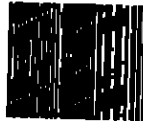


PETITORIO


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



02 061736

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación: 02061736 00000000 Folios: 57 ón
Fecha (AMB): 2002-07-17 17:20:11
Trámite: 002 PATENTES 3 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
2000-3**

1

SOLICITUD DE:

Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **AKZO NOBEL N.V.**
sociedad constituida y existente de
acuerdo con las leyes de Holanda.
Dirección: Velperweg 76, 6824 BM
Arnhem, Holanda.

Teléfono: 546 09 70
E-mail: clientes@camyp.com
Fax: 249 40 70

Domicilio: BM Arnhem, Holanda.

IDENTIFICACIONC.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Número: _____

3

**REPRESENTANTE
APODERADO
(74)**

Nombre: Emilio FERRERO

Dirección: Carrera 4ª No. 72-35

Teléfono: 347 38 11
E-mail: cavellier@cavellier.com
Fax: 217 92 11
Domicilio: Bogotá, Colombia

IDENTIFICACIONC.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐Número: 438.019 TP 31.929

4

**INVENTOR(ES)
(72)**

- 1- Ivo Franci EGGEN
- 2- Paulus Bernardus Wilhelmus TEN KORTENAAR
- 3- Cornelis Albert Gruson HAASNOOT

P.O. Box 20,
5340 BH Oss-Holanda,
respectivamente.

IDENTIFICACIONC.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Número: _____

5

TITULO (54) PROCESO PARA LA SÍNTESIS RAPIDA DE PEPTIDOS EN SOLUCION

6

Clasificación Internacional (51) C07K 1/60

7

PrioridadSI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

NL

(32) Fecha

19 de julio de 2001

(31) Número de Solicitud

01202753.8

8

Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los6 meses ☐12 meses ☐18 meses ☒Otro ☐

9

Comprobante de pago No 02-20.917Fecha: 1º de abril de 2002Comprobante de pago No 02-33.594Fecha: 23 de mayo de 2002

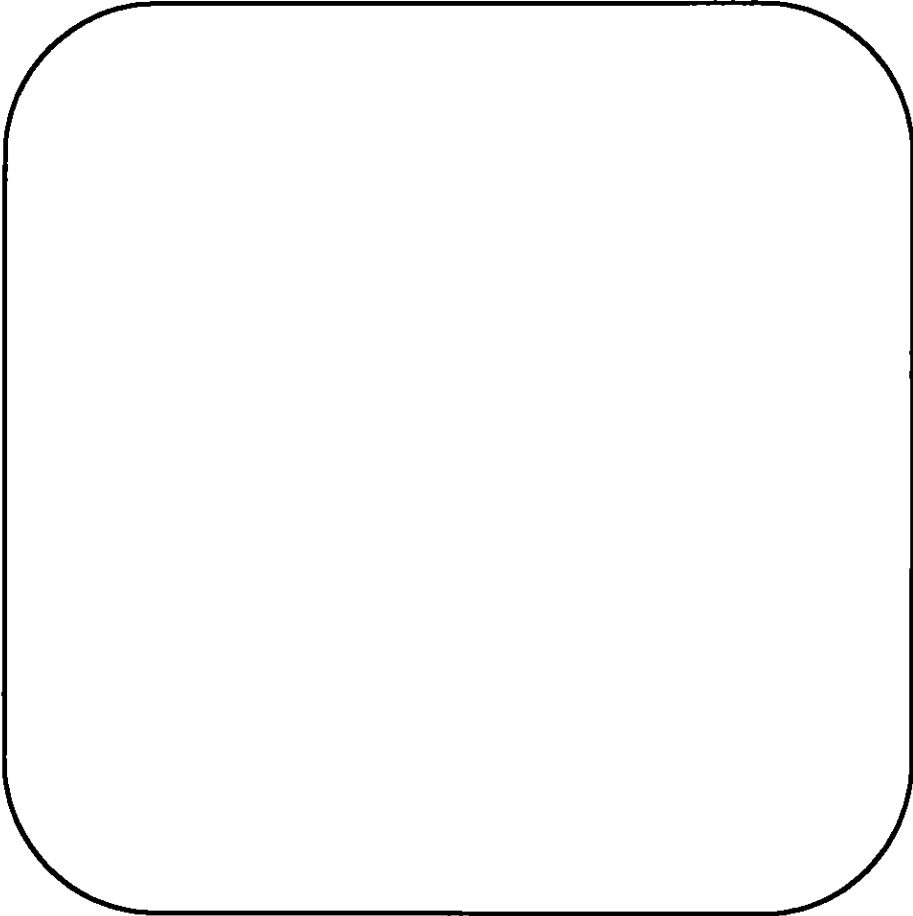
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud \$ 378.000.00
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad \$ 106.000.00
- ☒ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones
- ☐ Dibujos y/o planos necesarios
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

