

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

WEB SITE: www.caveller.com
E-MAIL: caveller@caveller.com

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S.

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación : 02061736 00000001 Folios: 22
Fecha (ADM): 2002-11-19 17:04:28
Trámite : 002 PATENTES y REGISTRO/ 329 COMPLETA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Trámite : 002
Evento : 001
Actuación: 329

Referencia : Expediente No. 02.061.736
Solicitante : AKZO NOBEL N.V.
Asunto : Solicitud de patente para: PROCESO PARA LA
SÍNTESIS RAPIDA DE PEPTIDOS EN SOLUCION
Fecha de presentación : 17 de julio de 2002

Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, atentamente presento la traducción al español de la copia básica Europea No. 01202753.8, presentada el 19 de julio de 2001. El documento original de prioridad se presentó junto con la solicitud.

Atentamente solicito que se continúe con su tramitación.

Bogotá, 19 NOV 2002
Señora Jefe,



EMILIO FERRERO
T.P.A. No. 31.929

Colo: 11214-801-027-8
JBP/mrm-Id-189-

OFICINA DE PATENTES EUROPEA

Certificado

Los documentos adjuntos son copias exactas de la solicitud de patente europea descrita en la siguiente página, como fue presentada originalmente.

Solicitud de patente No. 01202753.8

Por el Presidente de la Oficina de Patentes de Europea

(Firmado ilegible)

R C van Dijk

La Haya, 19/06/02

61

61

OFICINA DE PATENTES EUROPEA

Página 2 del certificado

Solicitud Nº 01202753-8 Fecha de presentación 19/07/01

Solicitante (s)

AKZO NOBEL N.V.

6824 BM Arnhem

Holanda

Título del invento: PROCESO PARA LA SÍNTESIS RAPIDA DE OLUCION DE PEPTIDOS.

Prioridades reivindicadas

País	Fecha	Archivo Nº
-------------	--------------	-------------------

Clasificación Internacional de Patente:

Países contratantes designados en la fecha de presentación:

AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE

Observaciones:

82
62

PROCESO PARA LA SINTESIS RAPIDA DE SOLUCION DE PEPTIDOS

La invención se relaciona con un proceso nuevo y versátil para la síntesis rápida de solución de péptido en donde el péptido creciente esta presente en una fase orgánica permanente y no esta aislado antes de que se complete el ensamblaje de la secuencia deseada.

Los pépticos son sintetizados bien sea sobre un soporte sólido o e solución. En ambas aproximaciones las etapas de acoplamiento y desprotección se alternan repetitivamente y como dependiendo de la aproximación, se pueden separar mediante purificaciones intermitentes.

En la aproximación de fase sólida, se ensambla una secuencia completamente mientras que se une a un soporte sólido antes de que este sea eventualmente separado de dicho soporte. La remoción del exceso de reactivos o subproductos toma lugar mediante filtración. La síntesis de fase sólida claramente tiene ventajas: es más o menos generalmente aplicable y fácil de automatizar. Sin embargo, esta tiene algunos serios inconvenientes. Por ejemplo, las reacciones son controladas por difusión y son usualmente más lentas bajo las condiciones

heterogéneas aplicadas: con el fin de evitar la supresión de excesos de secuencias de los reactivos que son necesarios. Además, las cadenas laterales reactivas del péptido creciente se pueden proteger: desde que no tengan lugar purificaciones intermitentes, reacciones laterales debido a la presencia de cadenas laterales no protegidas que puedan conducir a impurezas en el producto final. La aproximación de fase sólida es difícil de escalar y es costosa en términos de reactivos y materiales.

La aproximación de solución clásica de otra parte, es fácil de escalar y es menos costosa e término de reactivos y materiales. Los aminoácidos completamente protegidos no son usualmente necesarios en razón a que los subproductos que resultan de las reacciones laterales de las cadenas laterales no protegidas se pueden remover mediante purificaciones intermitentes. Sin embargo, la aproximación de fase de solución requiere los protocolos específicos de secuencia y la producción de una secuencia completa es un proceso que consume tiempo.

En razón de los inconvenientes de estas aproximaciones es necesario un proceso que combine las ventajas tanto de los métodos clásicos, en particular de

la síntesis a gran escala de péptido. Un nuevo proceso debe ser rápido, fácil de escalar y generalmente aplicable. En la síntesis de fase de solución, un ligero exceso de un componente carboxílico activado se utiliza preferiblemente en cada etapa de acoplamiento para asegurar el acoplamiento cuantitativo de un componente amino, de tal manera que la ocurrencia de secuencias de supresión en el producto final se puedan evitar. Se asume usualmente que el componente carboxílico recibe el activado se destruye y se remueve durante el trabajo acuoso intermitente. Las secuencias de inserción de péptido sin embargo, se encuentra a menudo como impurezas del péptido final debido a la remoción incompleta del componente carboxílico residual (activado) después de una etapa de acoplamiento, que subsecuentemente se ha acoplado luego de desprotección. Con el fin de evitar la ocurrencia de dichas reacciones laterales se puede introducir una etapa de desoxidación directamente después de la etapa de acoplamiento para desoxidar (inactivar) las funciones carboxílicas residuales activadas. Las aminos son usualmente aplicadas como desoxidantes. El uso de poliaminas como desoxidantes conduce a compuestos desoxidados que pueden ser extraídos activamente en una-preferiblemente ácida-fase acuosa, dependiendo de su

