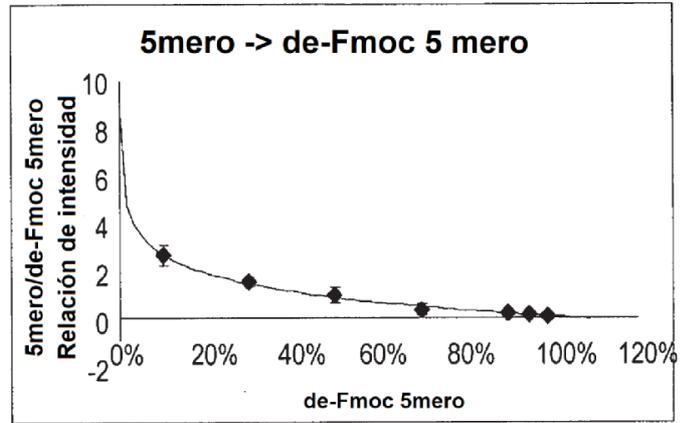
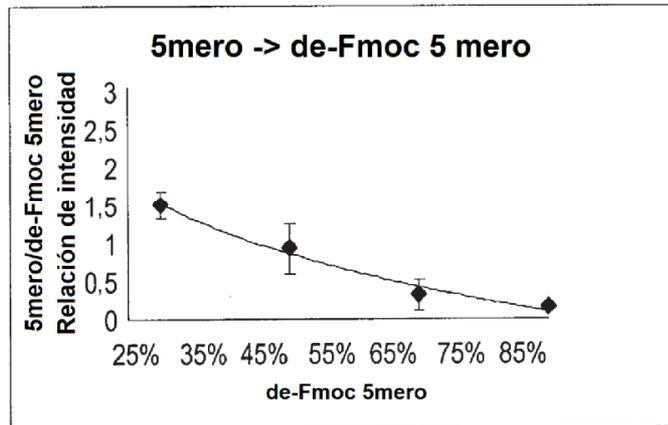


Figura 8

(a)



(b)



(c)