NOMBRE: EMILIO FERRERO
FIRMA: 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P.A. 31.929

PROCESO PARA LA SÍNTESIS RÁPIDA DE PÉPTIDOS EN SOLUCIÓN

La invención se refiere a un procedimiento nuevo y versátil para la síntesis rápida de péptidos en solución, donde el péptido en crecimiento no necesita ser aislado antes de que se complete el ensamblaje de la secuencia deseada.

Los péptidos se sintetizan ya sea en un soporte sólido o en solución. En ambas propuestas, las etapas de acoplamiento y desprotección se alternan repetidamente, y pueden estar separadas por purificaciones intermitentes. En la propuesta de fase sólida, una secuencia es ensamblada completamente mientras está unida a un soporte sólido, antes de ser eventualmente separada de dicho soporte. La remoción del exceso de reactivos y subproductos se efectúa por filtración. Claramente, la síntesis en fase sólida tiene ventajas: es aplicable en forma más o menos general y es fácil de automatizar. Sin embargo, también tiene algunas desventajas graves. Por ejemplo, las reacciones son controladas por difusión y habitualmente son bastante lentas bajo las condiciones heterogéneas aplicadas: con el fin de evitar las secuencias de deleción, se necesitan excesos relativamente grandes de los reactivos. Además, todas las cadenas laterales reactivas del péptido en crecimiento deben ser protegidas: debido a que no se efectúan purificaciones intermitentes, las reacciones secundarias debido a la presencia de cadenas laterales no protegidas pueden llevar a impurezas en el producto final. La propuesta en fase sólida

es difícil de llevar a mayor escala y es costosa en términos de reactivos y materiales.

La propuesta clásica en fase de solución, por otra parte, es más fácil de llevar a mayor escala y es menos cara en términos de reactivos y materiales. Habitualmente no se necesitan aminos ácidos totalmente protegidos, ya que los subproductos resultantes de las reacciones secundarias de las cadenas laterales no protegidas pueden ser removidos por purificaciones intermitentes. Sin embargo, la propuesta en fase de solución requiere protocolos específicos para la secuencia, y la producción de una secuencia completa consume mucho tiempo.

Debido a las desventajas de estas propuestas, existe una necesidad de un procedimiento que combine las ventajas de estos dos métodos clásicos, en particular para la síntesis de péptidos a gran escala. Un nuevo procedimiento debería ser rápido, fácil de llevar a mayor escala y aplicable en forma general.

En la síntesis en fase de solución, un ligero exceso de un componente carboxílico activado se usa preferentemente en cada etapa de acoplamiento, para asegurar un acoplamiento cuantitativo a un componente amino; así, puede evitarse la aparición de secuencias de delección en el producto final. Habitualmente, se supone que el componente carboxílico activado residual es destruido y removido durante el tratamiento acuoso intermitente. Sin embargo, secuencias de

inserción de péptidos se encuentran frecuentemente como impurezas del péptido final, debido a la remoción incompleta del componente carboxílico (activado) residual después de una etapa de acoplamiento, que se ha acoplado posteriormente después de la desprotección. Con el fin de evitar que ocurran dichas reacciones secundarias, puede introducirse una etapa de barrido inmediatamente después de la etapa de acoplamiento, para barrer (inactivar) las funciones carboxílicas activadas residuales. Habitualmente, se usan aminas como agentes barredores. El uso de poliaminas como agentes barredores lleva a compuestos barridos que pueden ser extraídos activamente a una fase acuosa, preferentemente ácida, dependiendo de su polaridad [por ejemplo, Kisfaludy, L. y colaboradores (1974) *Tetrahedron Lett.* 19, 1785-1786]. Esta extracción habitualmente se efectúa antes de la etapa de desprotección, para evitar la pérdida del péptido en crecimiento que pasa a la fase acuosa. Sin embargo, se ha encontrado que este procedimiento en muchos casos da como resultado una purificación intermitente incompleta, debido al carácter hidrofóbico del compuesto barrido: el carácter hidrofóbico intrínseco de la parte amino acilo del componente carboxílico es aumentado por el grupo protector de amino que todavía está presente. Por lo tanto, la extracción acuosa no es completamente eficaz.