polaridad [por ejemplo Kisfaludy, L. et al. (1974) Tetrahedron Lett. 19, 1785-1786]. Esta extracción se desarrolla usualmente antes de la etapa de desprotección para evitar la pérdida de péptidos crecientes dentro de la fase acuosa. Sin embargo, este procedimiento se ha encontrado en numerosos casos que da como resultado una purificación intermitente incompleta debido a la hidrofobicidad de los compuestos desoxidados: la hidrofobicidad intrínseca de las partes amino acilo del componente carboxílico se mejora por los grupos protectores amino aun presentes. La extracción acuosa no es así completamente efectiva. Recientemente, Carpino, L. A. et al. [(1999) J. Org. Chem. 64, 4324-4338] reportó una mejora del método desoxidante. Además del uso de una poliamina como desoxidante el grupo amino protector 1,1-dioxobenzotiofeno-2-ilmetoxicarbonil (Bsmoc) se aplicó en el proceso. La función de Bsmoc tiene una muy alta labilidad hacia la base. Como resultado de esto, las funciones carboxílicas residuales activadas son desoxidadas y las funciones Bsmoc son removidas en una y la misma etapa utilizando una poliamina. El uso de la función Bsmoc se ha descrito como una mejora significativa para la producción de (oligo) péptido que utilizan técnicas de fase de solución rápida continua

que permiten el ensamblaje de un péptido en una serie sencilla de etapas en un relativamente corto periodo de tiempo.

Un nuevo proceso se ha encontrado ahora para la síntesis rápida de solución continua de péptidos, en donde un desoxidante se utiliza el cual permite una escogencia esencialmente arbitraria del grupo amino protector (el grupo protector en el N-terminal el componente carboxílico activado). Como contraste al proceso Carpino, la desprotección de la función N-terminal no necesariamente tiene lugar bajo las mismas condiciones de reacción que la desoxidación de exceso de funciones carboxílicas activadas. Por lo tanto, el proceso e esta invención es mucho mas generalmente aplicable que el proceso Carpino.

El nuevo proceso de acuerdo con esta invención es un proceso para la síntesis de solución rápida de un péptido que comprende ciclos repetitivos de las etapas (a)-(d):
(a) una etapa de acoplamiento, que utiliza un exceso de un componente carboxílico activado para asilar un componente amino,

(b) una etapa de apagado en la cual el desoxidante se utiliza para remover las funciones carboxílicas residuales activadas, en donde el desoxidante se puede utilizar para la desprotección del péptido creciente (es decir el péptido que esta siendo formado),

(c) una o mas extracciones acuosas y opcionalmente, (d) una etapa de desprotección separada, seguida por una o más extracciones acuosas, caracterizadas por que el péptido creciente esta presente en una fase orgánica permanente y no se aísla hasta que la secuencia final del péptido (es decir el producto final del proceso e esta invención) ha sido obtenido, y el proceso comprende al menos una etapa (b), denominada como etapa (b'), en la cual una amina que comprende un anión libre o un anión latente se utiliza como un desoxidante de funciones carboxílicas residuales activadas.

En razón a que durante el proceso de la invención el péptido creciente no esta aislado, el proceso es significativamente menor consumidor de tiempo que los procesos de fase de solución clásica y fácil de escalar. El proceso de la invención permite la remoción altamente eficiente del componente carboxílico residual activado

sin encontrar los problemas de hidrofobicidad de los procesos de la técnica anterior en el cual las poliaminas eran utilizadas como desoxidantes. Se obtienen péptidos de alta pureza. Preferiblemente, de la etapa (a) el proceso de esta invención las cantidades molares de los reactivos se utilizan en orden decreciente: componente carboxílico, aditivo acoplante > reactivo acoplante > componente amino. Se prefiere adicionalmente un proceso en donde la etapa (a) se utiliza un componente carboxílico preactivado.