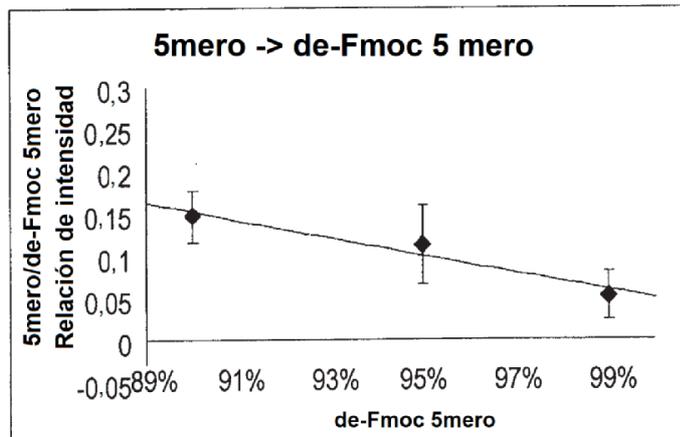


Figura 9

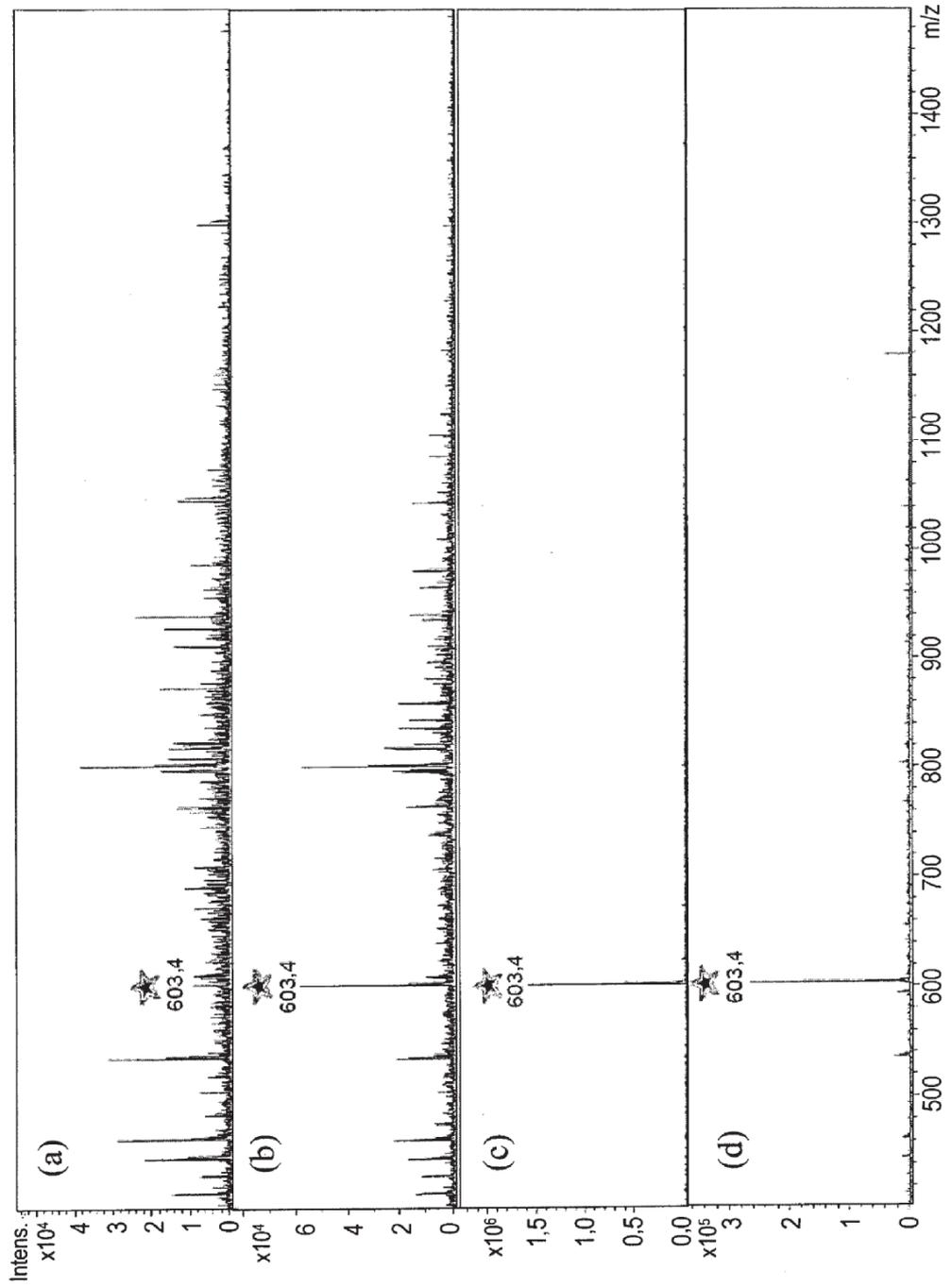


Figura 10

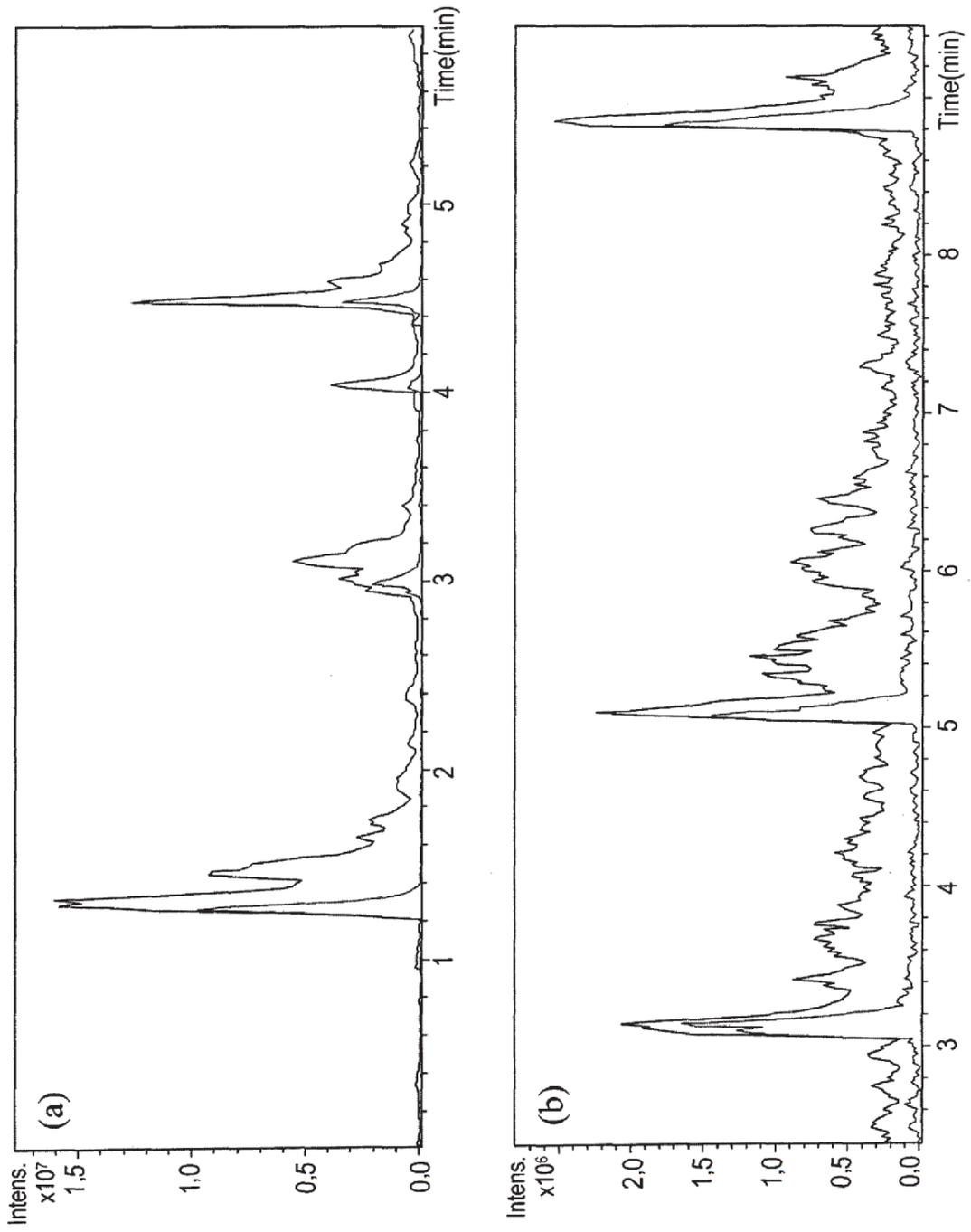