Recientemente, Carpino, L.A. y colaboradores [(1999) *J. Org. Chem.* 64, 4324-4338] informaron de una mejora en el método de barrido. Además del uso de una poliamina como agente barredor, el grupo protector de amino 1,1-

dioxobenzo[b]tiofen-2-ilmetoxycarbonilo (Bsmoc) fue usado en el procedimiento. La función Bsmoc tiene muy alta labilidad hacia la base. Como resultado, las funciones carboxílicas activadas residuales son barridas y las funciones Bsmoc son removidas en una misma y única etapa usando una poliamina. El uso de la función Bsmoc ha sido descrito como una mejora significativa para la producción de (oligo)péptidos usando técnicas continuas rápidas en fase de solución, permitiendo el ensamblaje de un péptido en una serie única de etapas dentro de un período de tiempo relativamente corto.

Se ha encontrado ahora un nuevo procedimiento para la síntesis continua y rápida de péptidos en solución, donde se utiliza un agente barredor que permite una elección esencialmente arbitraria del grupo protector de amino (el grupo protector en el N-terminal del componente carboxílico activado).. A diferencia del procedimiento de Carpino, la desprotección de la función N-terminal no necesariamente se efectúa bajo las mismas condiciones de reacción que el barrido del exceso de funciones carboxílicas activadas. Por lo tanto, el procedimiento de esta invención es aplicable en forma mucho más general que el procedimiento de Carpino.

El nuevo procedimiento de acuerdo con esta invención es un procedimiento para la síntesis rápida de un péptido en solución en un solvente orgánico o una mezcla de solventes orgánicos, que comprende ciclos repetidos de las etapas (a)-(d):

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

(b) una etapa de extinción en que se usa un agente barredor para remover las funciones carboxílicas activadas residuales, donde el agente barredor también puede usarse para la desprotección del péptido en crecimiento (o sea el péptido que se está formando),

(c) una o más extracciones acuosas y opcionalmente, (d) una etapa de desprotección separada, posiblemente seguida por una o más extracciones acuosas,

el procedimiento caracterizado porque comprende al menos una etapa (b), denominada etapa (b'), en que una amina que comprende un anión libre o un anión latente es usada como agente barredor de las funciones carboxílicas activadas residuales.

Durante el procedimiento de esta invención, el péptido en crecimiento no necesita ser aislado hasta que se haya obtenido la secuencia final del péptido (o sea, el producto final del procedimiento de esta invención). Por lo tanto, el procedimiento es significativamente menos consumidor de tiempo que los procedimientos clásicos en fase de solución, y es fácil de llevar a mayor escala. El procedimiento de esta invención permite una remoción altamente eficiente del componente carboxílico activado residual, sin encontrar los problemas de hidrofobicidad de otros procedimientos del arte

previo en que se usan poliaminas como agentes barredores. Así, se obtienen péptidos de alta pureza.

De preferencia, en la etapa (a) del procedimiento de esta invención, las cantidades molares de los reactivos usados están en orden decreciente: componente carboxílico, aditivo de acoplamiento > reactivo de acoplamiento > componente amino. Más preferido es un procedimiento donde en la etapa (a) se usa un componente carboxílico pre-activado.

En otra modalidad preferida, en la etapa (b'), una amina que comprende un anión latente se usa como agente barredor. De preferencia, el anión latente en la amina barredora lleva un grupo protector temporal, que puede ser removido selectivamente en presencia de cualquier grupo protector permanente unido al péptido en crecimiento. En una modalidad particularmente preferida, el grupo protector del anión latente en la amina barredora presenta una labilidad similar a la del grupo protector temporal presente en el N-terminal del péptido en crecimiento. Esto permite que la desprotección del agente barredor que produce el anión y la desprotección del N-terminal del péptido en crecimiento tengan lugar en una sola etapa del procedimiento. Especialmente preferido es el procedimiento de la invención donde los grupos protectores temporales, presentes en el N-terminal del péptido en crecimiento y opcionalmente presentes en el agente barredor, son grupos que se pueden remover hidrogenolíticamente, en tanto que los grupos protectores permanentes son grupos protectores que se pueden remover