En otra modalidad preferida, en la etapa (b') una amina que comprende un anión latente se utiliza como el desoxidante. Preferiblemente, el anión latente en la amina desoxidante lleva un grupo protector temporal que se puede remover selectivamente en la presencia de un grupo protector permanente unido al péptido creciente. En un modalidad

Particularmente preferida el grupo protector del anión latente en la amina desoxidante muestra una labilidad similar a aquella del grupo protector temporal presente en el terminal N del péptido creciente. Esto permite la desprotección del desoxidante que produce el anión y la

desprotección N-terminal el péptido creciente para que tenga lugar en una etapa sencilla de un proceso. Especialmente preferido es el proceso de la invención en donde los grupos protectores temporales, presentes en N-terminal del péptido creciente y presentes opcionalmente en el desoxidante, son grupos hidrogenolíticamente removibles mientras que los grupos protectores permanentes son grupos protectores acidolíticamente removibles. Preferiblemente, dichos grupos protectores temporales son del tipo benzilo por ejemplo, (sustituidos) benzilo y grupos benzilocarbonilos. Un desoxidante preferido es una amina primaria que comprende un anión libre o un anión latente y en particular un derivado de aminoácido protegido C-terminalmente. Además del carboxilato, la amina desoxidante puede comprender otras funciones aniónicas tales como sulfonato o fenolato. Un aminoácido altamente preferido para el uso como un desoxidante es la β -alanina o un derivado de esta (por ejemplo un derivado ester). El desoxidante más preferido es el benzil β -alaninato o una sal de este. El uso de un desoxidante de acuerdo con la presente invención conduce a compuestos hidrofílicos desoxidados que pueden ser activamente extraídos en una fase acuosa básica después de la etapa de desprotección: después de

la desprotección (si es aplicable), la hidrofiliicidad se mejora mediante la presencia tanto de una función amino libre como de una función carboxílica libre en las especies desoxidadas. Así, el proceso de esta invención da como resultado una purificación intermitente muy efectiva debido a la posibilidad de extraer activamente un compuesto hidrofílico desoxidado. Además, un exceso posiblemente presente de componente carboxílico que no fue activado y cuyo grupo protector temporal también fue removido ante la desprotección, se extrae desde la mezcla de reacción al mismo tiempo.

De acuerdo con un proceso de esta invención, cada ciclo del proceso puede comprender una etapa (b') en donde el anión libre o un anión latente se utiliza como un desoxidante de las funciones carboxílicas residuales activadas, Sin embargo, de acuerdo a una modalidad adicional de esta invención, el proceso puede comprender también uno o más ciclos en donde la etapa (b) se utiliza una poliamina como desoxidante.

Otro proceso preferido de esta invención comprende uno o más ciclos en donde en la etapa (b) la desprotección no ocurre (así las circunstancias son

escogidas de tal forma que el desoxidante solo se utiliza para apagado, por ejemplo el grupo protector Z y una amina que comprende un anión latente como un desoxidante) y la etapa subsecuente (c) comprende extracciones básicas, ácidas y básicas secuenciales, las cuales son preferiblemente desarrolladas en la presencia de cloruro de sodio. Este proceso comprende una etapa subsecuente (d) que comprende la desprotección y las extracciones básica y neutra secuenciales; estas extracciones son preferiblemente desarrolladas en la presencia de cloruro de sodio.

Otro proceso preferido de la invención comprende uno o más ciclos en donde en la etapa (b) ocurren tanto el apagado como la desprotección (por ejemplo utilizando el grupo protector de Bsmoc y una poliamina como un desoxidante) y la etapa subsecuente (c) extracciones secuenciales básica y neutra que son preferiblemente desarrolladas en la presencia de cloruro de sodio.

También se prefiere un proceso, en donde en el último ciclo de la etapa (a) en los grupos protectores del componente carboxílico muestran una labilidad similar a aquella de los grupos protectores permanentes del

componente amino y en la etapa (b) el desoxidante es una poliamina.

El proceso de acuerdo con esta invención se puede desarrollar en varios solventes orgánicos que son comúnmente utilizados para la producción de péptidos. Una fase orgánica permanente altamente preferida (solvente orgánico) en la cual el péptido creciente esta continuamente presente es etil acetato o una mezcla de etil acetato y diclorometano. También se prefieren las mezclas de etil acetato y otro solventes orgánicos, tales como 1-metil-2-pirolidinona o N,N-dimetilformamida.

El proceso de esta invención se puede desarrollar a temperaturas bien conocidas en la técnica para tales etapas en síntesis de péptidos de fase de solución clásica. Sin embargo, preferiblemente el proceso se desarrolla dentro de un rango de temperatura de 0 a 50°C, y en particular a temperatura ambiente.

El proceso de esta invención es muy adecuado para síntesis combinatorias de bibliotecas de péptidos que utilizan el método de rajado y mezcla. Los acoplamientos son desarrollados separadamente mientras que las mezclas

de acoplamiento individual se combinan para extracciones y desprotecciones.

El proceso de esta invención es muy adecuado para la automatización en razón a que se utilizan protocolos estándar.

El nuevo proceso de esta invención es un proceso altamente eficiente que puede ser utilizado convenientemente en la producción de oligo y polipéptidos de alta pureza.

