



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 283 131**

51 Int. Cl.:

C08F 255/02 (2006.01)

C07K 1/04 (2006.01)

C08F 259/08 (2006.01)

C08F 291/18 (2006.01)

C08J 7/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99946041 .3**

86 Fecha de presentación : **28.08.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1027379**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2000**

54 Título: **Procedimiento para la fabricación de soportes poliméricos en fase sólida.**

30 Prioridad: **28.08.1998 DE 198 40 541**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

73 Titular/es: **Poly-An Gesellschaft zur Herstellung
von Polymeren für spezielle Anwendungen und
Analytik mbH
Rudolf-Baschant-Strasse 2
13086 Berlin, DE**

72 Inventor/es: **Ulbricht, Mathias;
Volkmer-Engert, Rudolf;
Germeroth, Lothar y
Wenschuh, Holger**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

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

Procedimiento para la fabricación de soportes poliméricos en fase sólida.

La invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de soportes en fase sólida poliméricos continuos para la síntesis combinatoria simultánea de compuestos orgánicos mediante tecnología de síntesis de mancha (SPOT), compuestos por una matriz soporte poliolefinica y cadenas individuales de un copolímero de injerto que son sintetizadas mediante copolimerización de injerto heterogénea fotoiniciada de monómeros de acrilato, de vinilo y de alilo sobre toda la superficie del polímero soporte y contienen grupos reactivos hidroxilos, carboxilos, aminos, mercaptos, aldehídos o halógenos, que pueden ser utilizados para la otra derivación.

Descripción del estado de la técnica

La síntesis química de compuestos con la utilización del concepto de bibliotecas combinatorias tiene una influencia significativa sobre el proceso del desarrollo de candidatos potenciales para nuevas terapéuticas y diagnosis. La química combinatoria es una técnica en la que un gran número de compuestos diferentes estructuralmente bajo condiciones reactivas comparables puede ser producido de manera efectiva en cuanto a costes y al tiempo y, a continuación, ensayos de selección de alto rendimiento pueden ser llevados a evaluación biológica. Aquí, el perfeccionamiento de estrategia de síntesis en fase sólida de Merrifield [Merrifield, R.B.: J. Am. Chem.Soc. 1963, 85, 2149], originariamente introducido para la síntesis de péptidos, adopta una posición clave. Puesto que la utilización de reactivos excesivos hace posible reacciones casi completas, la metodología es fácil de automatizar y sistemas de ensayo biológico son aplicables también directamente a las superficies poliméricas, la química combinatoria es llevada a cabo preferiblemente en fase sólida.

La modificación y ulterior desarrollo de los sistemas soporte de poliestireno originales y de poliamida utilizados más tarde [Atherton, E.: Clive. D.L.J.; Sheppard, R.C.; J. Am. Chem. Soc. 1975, 97, 6584] condujeron a nuevos polímeros, como por ejemplo resinas Tentagel y PEGA [Rapp, W.; Zhang, L.; Häbich, R.; Bayer, E. En Peptides 1988, (G. Jung & E. Bayer, Eds.) Walter de Gruyter, Berlín, Nueva York, pág. 199; Meldal, M.; Tetrahedron Lett. 1992, 33, 3077]. Estos fueron utilizados de manera creciente también para la síntesis en fase sólida de sustancias no peptídicas. Aunque las bolitas esféricas de resina de diferentes materiales están muy extendidas, otras apariencias físicas como varillas (polietileno) o superficies continuas (celulosa, algodón, vidrio, poliolefina) han conducido a nuevas técnicas de síntesis.

Un concepto de síntesis de este tipo es el método de las bibliotecas combinatorias referenciables espacialmente, *Spatially Addressable Combinatorial Libraries* [Revisión: Pirrung, M.C.; Chem. Rev. 1997, 97, 473]. Una ventaja decisiva de tales bibliotecas de sustancias consiste en que la posición en la que se encuentra una molécula sintetizada sobre el polímero describe su composición. Por consiguiente, al utilizar materiales soporte apropiados en formato y estructura, la aplicación de sistemas de ensayo biológico compatibles puede conducir directamente a informaciones referentes a la actividad biológica de las sustancias sintetizadas.

Por consiguiente, el aspecto, las propiedades químicas así como las físicas y la funcionalización de la superficie de los materiales soporte tienen una influencia decisiva tanto sobre la calidad y la eficiencia de la síntesis como sobre la compatibilidad con sistemas de ensayo biológico.

La tecnología de mancha desarrollada por Frank [Frank, R.; Tetrahedron, 1992, 48, 9217] para la producción de péptidos en superficies planas de celulosa hace posible en este caso en medida especial la producción paralela eficaz de grandes cantidades de secuencias de péptidos. El método en el que los reactivos son pipeteados de manera direccionable localmente sobre el soporte continuo se caracteriza además por una aplicabilidad de ensayos de selección (*Screeningassays*) convencionales, puesto que las geometrías de lectura de los sistemas de ensayo de gran rendimiento son compatibles con los materiales soporte planos. Así podían ser utilizados por ejemplo conjuntos de manchas, junto al trazado de epítopes (*Epitopmapping*) clásico, para descubrir secuencias de unión óptimas de proteinquinasas o péptidos que unen metales [Tegge, W.; Frank, R.; Hofmann, F., Dostmann, W.R.G.; Biochemistry 1995, 34, 10569; Malin, R.; Steinbrecher, R.; Jannsen, J.; Semmler, W.; Noll, B.; Johannsen, B.; Frömmel, C.; Höhne W.; Schneider-Mergener, J.; J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 11821].

Debido a la estabilidad química y mecánica limitada de las membranas de celulosa, hasta ahora la tecnología está no obstante limitada a la fabricación de secuencias de péptidos, que se produce bajo condiciones de síntesis relativamente indulgentes.

Provocado por la estructura del soporte homogéneo químicamente y el uso de grupos hidroxilo como grupo reactivo, el exceso permanente de funcionalidad hidroxilo sobre la superficie de celulosa tiene como consecuencia que no se hayan de conseguir transformaciones selectivas o completas. Esto es una desventaja en especial para la generación de constructos enlazadores diferentes, lo que limita de manera decisiva la diversidad de reacciones posibles.

Algunos desarrollos en el sector de los materiales soporte planos podrían superar bajo circunstancias las desventajas de la celulosa en la síntesis de mancha, aunque hasta ahora no han sido aplicados en la técnica de síntesis de mancha.

Así, las patentes de Berg *et al.* (WO 90/02749, WO 91/13098) y Batsberg *et al.* (WO 95/00533) describen la utilización de películas de poliolefina (preferiblemente polietileno). Estas fueron modificadas mediante rayos γ o mediante

homopolimerización o polimerización de injerto iniciada químicamente de estirenos de soluciones alcohólicas. Tuvo lugar otra derivación química para la introducción de grupos reactivos. Los soportes así generados fueron utilizados en reactores para la síntesis de péptidos y de oligonucleótidos. Además, podían ser realizados ensayos en fase sólida (ELISA).

Aunque el injerto de cadenas de poliestireno es un desarrollo posterior lógico de la resina de Merrifield clásica a un soporte plano conservándose las condiciones de síntesis de péptidos convencionales, la elección de este polímero no es obligatoria en este contexto. Ésta trae por el contrario incluso desventajas, como por ejemplo la solvatación muy diferente de las cadenas en distintos solventes. Asimismo, el polietileno como polímero base preferido es menos estable mecánicamente, y las películas descritas u otros moldes son por lo general no porosos. Por consiguiente, la posible funcionalización está limitada a la superficie exterior (es decir, capa de injerto gruesa o fina), lo cual conduce a una escasa capacidad de carga. Una funcionalización selectiva de la superficie no está garantizada. A través de la elección de radiación y para la iniciación y en especial del sistema de monómero/solvente son provocadas adicionalmente también reacciones (por ejemplo, homopolimerización y polimerización de injerto) en la película de poliolefina, no obstante éstas sólo refuerzan la inestabilidad mecánica y provocan un enturbiamiento, que imposibilita la aplicación en ensayos.

Además fueron descritas por Hudson *et al.* (WO 94/05394) junto a la utilización de placas sinterizadas porosas también membranas de polipropileno funcionalizadas con grupos amino, a las que está acoplado de manera covalente a través de un espaciador (PEG) un polímero hidrófilo (dextrano, quitina hidrolizada parcialmente). Los soportes hidrófilos utilizados en pequeños reactores (placas reticulares con agujeros) poseen una reactividad uniforme y son aptos para fines de selección. Sin embargo, la ruda modificación primaria mediante oxidación de cromo es especialmente desventajosa en lo referente al empleo de soportes porosos (con superficie específica más grande y, por ello, morfología sensible). Por lo tanto, se pueden manejar las membranas evidentemente sólo debido a la fijación en la placa reticular, es decir, como soporte discontinuo.

Además, la construcción relativamente costosa del dispositivo de síntesis conduce a una capacidad y variabilidad muy limitadas de las áreas de síntesis individuales.

La patente de Kóster *et al.* (EP 0305929) describe la síntesis de péptidos y oligonucleótidos en polímeros de membrana porosa, en los que fueron generados grupos reactivos sobre la superficie mediante generación de radicales iniciada por radiación. La funcionalización a través de (debido a la selección de iniciador y monómeros) capas de polímero muy reticuladas de manera diferente puede conducir no obstante a accesibilidades no uniformes de los grupos funcionales. Por consiguiente, estas membranas resultan para la síntesis de mancha como inadecuadas. Así, la aptitud de grandes áreas para la síntesis y bioensayos (que requieren estabilidad y la misma accesibilidad de todos los grupos reactivos) no es reconocible. Por lo general, se han de esperar complicaciones durante la síntesis en fase sólida de secuencias más largas y/o más complicadas.