acidolíticamente. De preferencia, dichos grupos protectores temporales son del tipo bencilo, por ejemplo grupos bencilo (sustituido) y benciloxicarbonilo. Un agente barredor preferido es una amina primaria que comprende un anión libre o un anión latente, y en particular un derivado de amino ácido protegido en el C-terminal. Además de carboxilato, la amina barridora puede comprender otras funciones aniónicas tales como, pero no limitadas a, sulfonato, sulfato, fosfonato, fosfato o fenolato. Un amino ácido altamente preferido para usar como agente barredor es E-alanina o un derivado de la misma (por ejemplo, un derivado éster o silil éster). El agente barredor más preferido es E-alaninato de bencilo o una sal del mismo.

Un tiol que comprende un anión libre o latente también puede usarse como agente barredor, en lugar de una amina que comprende un anión libre o latente, de acuerdo con el procedimiento de esta invención.

El agente barredor de preferencia se usa en un exceso molar de dos a seis veces con respecto al componente activo residual que necesita ser barrido.

El uso de un agente barredor de acuerdo con la presente invención lleva a compuestos barridos hidrofílicos, que pueden ser extraídos activamente a una fase acuosa básica después de la etapa de desprotección: con la desprotección (si es aplicable), el carácter hidrofílico es aumentado por la presencia tanto de una función amino libre como de una función

carboxílica libre en la especie barrida. Así, el procedimiento de esta invención da como resultado una purificación intermitente muy eficaz, debido a la posibilidad de extraer activamente un compuesto barrido hidrofílico. Además, un exceso de componente carboxílico posiblemente presente, que no fue activado y cuyo grupo protector temporal también fue removido durante la desprotección, es extraído de la mezcla de reacción al mismo tiempo.

De acuerdo con el procedimiento de esta invención, al menos un ciclo, pero posiblemente más ciclos del procedimiento, comprenden una etapa (b') donde un anión libre o un anión latente se usa como agente barredor de las funciones carboxílicas activadas residuales. Sin embargo, de acuerdo con otra modalidad de esta invención, el procedimiento puede comprender también uno o más ciclos donde en la etapa (b) una poliamina, tal como 3-dimetilamino-1-propilamina, se usa como agente barredor.

Otro procedimiento preferido de esta invención comprende uno o más ciclos donde en la etapa (b) no se produce desprotección (luego, las circunstancias se eligen de manera que el agente barredor sólo se use para la extinción, por ejemplo usando el grupo protector Z y una amina que comprende un anión latente como agente barredor) y la etapa subsiguiente (c) comprende extracciones sucesivas básica, ácida y básica, que de preferencia se efectúan en presencia de cloruro de sodio o nitrato de potasio. Este procedimiento comprende una etapa subsiguiente (d), que comprende desprotección y

JA

extracciones sucesivas básica y neutra; estas extracciones de preferencia se efectúan en presencia de cloruro de sodio o nitrato de potasio.

Otro procedimiento preferido de esta invención comprende uno o más ciclos donde en la etapa (b) se produce tanto extinción como desprotección (por ejemplo, usando el grupo protector Bsmoc y una poliamina como agente barredor), y la etapa subsiguiente (c) comprende extracciones sucesivas básica y neutra, que de preferencia se efectúan en presencia de cloruro de sodio o nitrato de potasio.

También es preferido un procedimiento donde en el último ciclo en la etapa (a), los grupos protectores del componente carboxílico presentan una labilidad similar a la de los grupos protectores permanentes del componente amino, y en la etapa (b) el agente barredor es una poliamina.

El procedimiento de acuerdo con esta invención puede efectuarse en varios solventes orgánicos que se usan comúnmente para la producción de péptidos. Un solvente orgánico altamente preferido es acetato de etilo. También son preferidas las mezclas de acetato de etilo con otros solventes orgánicos, tales como diclorometano, 1-metil-2-pirrolidinona, N,N-dimetilformamida o tetrahidrofurano.