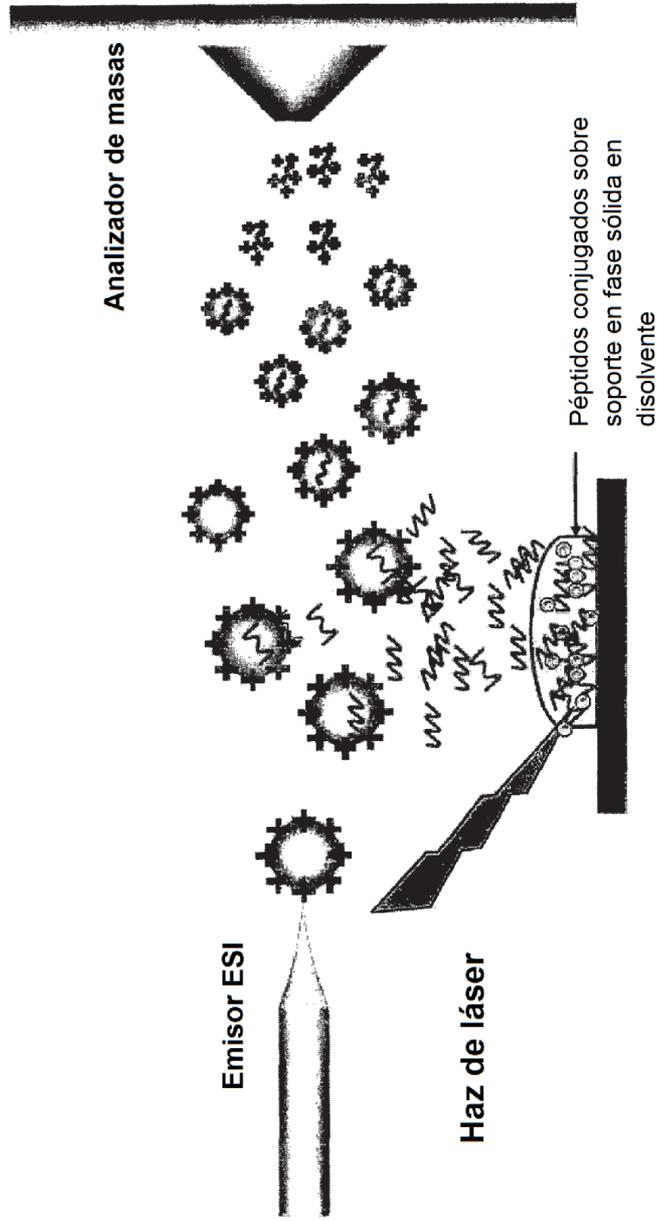


Figura 11



Representación esquemática de la detección EM de moléculas de péptido conjugadas sobre soportes en fase sólida.