Coassin *et al.* (WO 95/09176) informan sobre una funcionalización de polímero (polipropileno) con plasma reactivo adecuado (por ejemplo, amoníaco), para llegar a películas o membranas como soportes para la síntesis o secuenciación de biomoléculas. Sin embargo, la funcionalización es acompañada por reacciones secundarias (oxidación) que empeoran de manera notable la estabilidad mecánica del soporte. Además, la funcionalización del plasma es de manera conocida poco quimioselectiva. El resultado es una escasa carga con grupos reactivos, puesto que la modificación sólo tiene lugar superficialmente y los flujos de soportes de carga y especie reactiva (en plasmas reactivos) debido a los efectos de degradación (s.o.) deben ser minimizados.

Soportes continuos de gran superficie fueron descritos también por Eichler (DD 27285A1), Lebl *et al.* (EP 0385433 A2, EP 0445915 A1) y Okrongly *et al.* (EP 0400920). Mientras que las dos primeras patentes se refieren a la modificación de celulosa con las desventajas conocidas, en la última son funcionalizadas en la superficie preferiblemente placas de microtítulo (poliestireno) para la síntesis de péptidos. No obstante, frente a un control ventajoso del transcurso de la reacción mediante espectroscopia ultravioleta existen aquí las desventajas de una capacidad de unión limitada así como una movilidad limitada de las moléculas objetivo, cada una debida a la limitación de la funcionalización a una reacción análoga al polímero sencilla en la superficie de poliestireno no porosa.

Todos los sistemas conocidos hasta ahora (soportes funcionales y condiciones de síntesis) tienen desde el punto de vista de las exigencias de la síntesis de mancha cada uno serias desventajas que impiden una aplicación efectiva. En especial la ampliación de la aplicación de la síntesis de mancha para la generación de bibliotecas de sustancias orgánicas químicas no es posible con soportes en fase sólida continuos conocidos. Estas desventajas, o sea, limitaciones, son superadas con la invención descrita a continuación.

El objetivo es alcanzado a través de un procedimiento para la fabricación de un soporte en fase sólida polimérico continuo, comprendiendo una matriz soporte al menos de un material polimérico así como cadenas de copolímeros de injerto unidas a la matriz soporte de manera covalente, las cuales presentan grupos reactivos reaccionables con compuestos orgánicos, donde las cadenas de copolímeros de injerto configuran lugares de reacción definidos espacialmente, con los pasos

(a) Recubrimiento de una superficie de la matriz soporte con unfotoiniciador que sea adecuado para generar radicales mediante abstracción de oxígeno en la superficie de la matriz soporte tras estimulación ultravioleta, donde antes del recubrimiento no tenga lugar ningún pretratamiento de la superficie con un fotoiniciador y al menos un monómero,

(b) Exposición de la matriz soporte recubierta a radiación ultravioleta en presencia al menos de un monómero funcional insaturado, comprendiendo un grupo reactivo como también un grupo polimerizable, con lo cual se forman las cadenas de copolímeros de injerto unidas a la matriz soporte de manera covalente a través del grupo polimerizable, y con lo cual la exposición es realizada en ausencia de un monómero de reticulación, y

(c) Extracción de monómeros funcionales no transformados, del fotoiniciador así como de productos secuenciales solubles.

Descripción de la invención

El contenido de la presente invención es un procedimiento para la fabricación de superficies poliméricas nuevas, en las que puedan ser fabricadas bibliotecas de sustancias orgánicas utilizándose el concepto de síntesis de mancha, cuya actividad biológica pueda ser evaluada y leída directamente sobre el soporte.

Según la invención, son sintetizados soportes en fase sólida funcionalizados en la superficie que superan las características desventajosas de soportes existentes expuestas en la descripción del estado de la técnica, o sea, hacen posible conceptos y técnicas de síntesis de la síntesis combinatoria alternativos por completo mediante nuevas estrategias de funcionalización.

Para las exigencias especiales de la síntesis de mancha, las buenas propiedades mecánicas (estabilidad) del soporte y una funcionalidad de la superficie bien definida son importantes en la misma medida. Sin embargo, no hay materiales homogéneos que unan entre sí ambas características *a priori*. El ejemplo de la celulosa homogénea químicamente, donde en la aplicación como soporte fijo, reactivo de hidroxilo, siempre se vuelven a producir nuevos grupos reactivos hidroxilos potenciales de la matriz de carbohidratos, enseña de hecho que un soporte óptimo debería ser heterogéneo químicamente. Una matriz soporte, que condicione esenc. la estabilidad, con una superficie funcional diferente químicamente. En consecuencia, la funcionalización heterogénea de materiales de matriz poliméricos apropiados constituyen el modo de síntesis más atractivo para soportes en fase sólida nuevos, poliméricos continuos más eficaces. Si sale bien el conducir esta funcionalización realmente de manera selectiva en cuanto a la superficie, es decir, limitar la transformación química del polímero matriz a la superficie del mismo, entonces la matriz soporte y la superficie funcional del soporte pueden ser optimizadas independientemente una de la otra.

Las exigencias a la matriz soporte resultan de que existan una buena, segura manejabilidad antes, durante y después de las síntesis de varios pasos de manera decisiva para el éxito, o sea, calidad de síntesis y ensayos. Por otra parte, una superficie específica grande en combinación con estructura porosa apropiada de la matriz soporte es el requisito para una capacidad de enlace elevada por área. No obstante, debe darse también una estabilidad de dimensiones suficiente (hinchazón mínima), para poder obtener un reposicionamiento de la membrana durante las síntesis y productos definidos en cada mancha y poder leer sin alteraciones los resultados del ensayo. Todas estas exigencias provocan que la matriz soporte (a pesar de la superficie específica grande deseada) deba presentar una excelente resistencia a los disolventes mecánica, térmica bajo condiciones de síntesis y de ensayo.

Las exigencias en cuanto a la superficie funcional en lo referente a la síntesis son grupos reactivos en gran cantidad (al menos hasta $1 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) y con accesibilidad buena, constante (a través de todas las etapas de la síntesis para las moléculas objetivo). Esto requiere una superficie específica grande en combinación con estructura porosa apropiada de la matriz soporte (s.o.) así como grupos reactivos en grupos o cadenas de espaciadores, una buena solvatación de los grupos funcionales y un humedecimiento óptimo de la superficie exterior del soporte (manchas definidas con gradientes de concentración radial mínima; ningún efecto de cromatografía). A través de esto, se obtienen una unidad de producto elevada (por mancha) y cantidades de producto idénticas para todas las manchas.

En lo referente a los ensayos, además la accesibilidad y movilidad de las moléculas sintetizadas así como interacciones no específicas mínimas de la superficie funcional con las proteínas de ensayo son importantes (fondo mínimo al leer el resultado).

El procedimiento de fabricación debe ser robusto, reproducible y flexible en referencia a la funcionalidad y, dado el caso, también a la matriz soporte, así como posibilitar un aumento de escala sobre áreas grandes. Para el producto de la síntesis, los nuevos soportes en fase sólida poliméricos continuos, son críticos en especial la homogeneidad y la estabilidad de la matriz soporte, la capa funcional y el compuesto bajo condiciones de ensayo y de síntesis de la misma.

Síntesis de los nuevos soportes en fase sólida poliméricos continuos

Un polímero apropiado especialmente bien como matriz soporte en el polipropileno, puesto que es cargable mecánicamente y estable químicamente en amplias zonas de condiciones potenciales de síntesis orgánica química (incluido solvente y temperatura). También aparece apenas un hinchamiento, aparte de solventes muy no polares, que no obstante no desempeñan ningún papel para la síntesis. El polipropileno está disponible tanto como película fina, homogénea, transparente, como como lámina o placa gruesa, pero también como membrana porosa con distintas morfologías y tamaños porosos. Según el objetivo (capacidad deseada - superficie específica; flexibilidad mecánica), pueden escogerse de este espectro materiales base para la síntesis de soportes en fase sólida. Preferiblemente son escogidas como matriz soporte membranas planas macroporosas de polipropileno (por ejemplo, membranas de microfiltración, producidas

mediante inversión de fases y con red de poros fungiforme con tamaños de poro/límites de separación nominales de $0.2\ \mu\text{m}$, o filtros con una estructura de red tipo material no tejido sinterizada y manchada con tamaños de poro/límites de separación nominales de $0.6\ \mu\text{m}$). Naturalmente pueden emplearse también otros polímeros, como por ejemplo polietileno, fluoruro de polivinilideno, poliestireno reticulado o teflón, con morfologías diferentes. La matriz soporte también puede ser reforzada externa o internamente mediante un soporte inerte adicional o partículas, fibras o redes de polímero, vidrio o metal.