El procedimiento de esta invención puede efectuarse a temperaturas bien conocidas en el arte para estas etapas en la síntesis clásica de péptidos en fase de solución. Sin

embargo, de preferencia el procedimiento se efectúa dentro de un rango de temperaturas de 0 a 50°C, y en particular a temperatura ambiente.

El procedimiento de esta invención es muy adecuado para la síntesis combinatoria de bibliotecas de péptidos usando el método de "dividir y mezclar" (split and mix). Los acoplamientos se efectúan separadamente, en tanto que las mezclas de acoplamiento individuales se combinan para las extracciones y desprotecciones.

El procedimiento de esta invención es muy adecuado para la automatización, ya que se usan protocolos estándar.

El nuevo procedimiento de esta invención es un procedimiento altamente eficiente que puede usarse convenientemente en la producción de oligo- y polipéptidos de alta pureza.

Un procedimiento adecuado de acuerdo con la presente invención es el acoplamiento de un exceso de un componente carboxílico a un componente amino, donde la función carboxílica es pre-activada o activada in situ usando un reactivo de acoplamiento y, si se desea, un aditivo. A continuación de la etapa de acoplamiento, las funciones carboxílicas activadas residuales son barridas agregando el agente barrido a la mezcla de reacción y mezclando, habitualmente seguido por extracción acuosa. Posteriormente o durante el barrido, los grupos protectores temporales son

removidos usando métodos adecuados conocidos en el arte, habitualmente seguido por la remoción del compuesto barrido por extracción acuosa. Al mismo tiempo, un exceso de componente carboxílico posiblemente presente, que no fue activado y cuyo grupo protector temporal también fue removido durante la desprotección, al igual que otros reactivos solubles en agua y subproductos, son extraídos de la mezcla de reacción. Luego, puede seguir otro ciclo de etapas de acoplamiento, extinción, desprotección y extracción, dependiendo de la longitud del péptido deseado.

El término componente amino se refiere a una molécula que comprende una función amino libre. En particular, el componente amino puede ser cualquier amina, amino ácido u oligopéptido que lleva una función amino libre, y cuyos otros grupos funcionales están protegidos de manera tal que no interfieren con la reacción de acoplamiento deseada. La función C-terminal del amino ácido u oligopéptido usado puede ser protegida como una amida sustituida o no sustituida o como un éster; ejemplos de estos últimos incluyen, pero no están limitados a, ésteres de metilo, etilo, t-butilo, bencilo, fenacilo, 3-(3-metil)pentilo (Mpe), 2-(2-fenil)propilo (Pp), 2-clorotritilo (Clt), difenil(4-piridil)metilo (PyBzh), diciclopropilmetilo (Dcpm), 9-fluorenilmetilo (Fm), alilo (All), 2-(trimetilsilil)etilo (Tmse), 4-{N-[1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutil]-amino}bencilo (Dmab) y ésteres que se pueden descomponer enzimáticamente [Roeske, R.W. (1981) en: "*The Peptides*", Vol. 3 (Gross, E. y Meienhofer, J., Eds.) Academic

Press, New York, pp. 101-136; para Mpe: Karlström, A. y Undén, A. (1996) *Tetrahedron Lett.* 37, 4343-4246; para Pp: Yue, C. y colaboradores (1993) *Tetrahedron Lett.* 34, 323-326; para Clt: Athanassopoulos, P. y colaboradores (1995) *Tetrahedron Lett.* 36, 5645-5648; para PyBzh: Mergler, M. y colaboradores (2001) P154, 2nd International Peptide Symposium & 17th American Peptide Symposium; para Dcpm: Carpino, L.A. y colaboradores (1995) *J. Org. Chem.* 60, 7718-7719; para Fm: Al-Obeidi, F. y colaboradores (1990) *Int. J. Peptide Protein Res.* 35, 215-218; para All: Kunz, H. y colaboradores (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. y colaboradores (1995) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 2209-2210]. Las funciones del tipo t-butilo o funciones de labilidad similar son preferidas para la protección permanente de otros grupos funcionales en el componente amino; éstos incluyen, pero no están limitados a, t-butilo (^tBu) para la protección de las cadenas laterales de Asp, Glu, Ser, Thr y Tyr, t-butoxicarbonilo (Boc) para la protección de las cadenas laterales de Lys y Trp, tritilo (Trt) para la protección de las cadenas laterales de Asn, Gln e His y 2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo (Pmc) o 2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurano-5-sulfonilo (Pbf) para la protección de la cadena lateral de 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): Franzén, H. y colaboradores (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. y colaboradores (1993) *Tetrahedron Lett.* 34, 7829-7832].