Un proceso adecuado de acuerdo con la presente invención es el acoplamiento de un exceso de un componente carboxílico a un componente amino, en donde la función carboxílica se preactiva o activa in situ utilizando un reactivo acoplado y, si se desea, un aditivo. Luego de la etapa de acoplamiento, las funciones carboxílicas residuales activadas son desoxidadas mediante la adición del desoxidante a la mezcla de reacción. Subsecuentemente o al mismo tiempo, los grupos protectores temporales se remueven utilizando métodos adecuados conocidos en la técnica, seguido por la remoción del compuesto desoxidado mediante extracción

7A.
7A

acuosa. Al mismo tiempo, un exceso posiblemente presente de componente carboxílico que no fue activado y cuyo protector temporal también fue removido durante la desprotección, así como también otros reactivos solubles en agua y subproductos son extraídos de la mezcla de reacción. Luego, otro ciclo de etapas de acoplamiento, apagado, desprotección y extracción puede seguir dependiendo de la longitud del péptido deseado.

El termino amino componente se refiere a una molécula que comprende una función amino libre. En particular, el componente amino puede ser cualquier amina, aminoácido u oligopeptido que lleva una función amino libre

Y cuyo otros grupos funcionales son protegidos de tal manera que ellos no interfieren con la reacción de acoplamiento deseada. La función C-terminal del amino ácido aplicado u oligopeptido puede ser protegido como una amina sustituida o no sustituida o como un ester; ejemplos del último incluyen, pero no están limitados a metilo, etilo, t-butilo, benzilo, fenacilo, 3-(3-metil)pentil (Mpe), 2-(2-fenil)propil(Pp), 2-clorotritil (Clt), ifenil(4-piridil)metil (PyBzh), diciclopropilmetil (Dcpm), 9-fluorenilmetil (Fm), alil(All), 2-

(trimetilsilil)etil(Tmse) y esteres 4-{N-[1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutil]-amino}benzilo (Dmab) [Roeske, R. W. (1981) en: "los peptidos" vol 3 (Gross, E. y Meienhofer, J., eds.) Academic Press, New York, pp. 101-136; para Mpe: Karlstrom, A. y Unden, A. (1996) Tetrahedron Lett .37, 4343-4246; para Pp: Yue, C. et al. (1993) Tetrahedron Lett. 34, 323-326; para Clt: Athanassopoulos, P. et al, (1995) Tetrahedron Lett. 36, 5645-5648; para PyBzh: Mergler, M. et al. (2001) P154, Segundo simposio internacional de péptidos y 17avo simposio Americano de péptidos; para Dcpm: Carpino, L. A. et al. (1995) J. Org. Chem. 60, 7718-7719; para Fm: Al-Obeidi, F. et al. (1990) Int. J. Peptide Protein Res. 35,215-218; para All: Kunz, H. et al. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 26, 493-497 ; para Tmse : Sieber, P. (1977) Helv. Chim. Acta 60, 2711-2716; para dMAB: Chan, W. C. et al. (1995) J. Chem. Soc., Chem. Común., 2209-2210]. Las funciones del tipo t-butilo o las funciones de labilidad similares se prefieren para la protección permanente de otros grupos funcionales; estos incluyen- pero no están limitados a-t-butilo (Bu) para la protección de las cadenas laterales Asp, Glu, Ser, Thr y Tyr, t-butoxicarbonil (Boc) para la protección de las cadenas laterales de Lys y Trp, tritil (Trt) para la

78
76

protección de las cadenas laterales Asn, Gln, y His y 2,2,5,7,8-pentametilbromano-6-sulfonil (Pmc) o 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo (Pbf) para la protección de la cadena lateral Arg [Barany, G. y Merrifield, R. B. (1980) en: "The Peptides" vol 2 (Gross, E. y Meienhofer, J., eds) Academic Press, New York, pp. 1-284; para Trp(Boc): Franzen, H. et al. (1984) J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1699-1700; para Asn (Trt) y Gln(Trt): Sieber, P. y Riniker, B. (1991) Tetrahedron Lett. 32.739-742; para His(Trt): Sieber, P. y Riniker, B. (1987) Tetrahedron Lett. 28, 6031-6034; para pMC: Ramage, R. y Green, J. (1987) Tetrahedron Lett. 28. 2287-2290; para Pbf: Carpino, L. A. et al. (1993) Tetrahedron Lett. 34, 7829-7832].

El término componente carboxílico se refiere a una molécula que comprende la función carboxílica libre. En particular, el componente Carboxílico puede ser cualquier ácido carboxílico, aminoácido u oligopeptido que lleva la función carboxílica libre y cuyos otros grupos funcionales son protegidos de tal manera que ellos no interfieren con la reacción de acoplamiento deseada. En una modalidad preferida, el grupo amino del aminoácido aplicado u oligopeptido es protegido temporalmente mediante una