Para garantizar una estabilidad máxima bajo condiciones de aplicación, es sintetizado un compuesto de la matriz soporte y de la capa funcional anclada químicamente a aquella. La matriz soporte es funcionalizada de manera covalente mediante copolimerización de injerto heterogénea fotoiniciada (de manera muy selectiva en cuanto a la superficie en lo referente a la matriz de polipropileno, pero por el grosor total de la capa de manera casi uniforme) con largas cadenas de polímero de injerto de monómeros funcionales. Los nuevos soportes en fase sólida poliméricos continuos según la invención para la síntesis de mancha se obtienen en este caso tras un procedimiento que se compone de los pasos esenciales siguientes:

i) Recubrimiento de la superficie de la matriz soporte con un fotoiniciador que pueda generar radicales en la superficie del soporte tras estimulación ultravioleta (mediante abstracción de hidrógeno y, por ello, sin degradación de los polímeros de la matriz),

ii) Exposición ultravioleta de la matriz soporte recubierta en presencia de un monómero funcional o mezcla monomérica con formación de una capa funcional, que se compone de cadenas de copolímeros de injerto funcionales no reticuladas, ancladas de manera covalente al polímero de la matriz (la exposición ultravioleta tiene lugar preferiblemente de manera selectiva, de manera que sólo el fotoiniciador es estimulado),

iii) Extracción de monómero no transformado y fotoiniciador así como de copolímeros u homopolímeros solubles o productos secuenciales del fotoiniciador.

La ilustración 1 representa de manera esquemática el procedimiento de producción para el soporte en fase sólida continuo plano.

También es posible una activación/iniciación secuencial de la copolimerización de injerto, teniendo lugar primero la exposición de la matriz soporte recubierta con fotoiniciador según i) en presencia de oxígeno o con exposición posterior en oxígeno con formación de peróxidos del polímero soporte y siendo iniciada después térmicamente la reacción con el monómero. También otras reacciones iniciadas químicamente de manera heterogénea para la iniciación de una copolimerización de injerto son aplicables.

Como fotoiniciador son aptos en especial la benzofenona y derivados de la cetona relacionados estructuralmente. El revestimiento con el fotoiniciador en la fase i) puede ser llevado a cabo a partir de una solución en un no solvente para el polímero soporte mediante revestimiento por inmersión o impregnación; pero aquel puede tener lugar dado el caso también sin paso del procedimiento adicional directamente antes de la copolimerización de injerto descrita en la fase ii), siendo absorbido el fotoiniciador de una mezcla de iniciador, monómero o mezcla monomérica y, dado el caso, solvente, en la superficie del soporte.

A los monómeros utilizados es común una conformación estructural que, de manera modular según un mecanismo de reacción uniforme (copolimerización de injerto heterogénea), puede conducir a una pluralidad de funcionalidades de la superficie:

Grupo reactivo - grupo de espaciadores - grupo polimerizable

Preferiblemente son utilizados acrilatos funcionales, metacrilatos, acrilamidas o metacrilamidas, pero también otros monómeros de vinilo funcionales y otros muchos más son aptos principalmente. Ejemplos para grupos reactivos como ancla para la síntesis en fase sólida son grupos amino o hidróxilos. Grupos carboxilos o epoxi introducidos mediante monómeros funcionales también pueden ser utilizados para ello muy fácilmente (por ejemplo, tras el “cambio de la funcionalización” a grupos amino). Como grupos de espaciadores son especialmente preferidas cadenas de oligoetilenglicol o polietilenglicol, puesto que son solvatados en muchos solventes diferentes similarmente bien, garantizan una buena movilidad y también mejoran la biocompatibilidad. Estructuras enlazadoras disociables pueden ser por ejemplo ésteres (en acrilatos) o amidas (en acrilamidas), donde las últimas presentan una estabilidad de hidrólisis mejor notablemente y son preferidas para síntesis en fase sólida bajo condiciones orgánicas químicas rudas. Hidroxi o amino(polietilenglicol)metacrilatos o hidroxi o amino(polietilenglicol)metacrilamidas son ejemplos para monómeros, tras cuya copolimerización de injerto resultan soportes que pueden ser utilizados directamente con ventajas especiales para la síntesis de mancha. Se puede “cambiar la funcionalización” fácilmente de soportes funcionalizados con ácido poliacrílico de injerto con diamino-oligoetilenlicoles a soportes amino estables a la hidrólisis.

Para la preparación de cadenas de injerto de copolímeros pueden emplearse monómeros funcionales mencionados arriba en mezcla con otros monómeros funcionales, pero también con monómeros inertes. Los últimos pueden utilizarse para la “dilución” de grupos reactivos junto al/en el soporte en fase sólida o para el ajuste de la hidrofília/hidrofobia o carga (bajo circunstancias también esenc. para la compatibilidad de ensayo).

- Con matriz soporte predeterminada, con estructura porosa u homogénea correspondiente y, con ello, con superficie específica más grande o escasa, se pueden ajustar a través de las condiciones de copolimerización de injerto (recubrimiento de fotoiniciador, concentración de monómeros, duración de la irradiación) del grado de la funcionalización y, con ello, la carga con grupos reactivos por área en zonas extensas (hasta $10 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$). Mediante las cadenas de copolímeros de injerto se consigue en cada caso un aumento de la capacidad comparado con una superficie del soporte lisa funcionalizada de manera análoga a un polímero. En la elección de condiciones apropiadas (absorción de luz de fotoiniciador y matriz soporte) son posibles funcionalizaciones uniformes de capas porosas gruesas (con BP en membranas de PP hasta $200 \mu\text{m}$).
- La fotofuncionalización aplicada preferiblemente permite en un procedimiento rápido y efectivo la funcionalización reproducible y uniforme de áreas grandes continuas del soporte en fase sólida.

Síntesis sobre los nuevos soportes en fase sólida poliméricos continuos

- A través del procedimiento de producción elegido, se hace posible generar sobre una matriz soporte sólida grupos reactivos primarios, preferiblemente grupos amino o hidroxilos, en gran número ($> \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) con buena accesibilidad. De manera interesante, esta accesibilidad permanece casi constante también a través de un número mayor de ciclos de síntesis (10% de disminución de la carga tras aproximadamente diez ciclos de síntesis). El motivo para ello es encontrar una superficie específica grande en combinación con estructura porosa adecuada de la matriz soporte del soporte (membrana porosa), así como una movilidad muy buena de los grupos reactivos, provocadas por cadenas de copolímeros de injerto solvatadas y otros grupos de espaciadores. Además, el humedecido óptimo de la superficie exterior del soporte conduce a manchas definidas con efectos de filtración profunda mínimos y gradientes de concentración radial. Debido a los excesos de reactivos constantes de esta forma en cada lugar del humedecido, se puede garantizar una calidad del producto casi constante. Debido a la homogeneidad del soporte en fase sólida (número idéntico de funcionalidades igualmente accesibles por toda la superficie), pueden ser generadas cantidades iguales del producto por mancha. Asimismo, la hidrofobia reducida de los soportes en fase sólida modificados conduce a una buena compatibilidad de ensayo en comparación con la matriz soporte en relación con la movilidad de las sustancias ligadas inducida por las estructuras de espaciador.
- Los soportes en fase sólida poliméricos se caracterizan además por una gran estabilidad química, es decir, resistencia frente a ácidos fuertes, lejías, solventes así como reactivos oxidantes y reductores. Además, los nuevos soportes en fase sólida poliméricos poseen una gran resistencia frente a influencias físicas como la temperatura, tratamiento por ultrasonido y microondas, lo que conduce a que las superficies continuas tampoco muestren un hinchamiento o sólo un hinchamiento nimio también después de varios ciclos reactivos. Estas propiedades permiten un pipeteado repetido, dirigido espacialmente, de pequeños volúmenes (10 nL) y, al contrario que la celulosa, una amplia variación de las condiciones químicas de reacción.

- Los nuevos soportes en fase sólida poliméricos continuos pueden ser preparados con una pluralidad de constructos enlazadores para el alojamiento de otras moléculas. Así, junto a enlazadores sensibles a los ácidos (por ejemplo, enlazador Rink), fotoenlazadores activables por ultravioleta (por ejemplo, ácido 4-(metoxi-4-(2- Fmoc-amino-etil)-5-nitrofenoxilbutanoico), también son utilizables enlazadores de base lábil (por ejemplo, enlaces de HMBA) o constructos enlazadores escindibles con sistemas de tampón acuoso (por ejemplo, enlazadores de Imidazol). Estos enlazadores son aplicables también de manera paralela sobre el soporte en fase sólida continuo mediante aplicación definida localmente de manchas y pueden ser utilizados, por ejemplo, para la síntesis de productos disociables múltiple o gradualmente.

- Aunque también pueden ser producidas sustancias peptídicas con la misma o mejor calidad que en la celulosa utilizada convencionalmente, de las propiedades de los nuevos soportes en fase sólida nombradas arriba resultan ante todo múltiples posibilidades para la síntesis de bibliotecas de sustancias producidas de manera orgánica combinatoria. Puesto que los nuevos soportes en fase sólida según la invención poseen una gran estabilidad química y física, sus ventajas decisivas se encuentran en especial en la síntesis combinatoria de bibliotecas de oligómeros no naturales (por ejemplo, peptoides, oligocarbamatos, oligoureas, azátidos, quétidos, sulfonamidas de péptidos, péptidos de sulfonilo vinílicos), así como moléculas sintéticas pequeñas (por ejemplo, benzodiazepinas, triazinas, triazoles, hidantoínas, cubanos, xantinas, pirolidinas, β -lactamos, tiazolidonas). Además, un punto central de la aplicación se encuentra en la síntesis paralela de quimeras (conjugados) de distintos oligómeros sintéticos (naturales o no naturales) o pequeñas moléculas sintéticas con sustancias naturales como por ejemplo esteroides o moléculas de azúcar.

- De manera ventajosa, la utilización de los soportes en fase sólida continuos, los cuales fueron producidos según el procedimiento según la invención, para la síntesis combinatoria y paralela de compuestos libres o ligados al soporte, que son sintetizados sobre el soporte en fase sólida continuo mediante síntesis de mancha de componentes de la síntesis activados en diferentes lugares de reacción.

- Preferiblemente, una utilización según la invención de los soportes en fase sólida continuos es para la síntesis combinatoria y paralela de proteínas.

- Una utilización según la invención de los soportes en fase sólida continuos es preferida para la síntesis en fase sólida, preferiblemente síntesis de mancha, también como conjunto de soportes funcionalizados de manera idéntica o diferente o como pila de soportes funcionalizados de manera idéntica o diferente para la síntesis de compuestos

disociables gradual o múltiplemente, donde a través de técnicas de disociación (hojas individuales) y combinación (pila) se hace posible con soportes enteros también una combinatoria casi tridimensional.

Aun más preferida es la utilización según la invención de los soportes en fase sólida continuos para la identificación de moléculas (ligandos) en compuestos sintetizados, comprendiendo los siguientes pasos:

Incubación con el ligando, retirada de ligandos sobrantes mediante lavado, detección de ligandos unidos mediante procedimiento apropiado como: i) Determinaciones inmunológicas, ii) Determinación de ligandos marcados unidos radioactivamente, iii) Determinación de la fluorescencia o de la quimioluminiscencia, iv) Determinaciones biosenso-
riales.

La más preferida es la utilización según la invención de los soportes en fase sólida continuos para la evaluación de actividades enzimáticas en compuestos sintetizados, comprendiendo los siguientes pasos:

i.) Incubación con la enzima, ii.) Detección de actividad enzimática.

La invención es descrita a continuación con mayor detalle por medio de ejemplos, los cuales explican más detalladamente la síntesis de los nuevos soportes en fase sólida poliméricos continuos, cuya aplicación en la síntesis de mancha de péptidos y otras moléculas orgánico químicas, así como de bibliotecas de sustancias de péptidos y otras moléculas orgánico químicas, y la aplicación en sistemas de análisis y selección.

Definiciones

Síntesis en fase sólida

Enlace covalente de moléculas con un soporte polimérico insoluble y reacciones siguientes en las sustancias ligadas al soporte, donde, a través de sencillas operaciones de lavado y filtrado, reactivos sobrantes se hacen utilizables y separables y el producto objetivo permanece ligado al soporte polimérico hasta la disociación.

Monómeros funcionales

Moléculas, que contienen un grupo polimerizable, un grupo de espaciadores y un grupo reactivo y pueden formar cadenas de polímeros lineales y/o ramificadas bajo la influencia de un iniciador de polimerización.

Soporte en fase sólida continuo

Material plano de una matriz soporte (véase abajo) con cadenas de copolímeros de injerto ancladas al mismo de manera covalente (véase abajo).

Ligando

Molécula, que se liga a los compuestos sintetizados sobre el soporte en fase sólida continuo y/o los transforma químicamente y que puede ser una proteína, enzima, carbohidrato o glicoproteína, lípidos o lipoproteína, un ácido nucleico o un compuesto de bajo peso molecular.

Enlazador

Molécula de anclaje disociable molecular, la cual permite la disociación de los productos objetivo sintéticos del soporte en fase sólida.

Cadenas de copolímeros de injerto

Cadenas de moléculas lineales y/o ramificadas, conformadas a partir de monómeros funcionales (véase abajo).

Fotoiniciador

Genera, tras el recubrimiento de la superficie de un polímero soporte y estimulación mediante radiación ultravioleta a través de la abstracción de hidrógeno del polímero soporte, radicales que pueden reaccionar con un monómero funcional, por ejemplo, un derivado del la benzofenona o cetona.

Grupo polimerizable

Enlace múltiple reaccionable en monómeros funcionales, por ejemplo un grupo acrilato, vinilo o alilo.

Radicales

Moléculas neutras eléctricamente, que poseen un momento magnético, una reactividad preferida es la adición a compuestos que contengan enlaces múltiples reaccionables (grupos polimerizables).

Grupo reactivo

Grupo químico reaccionable (funcionalidad) para reacciones de acoplamiento covalentes con otros compuestos, por ejemplo un grupo hidroxilo, grupo carboxilo, grupo amino, grupo mercapto o un grupo halógeno.

Grupo de espaciadores

Distanciador molecular entre grupo polimerizable y grupo reactivo en un monómero funcional, por ejemplo un oligoetilenglicol o polietilenglicol o un enlace.

Mancha

Se forma mediante el pipeteado de reactivos sobre superficies continuas relacionadas, donde el volumen pipeteado define el tamaño de la mancha y el número de las manchas posibles por área.

Manchado

El pipeteado de reactivos sobre superficies continuas relacionadas.

Síntesis de mancha

El concepto de síntesis en fase sólida en el que mediante pipeteado de pequeñas gotas de reactivo sobre un conjunto predefinido de lugares de reacción sobre un soporte en fase sólida continuo relacionado, que actúa como soporte en fase sólida polimérico, son definidas manchas: estas manchas constituyen microrreactores, en los que pueden desarrollarse síntesis en fase sólida si son utilizados solventes con escasa presión de vapor.

Matriz soporte

Material plano, estable química y morfológicamente, que se compone de polímeros poliolefinicos (polímeros soporte) como polietileno, poliestireno, fluoruro de polivinilideno, politetrafluoretileno, pero preferiblemente polipropileno.

Estimulación ultravioleta

Transfiere el fotoiniciador a un estado estimulado, sin estimular el polímero soporte (degradar).

Ejemplos de realización*Ejemplo 1*

Síntesis de soportes en fase sólida poliméricos continuos - membranas de hidroxil-PEG-éster-PP con diferentes longitudes de espaciador - bajo condiciones de laboratorio

Una membrana de PP (Accurel 2E, Akzo; diámetro de poro nominal $d_p = 0.2 \mu\text{m}$, grosor de la capa $150 \mu\text{m}$; $d = 80 \text{ mm.}$) es equilibrada agitando durante 2 horas con una solución de 100 mM de benzofenona (BP) en metanol. La membrana es extraída de la solución y la superficie es secada rápidamente al aire, sin que el interior de los poros sea desreticulado. Después, la membrana es colocada en una placa de Petri ($d = 90 \text{ mm.}$) sobre un papel de filtro empapado con una parte de la solución monomérica (aproximadamente 5 ml.), es fijada con un anillo de vidrio ($d = 80 \text{ mm.}$) y es recubierta inmediatamente con el resto de la solución de polimerización (en total, 20 ml. de 50 g/l de PEGMA 306 ó 78.5 g/l de PEGMA 526, cada una en un agua saturada con BP; los monómeros -PEG-metacrilatos, donde la cantidad describe el peso molecular medio- son productos de la Polysciences Europe GmbH, Eppelheim). La placa de Petri es colocada en un reactor que después es cerrado con un tapa de vidrio filtro ultravioleta (corte 310 nm.) y es enjuagada durante al menos 30 min. con nitrógeno. A continuación, tiene lugar - además con enjuague de nitrógeno - durante 30 min. la irradiación ultravioleta (HBO 350 DeepUV; Hamamatsu, en un aparato de irradiación de Oriel, 3 mW/cm²). Después de otros 15 min. bajo nitrógeno, la membrana es retirada y, a continuación, es extraída por completo con agua, metanol y acetona. La determinación del grado de modificación (DG) de la membrana tiene lugar gravimétricamente: DG (PEGMA 306) = $1.12 \text{ mg/cm}^2 = 3.5 \mu\text{mol/cm}^2$; DG (PEGMA 526) = $1.37 \text{ mg/cm}^2 = 2.6 \mu\text{mol/cm}^2$.

Otra caracterización tiene lugar mediante espectroscopia FTIR-ATR, REM así como la medición de la permeabilidad de la membrana.

Ejemplo 2

Síntesis de soportes en fase sólida poliméricos continuos - membranas de carboxil-PP- o de carboxil-polietileno (PE) - bajo condiciones de laboratorio

Una membrana de PP (Accurel 2E; Akzo; $d_p = 0.2 \mu\text{m}$, grosor de la capa $150 \mu\text{m}$) o membrana de PE (celgard 2500. Hoechst-Celanese $d_p = 0.2 \mu\text{m}$, grosor de la capa $25 \mu\text{m}$) con un diámetro de $d = 80 \text{ mm.}$ es equilibrada agitando

ES 2 283 131 T3

durante dos horas con una solución de 100 mM de BP en metanol. La membrana es extraída de la solución y la superficie es secada rápidamente al aire, sin que el interior de los poros sea desreticulado. Después, la membrana es colocada en una placa de Petri (d = 90 mm.) sobre un papel de filtro empapado con una parte de la solución monomérica (aproximadamente 5 ml.), es fijada con un anillo de vidrio (d = 80 mm.) y recubierta inmediatamente con el resto de la solución monomérica (en total, 20 ml. de 10 g/l de ácido acrílico, AA, en agua saturada con BP). La placa de Petri es colocada en un reactor que después es cerrado con una tapa de vidrio filtro ultravioleta (corte 310 nm.) y es enjuagada durante al menos 30 min. con nitrógeno. A continuación, se realiza - además con enjuague de nitrógeno - durante 30 min. (PP) o 15 min. (PE) la exposición ultravioleta (HBO 350 DeepUV; 3 mW/cm²). Tras otros 15 min. bajo nitrógeno, la membrana es retirada y, a continuación, es extraída por completo con agua y acetona. La determinación del grado de modificación (DG) de la membrana se realiza gravimétricamente:

$$DG(PP) = 220 \mu\text{g}/\text{cm}^2 = 3.1 \mu\text{mol}/\text{cm}^2;$$

$$DG(PE) = 245 \mu\text{g}/\text{cm}^2 = 3.4 \mu\text{mol}/\text{cm}^2.$$

Otra caracterización se realiza mediante espectroscopia FTIR-ATR. REM, enlace de colorante (azul de toluidina) así como la medición de la permeabilidad de la membrana.