función benziloxycarbonil (Z); otros ejemplos incluyen pero no están limitados a las funciones Boc, Trt, fluoren-9-ilmetoxycarbonil (Fmoc), 2-(metilsulfonil)etoxycarbonil (Msc), aliloxycarbonil (Alloc) o las funciones del tipo arilsulfonil, tales como ortho-nitrobenzenosulfonilo (o-NBS) [Geiger, R. y König, W. 819819 en: "The Peptides", vol. 3 (Groos, E. y Meienhofer, J., eds.) Academic Press, New York, pp. 1-99; para Alloc: Kunz, H. y Unverzagt, C. (1984) Angew, Chem. 96, 426-427; para arilsulfonilo: Fukuyama, T. et al. (1997) Tetrahedron Lett. 38, 5831-5834]. Las funciones del tipo t-butilo las funciones de labilidad similares son preferidas para la protección permanente de otros grupos funcionales como se describió anteriormente. El componente carboxílico se puede preactivar como un éster activo preferiblemente una N-hidroxisuccinamina, benzotriazol-1-ilo, pentafluorofenilo o un éster de 4-nitrofenilo, un haluro, un N-carboxianhidro o como un anhídrido simétrico. Alternativamente, el componente carboxílico se puede activar in situ como un anhídrido mezclado utilizando un reactivo acoplante, tal como una carbodiimida, preferiblemente N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) o clorhidrato de 1-(3'-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), un uronio o

una sal de fosfonio en la presencia posible de un aditivo acoplante, preferiblemente una N-hidroxisuccinimida (HONSu), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), 3-hidroxi-4-oxo-3,4-dihidro-1,2,3, benzotriazina (HOOBt), 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HIOAt) o 6-cloro-1-hidroxibenzotriazol (CL-HOBt) y si se requiere la presencia de una amina terciaria [The Peptides, vol. 1. (1979) (Gross, E. y Meienhofer. J. eds.) Academic Press, New York; Li, P. y Xu, J. -C. (2000) Chin. J. Chem. 18, 456-466].

El grupo protector temporal se puede remover de acuerdo a los métodos conocidos en la técnica (vide supra). La función Z se puede remover mediante hidrogenolisis utilizando procedimientos estándar. Durante este proceso todos los grupos de protección tipo benzilo son removidos y los grupos protectores del tipo t-butilo o funciones de labilidad similar son mantenidas. La última se puede remover mediante acidolisis e acuerdo con los métodos conocidos en el arte.

Una persona experta en la técnica entenderá que se significa con el término extracción acuosa básica. Sin embargo, las extracciones acuosas básicas son preferiblemente desarrolladas utilizando soluciones

acuosas de hidrogencarbonato de sodio o carbonato de sodio, si se desea de la presencia de cloruro de sodio. El término extracción acuosa activa se refiere a una extracción en la cual vence a que un componente amino se extraiga bajo condiciones ácidas en la forma completamente protonada (amonio) o un componente carboxílico se extraiga bajo las condiciones básicas en una forma completamente desprotonada (carboxilato).

La invención se ilustra mediante los ejemplos siguientes, los cuales no deben ser interpretados como limitaciones de esta invención.

EJEMPLO

Boc-Gly-Phe-Asp(O^tBu)-Ser(^tBu)-O^tBu

A una solución agitada de 4,34 g de H-Ser(^tBu)-O^tBu en una mezcla de acetato de etilo y diclorometano a 20°C, se agregaron 3,24 g de 1-hidroxibenzotriazol, 7,76 g de Z-Asp(O^tBu)-OH 4,20 g de clorhidrato de 1-(3'-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida 2,42 ml de un metilmorfolino, después de agitación la solución resultante al completarse esta reacción se agregaron 1,21

ml de 4-metilmorfolina y 3,51 g de una sal de benzilo β -alaninato p-toluenosulfonato. La mezcla se agitó durante 30 minutos adicionales y se extrajo con 5% en $\text{Na}_2\text{CO}_3/10\%$ NaCL, 5% $\text{KHSO}_4/10\%$ NaCL y 5% $\text{Na}_2\text{CO}_3/10\%$ NaCL.

La capa orgánica que contiene el dipéptido protegido Z-Asp(O^tBu)-O^tBu -Ser(^tBu)-O^tBu se sometió a hidrogenólisis catalítica en la presencia de paladio sobre carbono. Al completarse la reacción, se agregaron 5% de $\text{Na}_2\text{CO}_3/10\%$ NaCL y la suspensión resultante se filtró. El residuo se lavo con una mezcla de acetato de etilo y diclorometano, y los filtrados combinados se extrajeron con 5% $\text{Na}_2\text{CO}_3/10\%$ NaCL y 30% NaCL.

La capa orgánica que contenía el dipéptido H-Asp(O^tBu)-Ser(^tBu)-O^tBu a 20°C, se agregaron 3,24 g de 1-hidroxibenzotriazol, 7,18 g de Z-Phe-OH, 4,20 g de clorhidrato de 1-(3'-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida y 2,42 ml de 4-metilmorfolino. Después de agitación la solución resultante hasta completarse la reacción, se agregaron 1,21 ml de 4-metilmorfolino y 3,51 g de una sal de benzilo β -alaninato p-toluenosulfonato. La mezcla se agitó durante otros 30 minutos y se extrajo

con 5% en $\text{Na}_2\text{CO}_3/10\%$ NaCL, 5% $\text{KHSO}_4/10\%$ NaCL y 5% $\text{Na}_2\text{CO}_3/10\%$ NaCL.