Ejemplo 3

Síntesis de soportes en fase sólida poliméricos continuos - membranas de hidroxiamida-PP - bajo condiciones de laboratorio

Una membrana de PP (Accurel 2E; Akzo; d_p = 0.2 μm) con un diámetro de d = 80 mm. es equilibrada agitando durante dos horas con una solución de 100 mM de BP en acetona. La membrana es extraída de la solución y la superficie es secada rápidamente al aire, sin que el interior de los poros sea desreticulado. Después, la membrana es colocada en una placa de Petri (d = 90 mm.) sobre papel de filtro empapado con una parte de la solución de polimerización (aproximadamente 5 ml.), es fijada con un anillo de vidrio (d = 80 mm.) y recubierta inmediatamente con el resto de la solución de polimerización (en total, 20 ml. de 40 g/l de 2-hidroxipropilmetacrilamida, 2 HPMAM, en agua saturada con BP; monómero de Polysciences). La placa de Petri es colocada en un reactor que después es cerrado con una tapa de vidrio filtro ultravioleta (corte de 310 nm.) y es enjuagada durante al menos 30 min. con nitrógeno.

A continuación, se realiza - además con enjuague de nitrógeno - durante 45 min. la exposición ultravioleta (HBO 350 DeepUV; 3 mW/cm²). Tras otros 15 min. bajo nitrógeno, la membrana es extraída y, a continuación, es extraída por completo con agua y acetona. La determinación del grado de modificación (DG) de la membrana se realiza gravimétricamente: DG = 355 μg/cm² = 2.5 μmol/cm².

Otra caracterización se realiza mediante espectroscopia FTIR-ATR, REM, enlace de colorante (azul toluidina), así como la medición de la permeabilidad de la membrana.

Ejemplo 4

Síntesis de soportes en fase sólida polimérico continuo - membranas de cloruro de bencilo - PP - bajo condiciones de laboratorio

Una membrana de PP (AN06, Millipore Corp; d_p = 0.6 μm) con un diámetro de d = 80 mm. es pesada y, a continuación, es equilibrada agitando dos horas con una solución de BP en acetona (150 mM). La membrana aún húmeda, recubierta con BP, es colocada en una placa de Petri (d = 90 mm.) sobre un papel filtro empapado con una parte de la solución de polimerización, es fijada con un anillo de vidrio (d = 80 mm.) y es recubierta inmediatamente con el resto de la solución de polimerización (en total, 20 ml. de 20 g/l de cloruro de vinilbencilo VBC, es emulsionada en agua saturada con BP con la adición de 7 g/l de emulsionante sal sódica de Bis[2-etilhexil]sulfosuccinato a 10.000 rpm durante 30 segundos con un Thurrax).

La placa de Petri es agitada durante 30 minutos y es cubierta con una placa de vidrio (filtro ultravioleta profundo, corte 310 nm.). La irradiación tiene lugar con media carga en un secador ultravioleta (Beltron-GmbH; 1 min. de irradiación ultravioleta por paso a través de la zona de irradiación). A continuación, la membrana es extraída una hora en un Soxhlet con metanol y una hora a 50°C en agua. Después, la membrana modificada es secada y el grado de modificación (DG) es determinado gravimétricamente.

DG = 1.5 mg/cm² = 9.5 μmol/cm². Otra caracterización se realiza mediante espectroscopia FTIR-ATR. REM. Enlace de colorante (azul toluidina), así como la medición de la permeabilidad de la membrana.

ES 2 283 131 T3

Ejemplo 5

Síntesis de soportes en fase sólida poliméricos continuos membranas de hidroxi-PEG-éster-PP - bajo condiciones tecnológicas

Una membrana de PP (Accurel 2E, Akzo; $d_p = 0.2 \mu\text{m}$, o AN06, Millipore Corp; $d_p = 0.6 \mu\text{m}$) con un área de 18 cm x 26 cm es pesada y, a continuación, es agitada en solución de BP en metano o acetona durante dos horas a temperatura ambiente. La membrana aún húmeda, recubierta con BP es colocada y empapada en una cubeta con 300 ml. de solución monomérica (PEGMA 526 en agua saturada con BP) sobre papel de filtro. La cubeta es cubierta con una placa de vidrio (filtro ultravioleta profundo, corte 310 nm.). La irradiación tiene lugar con media carga en un secador ultravioleta (Beltron GmbH; 1 min. de irradiación ultravioleta por paso a través de la zona de irradiación). A continuación, la membrana es extraída una hora en un Soxhlet con metanol y una hora a 50°C en agua. Después, la membrana modificada es secada y es determinado gravimétricamente el grado de modificación. La caracterización de la membrana se realiza de manera análoga a como está descrito en el ejemplo 1.

Con la elección de las condiciones de la síntesis (recubrimiento del fotoiniciador, Concentración de monómeros, duración de la irradiación) el grado de modificación puede ser variado y puede ser ajustado para distintos tipos de membrana soporte (ejemplos, véase la tabla 1).

Ejemplo 6

Síntesis de soportes en fase sólida poliméricos continuos - membranas de carboxilo-PP - bajo condiciones tecnológicas

Una membrana de PP (Accurel 2E, Akzo; $d_p = 0.2 \mu\text{m}$, o AN06, Millipore Corp; $d_p = 0.6 \mu\text{m}$) con un área de 18 cm x 26 cm es pesada y, a continuación, es agitada en solución de BP en metano o acetona durante 5 min. a temperatura ambiente. La membrana aún húmeda, recubierta de BP, es colocada y empapada en una cubeta con 300 ml. de solución de monómeros (AA en agua saturada con BP) sobre papel de filtro. La cubeta es cubierta con una placa de vidrio (filtro ultravioleta profundo, corte 310 nm.). La irradiación se realiza con media carga en un secador ultravioleta (Beltron GmbH; 1 minuto de irradiación ultravioleta por paso a través de la zona de irradiación). A continuación, la membrana es extraída 1 hora en un Soxhlet con metanol y 1 a 50°C en agua. Después, la membrana modificada es secada y el grado de modificación es determinado gravimétricamente. La caracterización de la membrana se realiza de manera análoga a como está descrita en el ejemplo 2.

Con la elección de las condiciones de la síntesis (recubrimiento del fotoiniciador, concentración de monómeros, duración de la irradiación), el grado de modificación puede ser variado y puede ser ajustado para distintos tipos de membrana soporte (ejemplos, véase la tabla 1).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Condiciones tecnológicas de la síntesis para membranas de hidroxí-PEG-éster y de carboxilo-PP seleccionadas (membrana: 1 0'2 μm , Accurel 2E; 2 0'6 μm , AN06; irradiación ultravioleta con media carga con secador ultravioleta, Beltron GmbH)

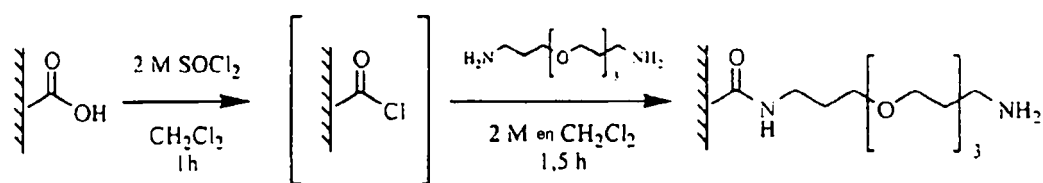
Membrana	Recubrimiento del fotoiniciador	Monómero	Monómero (g/l)	Irradiación (min.)	DG (mg/cm ²)	DG ($\mu\text{mol/cm}^2$)
1	150mM BP/acetona	PEGMA 526	78'5	15	1'28	2'4
1	150mM BP/acetona	AA	23'3	10	0'48	6'8
1	150mM BP/acetona	AA	50'0	10	0'64	9'0
2	100mM BP/acetona	PEGMA 526	78'5	10	0'19	0'36
2	100mM BP/acetona	PEGMA 526	100'0	10	0'34	0'65
2	100mM BP/acetona	AA	50.0	10	0'13	1'8
2	150mM BP/acetona	AA	50'0	5/5*	0'17	2'4
*Membrana irradiada por ambos lados						

Ejemplo 7

Síntesis de soportes en fase sólida poliméricos continuos - derivación química de una membrana de carboxilo-PP (funcionalización amino)

Un pedazo de membrana (0'2 μm ; del ejemplo 6) del tamaño 18 cm x 26 cm fue tratada en una cubeta de instrumentos una hora con 80 ml. de una solución 2 M de cloruro de tionilo en DCM. La solución fue decantada y la membrana aún húmeda fue mezclada inmediatamente con 100 ml. de una solución de 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina al 30% en DCM (v/v). Después de 90 min., fue decantada y la membrana fue lavada (1 x DCM, 5 x metanol, cada 5 min.) y secada (esquema 1).