La capa orgánica que contenía el tripeptido protegido Z-Phe-Asp (O^tBu)-Ser(^tBu)- O^tBu se sometió a hidrogenolisis catalítica en la presencia de paladio sobre carbono. Al completar la reacción, se agregaron 5% de $\text{Na}_2\text{CO}_3/10\%$ NaCL, y la suspensión resultante se filtró. El residuo fue lavado con una mezcla de etil acetato y diclorometano, y los filtrados combinados se extrajeron con 5% de $\text{Na}_2\text{CO}_3/10\%$ NaCL y 30% NaCL.

A la capa orgánica que contenía el tripeptido H-Phe-Asp(O^tBu)-Ser(^tBu)- O^tBu y a 20°C , se agregaron 3,24 g de 1-hidroxibenzotriazol, 4,21 g de Boc-Gly-OH, 4,20 g de clorhidrato de 1-(3'-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida y 2,42 ml de 4-metilmorfolino. Después de agitación la solución resultante hasta completar la reacción, se agregó 1,25 ml de 3-dimetilamino-1-propilamina. La mezcla se agitó durante otros 30 minutos y se extrajo con 5% de $\text{Na}_2\text{CO}_3/10\%$ NaCL, 5% $\text{KHSO}_4/10\%$ NaCL, 5% $\text{Na}_2\text{CO}_3/10\%$ NaCL, 30% NaCL y agua. La capa orgánica se filtró, se seco sobre Na_2SO_4 y se evaporó hasta sequedad para dar el producto deseado tetrapeptido en 95% de

producción basado en el material de partida H-Ser(^tBu)-O^tBu. El proceso se completo en 6 horas.

Pureza: 98,1% mediante HPLC de fase reversa(24 a 68% de acetonitrilo en 0,1% de ácido trifluoroacetico en 29 minutos a 220 nm, 2,0 ml/min, 5 micrometros C₁₈ columna).Identidad: m/z 425.4 [M-Boc-3^tBu+5H]⁺ 469,4 [M-4^tBu+5H]⁻, 525,4 [M-3^tBu+4H]⁺, 581,4 [M-2^tBu+3H]⁺, 637,4 [M-^tBu+2H]⁺, 693,4 [M+H]⁺, mediante elctroroseado MS; 1HNMR (CDCL₃)δ1,16 (s, 9H), 1,44 (m, 27H), 2,59 (dd, 1H), 2,79 (dd, 1H), 3,09 (m,2H), 3,51 (dd, 1H), 3,69-3,86 (m, 3H), 4,47 (m, 1H), 4,67-4,78 (m,2H), 5,20 (bs, 1H), 6,68 (d, 1H), 7,12-7,34 m, 7H).

Conclusión: Los tetrapéptidos protegidos se produjeron sin aislamiento intermitente del péptido creciente. La pureza y la identificación del producto obtenido demostraron que el exceso de componentes carboxílicos (activados) se han removido completamente en todas las etapas del proceso y no se han formado secuencias de inserción utilizando el proceso de esta invención, El producto es obtenido en alta producción y pureza en un relativamente corto periodo de tiempo.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la síntesis rápida de solución de un péptido, el proceso comprende ciclos repetitivos de las etapas (a)-(d)Ⓢ

(a) una etapa de acoplamiento, que utiliza un exceso de componente carboxílico activado para asilar un amino componente.

(b) una etapa de apagado en la cual se utiliza un desoxigenador para remover las funciones carboxílicas residuales activadas, en donde el desoxigenador también se puede utilizar para la desprotección de un péptido creciente,

(c) una o más extracciones acuosas y opcionalmente, (de una etapa de desprotección separada, seguida mediante una o más extracciones acuosas, caracterizada por que, el péptido creciente está presente en una fase orgánica permanente y no está aislado hasta que sea obtenida la secuencia de péptido final, y el proceso comprende al

menos una etapa (b) denominada como etapa(B`) en la cual una amina que comprende un anión libre un anión latente se utiliza como un desoxigenador de funciones carboxílicas residuales activadas.

2. El proceso de la reivindicación 1, en donde en la etapa (a) las cantidades molares de los reactivos se utilizan en un orden decreciente:

Componente carboxílico, aditivo acoplante > que componente amino.

3. El proceso de la reivindicación 1, en donde en la etapa (a) se utiliza un componente carboxílico preactivado.

4. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la etapa (b`) se utiliza una amina que comprende un anión latente como el desoxigenador.

5. El proceso de la reivindicación 4, en donde el anión latente en la amina desoxigenadora lleva un grupo protector temporal que se puede remover selectivamente en la presencia de cualquier grupo protector permanente unidos al péptido creciente.

6. El proceso de las reivindicaciones 4 o 5, en donde a nivel latente en la amina desoxigenadota lleva un grupo protector temporal que muestra una labilidad similar a aquella del grupo protector temporal presente en el terminal N del péptido creciente.

7. El proceso de la reivindicación 5 o 6, en donde los grupos protectores temporales son grupos hidrogenolíticamente removibles en donde los grupos protectores permanentes son grupos acidolíticamente removibles.