Esquema 1



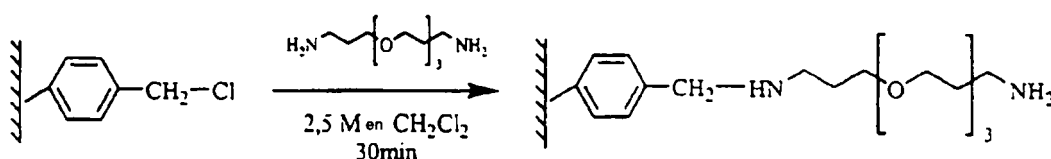
Ejemplo 8

Síntesis de soportes en fase sólida poliméricos continuos - derivación química de una membrana de cloruro de bencilo-PP (funcionalización amino)

Un pedazo de membrana (0'2 μm ; del ejemplo 4) del tamaño 5 cm X 3 cm fue tratado en una cubeta de instrumentos 30 min. con una solución 2'5 M de 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina en DCM (v/v) a temperatura ambiente. A continuación, la solución fue decantada y la membrana fue lavada (1 x DCM, 3x DMF, 3x MeOH, 2x DCM, cada 5 min.) y secada (esquema II). Carga 102 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$.

Un pedazo de membrana (0'2 μm ; del ejemplo 4) del tamaño 5 cm X 3 cm fue tratado en una cubeta de instrumentos 30 min. con una solución 2'5 M de 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina en DCM (v/v) a 80°C. A continuación, la solución fue decantada y la membrana fue lavada (1x DCM, 3x DMF, 3x MeOH, 2x DCM, cada 5 min.) y secada (esquema II). Carga 152 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$.

Esquema II



Ejemplo 9

Ensayo de diferentes sistemas de enlazadores en membranas de hidroxí-PEG-éster-PP

Se cambió la funcionalización de una membrana de hidroxí-PEG-éster-PP (0'2 μm , del ejemplo 1) mediante manchado sucesivo de 1 μl de una solución 0'6 M de NMI en NMP y 1 μl de una solución 0'6 M de Fmoc- β Ala-F en NMP (amino: tiempo de reacción 2 x 30 min.). Tras la disociación total del grupo protector Fmoc (baño de la membrana en piperidina/DMF al 20%. 2x15 min.) y siguiente lavado con DMF (2x), metanol (2x) y DCM (2x) y secado al aire, las siguientes moléculas enlazadoras activadas fueron manchadas sobre las funciones amino libres, teñidas con azul bromofenol:

A) 2 μl de enlazador Rink 0'6 M ácido (p-[(R,S)- μ [1-(9H-fluoreno-9-il)-metoxiformamido]2,4-dimetoxibencil]-fenoxiacético) en NMP (5 min. preactivado con 1 Eq. TBTU y 2 Eq. DIEA)

B) 2 μl de enlazador de imidazol 0'6 M en NMP (5 min. preactivado con 1 Eq. TBTU y 1 Eq. DIEA)

C) 2 μl de fotoenlazador de aminoetilo 0'6 M ácido 4-[2-metoxi-4-(1-Fmoc-aminoetil)-5-nitrofenoxi]-butanoico) en NMP (5 min. preactivado con 1 Eq. TBTU y 1 Eq. DIEA)

D) 2 μl de fotoenlazador de hidroxietilo 0'6 M ácido 4-[2-metoxi-4-(hidroxietil)-5-nitrofenoxi]-butanoico) en NMP (5 min. preactivado con 1 Eq. TBTU y 1 Eq. DIEA).

El tiempo de reacción ascendía en todos los casos a 2 x 30 min. Tras la disociación de los grupos Fmoc, el péptido modelo (Ac-Leu-Lys-Tyr- β Ala) fue configurado mediante Fmoc-aminoácido-OPfp-ésteres (2 μl , 0'3 M en NMP, 2 x 15 min.) bajo condiciones de síntesis de mancha. Junto a la síntesis en sistemas enlazadores, también fue llevada a cabo una síntesis directamente sobre la membrana modificada por β Ala. Seguidamente al manchado del 1er aminoácido, la membrana fue acetilada para definir el tamaño de la mancha (Ac₂O, DIEA, DMF; 1:2:7; 30 min.). Tras la disociación del último grupo Fmoc, los péptidos fueron acetilados de nuevo. Los grupos protectores de cadena lateral fueron desbloqueados en el caso del enlazador de imidazol, del fotoenlazador y de la síntesis directa sin enlazadores mediante H₂O al 5% en TFA (2 h.). A continuación, los péptidos fueron disociados como sigue:

Enlazador Rink: 2 h. TFA al 95%; H₂O al 5%

Enlazador de imidazol: 1 h. tampón de fosfato pH: 7.4

Fotoenlazador (C+D): disociación en el estado seco mediante radiación ultravioleta: 2 h., 365 nm.

Tras la evaporación del TFA y la absorción de los péptidos ligados de manera adhesiva, en ACN/H₂O al 50%, la calidad de los productos fue controlada mediante HPLC y análisis espectrométrico de masa. Todos los enlazadores empleados sobre los nuevos soportes en fase sólida hicieron posible el aislamiento de los productos con pureza de HPLC elevada (>85%).

Ejemplo 10

Síntesis comparativa de péptidos sobre celulosa utilizada convencionalmente y membranas de hidroxí-PEG-éster-PP

Las membranas de celulosa y de hidroxí-PEG-éster-PP (0'2 μ m, del ejemplo 1) fueron aciladas con Fmoc- β Ala-F/NMI en NMP y, tras la disociación del grupo Fmoc (piperidina/DMF al 20%, 20 min.), fueron modificadas con el enlazador fotolizable ácido 4-2[-metoxi-4-(1-Fmoc-aminoetil)-5-nitrofenoxi]-butanoico). Los siguientes péptidos de diferente longitud de cadena fueron configurados paso a paso mediante aminoácido protegido por Fmoc-ésteres de pentafluorofenilo (2 μ l de una solución 0'3 M en NMP, doble acoplamiento 2 x 15 min.) bajo condiciones idénticas:

Ac-Val-Val-Ser-H is-Phe-Asn-Asp-Gly- β Ala

c-Tyr-Ala-Lys-Arg-Cys-Pro-Val-His-Thr-Met- β Ala

Ac-Trp-His-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr- β Ala

La función amino N-terminal fue acetilada y los grupos protectores de cadena lateral fueron disociados en TFA 2'5 horas mediante H₂O al 5%, fenol al 5%, TIPS al 2'5%. Tras lavado a fondo con DCM y metanol, las membranas fueron secadas y los péptidos fueron disociados de la superficie mediante irradiación con luz ultravioleta (2 horas, 365 nm.). Los compuestos ligados de manera adhesiva sobre la membrana pudieron ser desligados tras el estampado y transporte en placas de microtítulo mediante tampón y pudieron ser aportados a la analítica HPLC/MS.

En todos los casos, los péptidos producidos en la membrana de hidroxí-PEG-éster-PP poseen una pureza de producto más elevada que los sintetizados en celulosa convencional, como se prueba mediante los perfiles analíticos de la prueba.

Ejemplo 11

Síntesis de moléculas orgánicas pequeñas: biblioteca de 1,3,5-triazina

Sobre una membrana de carboxilo-PP aminoderivado (véase el ejemplo 7) fueron manchados 2'3 μ l de una solución 0'5 M de ácido p-[(R,S)-a-[1-(9H-fluoreno-9-il)-metoxiformamido]2,4-dimetoxibencil]-fenoxiacético (enlazador Rink), TBTU (1 Eq.) y DIEA (2 Eq.; tiempo de preactivación: 5 min.) en la distancia de entre 0'8 y 1 cm. Tras 15 minutos, se repitió el punteado. Tras otro 15 minutos, la membrana fue lavada dos veces 5 minutos con MeOH y dos veces 10 minutos con DCM. A continuación, el procedimiento de mancha fue repetido. Tras la cuantificación del Fmoc, se obtuvieron cargas de aproximadamente 700 nmol/cm², lo que se correspondía con aproximadamente > 90% de la densidad de funcionalidad de la membrana de polipropileno aminoderivado.

La membrana derivada con el enlazador Rink (100 cm²; 96 manchas) fue bañada dos veces durante 25 minutos en 75 ml. de solución de piperidina al 25% en DMF y, a continuación, cada vez dos veces durante 10 minutos con cada vez 50 ml. de DMF, MeOH y DCM. Para la acilación de la función amino libre una solución 0'6 M del aminoácido fue manchada con un equivalente TBTU y dos equivalentes DIEA en DMF sobre la membrana (2 μ l por mancha). Tras 15 minutos, el procedimiento fue repetido. Tras el tiempo de reacción finalizado, la membrana fue lavada dos veces cada vez 10 minutos con cada vez 50 ml. de DMF, MeOH y DCM. La desprotección de la función amino tuvo lugar de nuevo mediante baño dos veces de la membrana durante 25 minutos en 75 ml. de solución de piperidina al 25% en DMF y lavado siguiente (cada uno doble, 10 minutos con cada vez 50 ml. de DMF, MeOH y DCM).

La membrana derivada de aminoácido fue vertida entonces con una solución 3 M de cloruro de cianuro con DABCO al 3% en DCM a 4°C y fue agitada 15 minutos a 4°C y 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la membrana fue lavada tres veces con 50 ml. de DCM, dos veces con ACN (50 ml.) y dos veces con 50 ml. de DCM cada vez 10 minutos.