8. El proceso de la reivindicación 7, en donde los grupos protectores temporales son del tipo benzilo.

9. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en donde el desoxigenador es una amina primaria que comprende un anión libre un anión latente.

10. El proceso de la reivindicación 9, en donde la amina primaria es un derivado de aminoácido protegido C-terminalmente.

11. El proceso de la reivindicación 10, en donde el aminoácido es C o un derivado de esta.

12. El proceso de la reivindicación 11 en donde el desoxigenador es bencilo β -alaninato o una sal de este.

13. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde en la etapa (b) se utiliza una poliamina como desoxigenador.

14. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende uno o más ciclos en donde en la etapa (b) la desprotección no ocurre y la etapa subsecuente (c) comprende extracciones secuenciales básicas, ácida y básica.

15. El proceso de la reivindicación 14, en donde las extracciones se desarrollan en la presencia de cloruro de sodio.

16. El proceso de la reivindicaciones 14 o 15, que comprende una etapa subsecuente (d) que comprende la desprotección y secuenciamiento básico y extracciones neutrales.

17. El proceso de la reivindicación 16, en donde las extracciones se llevan a cabo en la presencia de cloruro de sodio.

18. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende uno más ciclos en donde en la etapa (b) tanto encalmado como la desprotección ocurre y en la etapa subsecuente (c) comprende el secuenciamiento básico y las extracciones neutrales.

19. El proceso de la reivindicación 18, en donde las extracciones se llevan a cabo en la presencia de cloruro de sodio.

20. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde en el último ciclo en la etapa (a) los grupos de protección del componente carboxílico muestran una labilidad similar a aquella de los grupos de protección permanentes del péptido en crecimiento y en la etapa (b) el secuestrante es una poliamida (b) el secuestrante es una poliamina.

21. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en donde la fase orgánica es acetato de etilo o una mezcla de acetato de etilo y diclorometano.

22. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde el proceso se lleva a cabo dentro del rango de temperatura entre 0 a 50°C.

23. El proceso de la reivindicación 22, en donde el proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente.

24. Un método para la síntesis combinatorial de en la librería de péptidos que usan el método de partición y mezcla en donde el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 se aplica.

25. Un método para una síntesis de solución automatizada de péptidos, en donde el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 es aplicado.

RESUMEN

La presente invención se relaciona con un proceso para la síntesis de solución rápida de un péptido, el proceso comprende ciclos repetitivos de las etapas (a)-(b):

(a) una etapa de acoplamiento, usando un exceso de un componente carboxílico activado para asilar un componente amino,

(b) una etapa de calado en el cual un secuestrante es usado para remover las funciones carboxílicas activadas residuales, en donde el secuestrante puede también ser usado para la desprotección del péptido en crecimiento,

(c) una o mas extracciones acuosas y

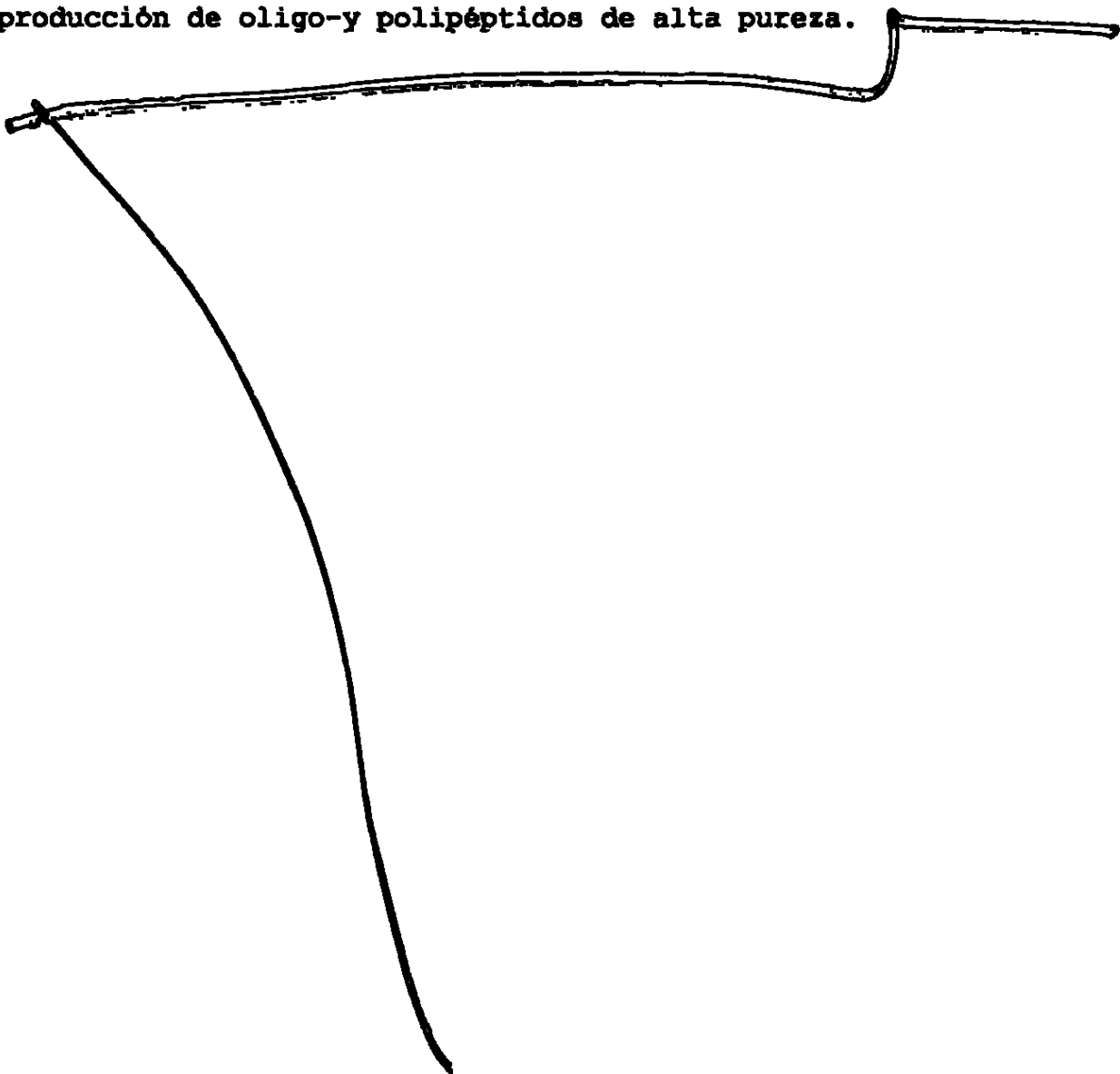
opcionalmente, (d) una etapa de desprotección separada, seguida por una o más extracciones acuosas, caracterizado, en que

el péptido en crecimiento esta presente en una fase orgánica permanente y no es aislado hasta el final de la

90
77

secuencia del péptido hasta que se haya obtenido el final de la secuencia del péptido, y el proceso comprende por lo menos una etapa (b), referida como la etapa (b'), en la cual una amina que comprende un anión libre o un anión latente es usada como un secuestrante de las funciones carboxílicas activadas residuales.

Este proceso altamente eficiente es útil para la producción de oligo-y polipéptidos de alta pureza.





2do. EXAMEN DE FORMA PATENTE DE INVENCION

Folio 91

Radicación no 02-61736

Concepto Técnico no 680

Clasificación Internacional de Patentes: C07K 1/00

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 38 de la Decisión 486 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

- SI ☒ NO ☐ Contiene un resumen de la invención (Art.26-e).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el título o nombre de la invención (Art.27-d).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la descripción de la invención (Art.26-b).
- SI ☐ NO ☐ NO ES APLICABLE ☒ Contiene los dibujos necesarios para comprender la invención (Art.26-d)
- SI ☒ NO ☐ Contiene una o más reivindicaciones. (Art.26-c).
- SI ☐ NO ☐ NO ES APLICABLE ☒ Han sido desarrollados los productos y/o procedimientos a partir de recursos genéticos o de sus productos derivados de los que cualquiera de los Países Miembros es país de origen. (Art. 26- h).
- SI ☐ NO ☐ NO ES APLICABLE ☒ Los productos y/o procedimientos han sido obtenidos o desarrollados a partir de los conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas, afroamericanas, o locales de los países miembros, de acuerdo a lo establecido en la Decisión 391 y sus modificaciones y reglamentaciones vigentes.(Art.26-i).
- SI ☐ NO ☒ La invención se refiere a un producto relativo a un material biológico. (Art.26-J).
- SI ☒ NO ☐ NO ES APLICABLE ☐ La prioridad coincide con la materia reivindicada.
- SI ☒ NO ☐ **CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS**

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☐ NO ☐ ver hoja(s) anexa(s)

□

EXAMINADOR TÉCNICO
202051

Bogotá D. C., mayo 2 de 2003



Folio 82

2020
Bogotá DC

Doctor(a)
EMILIO FERRERO
Apoderado(a)

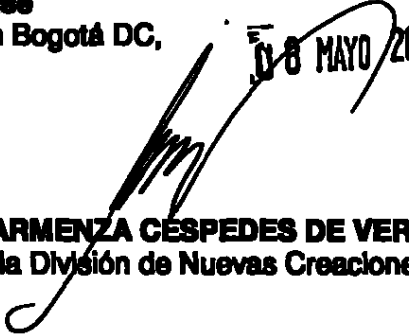
REFERENCIA:	Radicación No.	02-61736
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	418
	Oficio No.	694
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la misma Decisión.

De acuerdo con lo previsto por el artículo 40 de la Decisión 486, en concordancia con el artículo 85 de la misma Decisión, la publicación se hará a partir del día 17 de enero de 2004.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

10 MAYO 2003


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

202051