Para la sustitución de los átomos de cloro en el derivado de la 1,3,5-triazina ligado en fase sólida, se mancharon 2 μ l de una solución al 60% de aminas primarias o secundarias (NHR₂R₃) en NMP sobre la membrana prederivada e hizo reaccionar en el recipiente cerrado 25 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la membrana fue lavada tres veces con cada vez 75 ml. de DMF (20 minutos), dos veces con cada vez 75 ml. de MeOH (20 minutos) y tres veces con cada vez 75 ml. de DCM (15 minutos). Sobre la membrana secada al aire, se manchó en una cubeta de vidrio la amina prim. o sec. para la sustitución del átomo de cloro que aún queda (2 μ l de una solución al 80% en NMP) y la membrana es calentada en una microonda 3 minutos. Las aminas excedentes fueron retiradas de la membrana con DMF (3x cada vez 75 ml., 20 minutos), ácido acético acuoso al 0'1% (75 ml., 20 minutos), MeOH (tres veces cada vez 75 ml., 20 minutos), MeOH (tres veces cada vez 75 ml., 20 minutos) y DCM (tres veces cada vez 75 ml., 20 ml.).

La disociación de las moléculas tuvo lugar tras el estampado y transporte en placas de microtítulo mediante 150 μ l de TFA/DCM al 90% por mancha (35 min., 30°C). Tras descargar el TFA en la corriente de nitrógeno, las sustancias fueron absorbidas y analizadas en sistemas de tampón correspondientes.

Ejemplo 12

Síntesis: de moléculas orgánicas pequeñas: (N-bencil-N-[butil-(carbamoilmetilcarbamoil-metil) carbamoilmetil-2-piperidina-1-il]-acetamida) peptoides

Una membrana de carboxilo-PP aminoderivado (véase el ejemplo 7; compare el ejemplo 11) fue tratada con 30 ml. de una solución 0'3 M de Fmoc-glicina en DMF (30 min.), después de que la solución fuera preactivada con 1 Eq. TBTU y 2 Eq. DIEA. Tras el lavado de la membrana y la disociación del grupo protector (3x DMF, cada vez 5 min., 1 x piperidina/DMF al 20%, 20 min. 5 x DMF, cada vez 5 min.), la membrana fue mezclada de nuevo con 30 ml. de una solución recién preparada de Fmoc-glicina preactivado. Tras 30 min. de tiempo de reacción y lavado de la membrana con DMF (3 x 5 min.), cuatro muestras de la membrana fueron estampadas (0'23 cm²) para determinar el grado de revestimiento de la membrana conseguido químicamente. Para ello, las muestras fueron mezcladas por separado con exactamente 1'00 ml. de una solución de piperidina al 20% en DMF y la absorción ultravioleta fue medida en 301 nm. Se consiguió un grado de revestimiento de 0'45 µmol/cm² (se corresponde con el 10% de la carga determinada gravimétricamente).

La membrana provista de dos espaciadores de glicina fue modificada entonces como se describe en el ejemplo 9 con el sistema enlazador Rink y funciones amino no transformadas fueron acetiladas (Ac₂O, DIEA, DCM; 1:2:7). La función amino liberada tras la disociación del grupo protector Fmoc, lavado y secado fue amidada mediante la aplicación por pipeteado de 0'2 µl de una solución 0'3 M de Fmoc-glicina-éster de pentafluorofenilo en NMP (3 x 15 min.) La membrana fue lavada como se describe arriba y el grupo Fmoc fue disociado.

La función amino fue acilada entonces mediante pipeteado de 0'2 µl de una solución 1 M de ácido bromoacético-2, 4-dinitrofeniléster en NMP (3 x 15 min.). Tras el lavado mediante DMF (3 x 5 min.) y metanol (3 x 5 min.) y siguiente secado al aire, se substituyó nucleófilamente el bromo mediante manchado de 0'2 µl de n-butilamina (5 M en NMP, 3 x 15 min.). Tras el lavado (3 x 5 min. DMF, 3 x 5 min. metanol) y secado al aire, fueron llevados a cabo otros dos ciclos de la síntesis, que se diferencian por la naturaleza de las aminas utilizadas (ciclo 2: n-butilamina; ciclo 4: piperidina).

Las manchas estampadas fueron disociadas como se describe en el ejemplo 9 mediante TFA y los productos fueron aislados y analizados. Todos los productos examinados mostraron la identidad esperada con una pureza HPLC de >70%.

Ejemplo 13

Síntesis de híbridos oligómeros de péptidos y peptoides (peptómeros)

Sobre una membrana de carboxilo-PP aminoderivado (véase el ejemplo 7), 2'5 µl de una solución 0'6 M de ácido 4-(metoxi-4-(2-Fmoc-aminoetil)-5-nitrofenoxil)-butanoico (enlazador amida fotolábil), TBTU (1 Eq.) y DIEA (2 Eq.; tiempo de preactivación: 5 min.) fue manchado en la distancia de entre 0'1 y 1'5 cm. Tras 15 minutos, el manchado fue repetido. Tras otros 15 minutos, la membrana fue lavada tres veces 5 minutos con DMF, dos veces 5 minutos con MeOH y dos veces 10 minutos con DCM. A continuación, fue repetido el procedimiento de mancha. Se obtuvieron tras la cuantificación del Fmoc cargas de aproximadamente 700 nmol/cm², lo que se correspondía con aproximadamente el 90% de la densidad de funcionalidad de la membrana de polipropileno aminoderivado.

Las funciones amino no transformadas con el enlazador amida fotolábil son acetiladas (Ac₂O, DIEA, DCM; 1:2:7; 30 min.) y, a continuación, son lavadas tres veces 5 minutos en DMF. El grupo protector de Fmoc del enlazador es disociado mediante dos baños de 25 minutos de la membrana en 75 ml. de piperidina al 25% en DMF. A continuación, la membrana es lavada dos veces cada vez 10 minutos con cada vez 50 ml. de DMF, MeOH y DCM.

Para la acilación de las funciones amino del enlazador liberadas son punteados (2'5 µl por punto) sobre la membrana Fmoc-aminoácido-éster de pentafluorofenilo (0'3 M en NMP; manchas de aminoácido) o ácido bromoacético-2, 4-dinitrofeniléster (1'0 M en NMP; manchas de peptoides). Este procedimiento es repetido en total tres veces durante cada vez 15 minutos. Tras el tiempo de reacción finalizado, la membrana es lavada dos veces cada vez 10 minutos con cada vez 50 ml. de DMF, MeOH y DCM. La desprotección de las funciones amino del Fmoc de los puntos de aminoácido tiene lugar mediante punteado tres veces durante 15 minutos con solución de piperidina/NMP al 50%. Simultáneamente, tiene lugar la sustitución de las funciones del bromo de los puntos de peptoides mediante punteado de soluciones de entre uno y cinco molares de aminas primarias y secundarias en DMF, NMP, DMSO, dimetilacetamida o agua. Tras el tiempo de reacción finalizado, la membrana es lavada dos veces cada vez 10 minutos con cada vez 50 ml. de DMF, MeOH y DCM.

La acilación de las funciones amino primarias (puntos de aminoácidos) y funciones amino secundarias (puntos de peptoides) tiene lugar o mediante punteado (3 x 15 minutos) de soluciones 0'3 M de Fmoc-aminoácido-ésteres de pentafluorofenilo en NMP (puntos de aminoácidos), 0'3 M de Fmoc-aminoácido-anhídridos en NMP (puntos de peptoides) o de una solución 1'0 M de ácido bromoacético-2, 4-dinitrofeniléster en NMP (puntos de aminoácidos y de peptoides). Tras el tiempo de reacción finalizado, la membrana es lavada dos veces cada vez 10 minutos con cada vez 50 ml. de DMF, MeOH y DCM. A continuación, la síntesis es continuada como se describe arriba.

ES 2 283 131 T3

Los Fmoc-aminoácido-anhídridos son generados a partir de los aminoácidos Fmoc (0'6 M de aminoácido Fmoc en NMP; adición de 0'5 Eq. DIC; preactivación: 30 min.).

Tras la finalización de la síntesis, los grupos protectores de cadena lateral son disociados (H₂O al 5%, fenol al 5%, TIPS al 2'5% en TFA). Tras un lavado a fondo con DCM y metanol, las membranas son secadas y los péptidos son disociados de la membrana mediante irradiación con luz ultravioleta (365 nm., 7 mW/cm², 90 min.). Los compuestos ligados de manera adhesiva pudieron ser disociados tras el estampado y transporte en placas de microtítulo mediante tampón y pudieron ser agregados a la analítica HPLC/MS. Los diferentes peptómeros mostraban calidades de producto elevadas comparables, donde el pico mayor en cada caso se correspondía con la masa objetivo del producto deseado.

Ejemplo 14

Exámenes sobre la biocompatibilidad: estudio de enlaces de anticuerpos sobre membranas de polímeros

El epítoto Ac-Leu-Pro-Asn-Met-Leu-Arg-Asp-Leu-Arg-Asp-Ala-Phe-Ser-Arg-Val-βAla (epítoto mAk CB/RS/13); Ac-Ile-Phe-Ile-Asn-Tyr-Ile-Glu-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-βAla (epítoto mAk CB/RS/11); Ac-Val-Val-Ser-His-Phe-Asn-Asp-βAla (epítoto mAk Tab2) y la secuencia de ensayo no específica Ac-His-Val-Asn-Ser-Leu-Gly-Glu-Asn-Leu-Lys-Thr-Leu-Arg-Leu-Arg-βAla fueron sintetizados cada uno de manera paralela sobre membranas de celulosa y de polipropileno convencionales bajo las condiciones de la síntesis de mancha (véase el ejemplo 10). Tras la disociación de los grupos protectores de cadena lateral (2'5 horas; TFA al 94%, TIPS al 3%, H₂O al 2%, fenol al 1%) y lavado con DCM (3x), DMF (4x) y metanol (2x), la membrana mojada en metanol fue lavada 3 x 10 minutos con salina tamponada de tris (T-TBS) pH 8.0. A continuación, la membrana fue incubada con tampón de bloqueo (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) durante 2 horas y entonces fue lavada 3 x 10 minutos con tampón T-TBS (pH 8.0). La membrana tratada así fue incubada entonces durante una hora con anticuerpos anti-ratón-IgG policlonales marcados con peroxidasa (POD) (tampón de bloqueo de 0'1 μg/ml). La solución de anticuerpos fue desechada y la membrana fue lavada 3 X 10 minutos con tampón T-TBS (TBS/Tween® 20 pH 8.0). Finalmente, la membrana de polímeros fue agitada con un sustrato de quimioluminiscencia (Boehringer Mannheim) y la actividad enzimática fue registrada con el generador de imágenes luminiscentes (Boehringer Mannheim).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 283 131 T3

λ	Lambda (longitud de onda)
AA	ácido acrílico
Ac	Acetilo
Ac ₂ O	anhídrido de ácido acético
ACN	Acetonitrilo
RTA	Reflexión total atenuada
BP	Benzofenona
Chem. Rev.	Chemical Reviews
d	Diámetro
DABCO	Diazabicycloundecano
DCM	Diclorometano
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIEA	Diisopropiletilamina
DMF	N,N'-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ADN	Ácido desoxiribonucleico
dp	Diámetro de poro
ELISA	ensayo inmunsorbente ligado a enzimas
Eq.	Equivalente
Fmoc	9-fluorenilmetiloxycarbonilo
Fmoc- β Ala-F	N-(9-fluorenilmetiloxycarbonilo)- β -fluoruro de alanina
FTIR	Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier
h	Horas
HMBA	ácido 4-hidroximetilbenzoico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
esenc.	esencialmente
J. Am. Chem. Soc.	Journal of the American Chemical Society
Leu	Leucina
Lys	Lisina
M	Moles por litro
MeOH	Metanol
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MS	Espectrometría de masa
NMI	N-metilimidazol
NMP	N-metilpirrolidona

ES 2 283 131 T3

OPfp	Éster de pentafluorofenilo
PE	Polietileno
PEG	Polietilenglicol
pH	Logaritmo decádico negativo de la concentración de iones de hidrógeno
PP	Polipropileno
prim.	primario
%	por ciento
REM	Microscopio electrónico de barrido
ARN	Ácido ribonucleico
sec.	Secundario
βAla	Beta-alanina
TBTU	tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
Tetrahedron Lett.	Tetrahedron Letters
TFA	Ácido trifluoroacético
TIPS	Triisopropilsilano
Tyr	Tirosina
rpm	Revoluciones por minuto
UV Ultravioleta	Ultravioleta
v/v	volumen en volumen

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la fabricación de un soporte en fase sólida polimérico continuo, comprendiendo una matriz
 5 soporte al menos de un material polimérico así como cadenas de copolímeros de injerto ligadas a la matriz soporte de manera covalente, los cuales presentan grupos reactivos reaccionables con compuestos orgánicos, donde las cadenas de copolímeros de injerto configuran lugares de reacción definidos espacialmente, con los pasos

(a) Recubrimiento de una superficie de la matriz soporte con un fotoiniciador que sea apropiado para generar
 10 después de la estimulación ultravioleta radicales mediante abstracción de hidrógeno en la superficie de la matriz soporte, donde antes del recubrimiento no tiene lugar ningún tratamiento previo de la superficie con un fotoiniciador y al menos un monómero,

(b) Irradiación de la matriz soporte recubierta con radiación ultravioleta en presencia al menos de un monómero
 15 funcional no saturado, comprendiendo un grupo reactivo como también un grupo polimerizable, con lo cual se forman las cadenas de copolímeros de injerto ligadas a la matriz soporte de manera covalente a través del grupo polimerizable, y con lo cual la irradiación es llevada a cabo en ausencia de un monómero reticulado, y

(c) Extracción de monómeros funcionales no transformados del fotoiniciador así como de productos secuenciales
 20 solubles.

2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** por el hecho de que como fotoiniciador es utilizada benzofenona o un derivado de la benzofenona o una cetona relacionada estructuralmente con la benzofenona.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2 **caracterizado** por el hecho de que el al menos un monómero
 25 funcional presenta un grupo de espaciadores al que está ligado de manera covalente tanto el grupo reactivo como el grupo polimerizable, en especial a través de un grupo amida, éster, éter, disulfuro o CC.

4. Procedimiento según la reivindicación 3 **caracterizado** por el hecho de que el grupo espaciador es un oligoeti-
 30 lenglicol o un polietilenglicol.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por el hecho de que el grupo poli-
 merizable comprende un enlace múltiple reactivo.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** por el hecho de que el grupo polimerizable es un grupo
 35 acrilato, vinilo o alilo.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por el hecho de que el grupo reactivo
 40 es un grupo hidroxilo, amino, carboxilo, epoxi, mecapto o halógeno.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por el hecho de que el al menos un
 monómero funcional es elegido del grupo comprendiendo polietilenoglicol metacrilato, amino(polietilenoglicol)meta-
 crilato, amino(polietilenoglicol)metacrilamida, ácido acrílico, 2-hidroxipropilmetacrilamida y cloruro de vinilbencilo.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por el hecho de que la matriz soporte
 45 polimérica comprende al menos un polímero basado en una estructura base poliolefínica, en especial polipropileno, polietileno, fluoruro de polivinilideno, politetrafluoretileno o poliestireno reticulado.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por el hecho de que después de la
 50 copolimerización de injerto es cambiada químicamente la funcionalización del grupo reactivo.

11. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por el hecho de que un enlace entre
 el grupo reactivo y el grupo de espaciadores o entre el grupo de espaciadores y el grupo polimerizable es disociable
 hidrolíticamente y/o de manera oxidativa/reductiva.

12. Uso de un soporte en fase sólida polimérico continuo producido según una de las reivindicaciones 1 a 11 para la
 55 síntesis combinatoria y paralela de compuestos, donde la síntesis comprende un manchado secuencial de componentes de la síntesis activados o reactivos sobre los distintos lugares de reacción del soporte en fase sólida, de manera que es obtenida una biblioteca de compuestos ligados al soporte en fase sólida a través de los grupos funcionales de la cadena de copolímeros de injerto y cada lugar de reacción del soporte en fase sólida determina la composición del compuesto sintetizado.

13. Uso según la reivindicación 12, **caracterizado** por el hecho de que los compuestos sintetizados son disociados
 65 de la matriz soporte o permanecen ligados tras la síntesis.

14. Uso según las reivindicaciones 12 ó 13, **caracterizado** por el hecho de que se utiliza una pluralidad de soportes
 en fase sólida funcionalizados de manera idéntica o diferente en forma de un conjunto o una pila para la síntesis
 paralela y combinatoria de compuestos disociables de manera múltiple o gradual.

15. Uso según una de las reivindicaciones 12 a 14, **caracterizado** por el hecho de que los compuestos sintetizados a partir de componentes de la síntesis activados son péptidos, proteínas, peptoides, peptómeros, oligocarbamato, oligoureas, azátidas, quétidos, sulfonamidas de péptidos, péptidos de sulfonilo vinílogos, ácidos desoxinucleicos o ácidos nucleicos de péptidos.

5

16. Uso según una de las reivindicaciones 12 a 14, **caracterizado** por el hecho de que la síntesis de los compuestos comprende un manchado secuencial de reactivos sobre una estructura central ligada al soporte en fase sólida, donde pueden ser introducidos grupos variables.

10

17. Uso según la reivindicación 16, **caracterizado** por el hecho de que la síntesis de los compuestos comprende un paso de heterociclación y/o reacciones de varios componentes.

15

18. Uso según la reivindicación 16 ó 17, **caracterizado** por el hecho de que los compuestos sintetizados son compuestos orgánicos pequeños, en especial benzodiazepinas, triazinas, triazolas, hidantoínas, cubanos, xantinas, pirolidinas, í- lactamos, tiazolidonas, isoquinolinas o diquetopiperazinas.

20

19. Uso de un soporte en fase sólida polimérico continuo producido según una de las reivindicaciones 12 a 18, que porta los compuestos ligados a éste, para la identificación de ligandos, donde la identificación comprende una incubación del soporte en fase sólida con el ligando que ha de ser identificado, una retirada de ligandos sobrantes mediante lavado y detección de los ligandos ligados a los compuestos del soporte en fase sólida mediante un procedimiento apropiado.

25

20. Uso según la reivindicación 19, **caracterizado** por el hecho de que el procedimiento para la detección es una determinación inmunológica, una determinación de ligandos marcados radioactivamente, una determinación de la fluorescencia o de la quimioluminiscencia o una determinación biosensorial.

30

21. Uso de un soporte en fase sólida polimérico continuo producido según una de las reivindicaciones 12 a 18, que porta los compuestos ligados a éste, para la evaluación de una actividad enzimática de enzimas, donde la evaluación comprende una incubación del soporte en fase sólida con la enzima y detección de la actividad enzimática de la enzima ligada a los compuestos.

35

40

45

50

55

60

65