El término componente carboxílico se refiere a una molécula que comprende una función carboxílica libre. En particular, el componente carboxílico puede ser cualquier ácido carboxílico, amino ácido u oligopéptido que lleva una función carboxílica libre, y cuyos otros grupos funcionales están protegidos de manera tal que no interfieren con la reacción de acoplamiento deseada. En una modalidad preferida, el grupo amino del amino ácido u oligopéptido usado es protegido temporalmente por una función benciloxicarbonilo (Z); otros ejemplos incluyen, pero no están limitados a, las funciones Boc, Trt, fluoren-9-ilmetoxicarbonilo (Fmoc), 2-(metilsulfonil)etoxicarbonilo (Msc), aliloxicarbonilo (Alloc), funciones de tipo arilsulfonilo, tal como orto-nitrobencenosulfonilo (o-NBS) y funciones que se pueden descomponer enzimáticamente [Geiger, R. y König, W. (1981) en: "The Peptides", Vol. 3 (Gross, 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. y colaboradores (1997) *Tetrahedron Lett.* 38, 5831-5834]. Las funciones del tipo t-butilo o funciones de labilidad similar son preferidas para la protección permanente de otros grupos funcionales en el componente carboxílico, como se describió más arriba para el componente amino. El componente carboxílico puede ser pre-activado como un éster activo, de preferencia un éster de N-

hidroxisuccinimida, benzotriazol-1-ilo, pentafluorofenilo o 4-nitrofenilo, un haluro, un *N*-carboxianhídrido o como un anhídrido simétrico. Alternativamente, el componente carboxílico puede ser activado in situ como un anhídrido mixto o usando un reactivo de acoplamiento, tal como una carbodiimida, de preferencia *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) o 1-(3'-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato (EDC), una sal de uronio o fosfonio, en la posible presencia de un aditivo de acoplamiento, de preferencia *N*-hidroxisuccinimida (HONSu), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), 3-hidroxi-4-oxo-3,4-dihidro-1,2,3-benzotriazina (HOObt), 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) o 6-cloro-1-hidroxibenzotriazol (Cl-HOBT), y si se requiere en 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 puede ser removido de acuerdo con métodos conocidos en el arte (véase más arriba). La función Z puede ser removida por hidrogenolisis usando procedimientos (estándar) que aplican, por ejemplo, hidrógeno gaseoso o formiato como un donante de hidrógeno. Durante este proceso, todos los grupos protectores de tipo bencilo son removidos y los grupos protectores de tipo t-butilo o funciones de labilidad similar se mantienen. Estos últimos pueden ser removidos por acidolisis de acuerdo con métodos conocidos en el arte.

Un experto en el arte entenderá lo que significa el término extracción acuosa básica. Sin embargo, las extracciones acuosas básicas de preferencia se efectúan usando soluciones acuosas de bicarbonato de sodio o carbonato de sodio, si se desea en presencia de cloruro de sodio o nitrato de potasio. El término extracción acuosa activa se refiere a una extracción en que un componente amino es extraído bajo condiciones ácidas en la forma protonada (amonio), o bien un componente carboxílico es extraído bajo condiciones básicas en la forma desprotonada (carboxilato).

La invención se ilustra mejor mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como una limitación de esta invención.

EJEMPLO 1

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

Primer ciclo: A una solución con agitación 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 1-(3'-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato y 2,42 ml de 4-metilmorfolina. Después de agitar la solución resultante hasta que se completó la reacción, se agregaron 1,21 ml de 4-metilmorfolina y 3,51 g de sal p-toluenosulfonato de E-alaninato de bencilo. La mezcla fue agitada por 30 minutos más y extraída con Na₂CO₃ al 5%/NaCl al 10%, KHSO₄ al 5%/NaCl al 10% y Na₂CO₃ al 5%/NaCl al 10%.

La capa orgánica que contenía el dipéptido protegido Z-Asp(O^tBu)-Ser(^tBu)-O^tBu fue sometida a hidrogenolisis catalítica en presencia de paladio en carbón de leña. Al completarse la reacción, se agregó Na₂CO₃ al 5%/NaCl al 10% y la suspensión resultante fue filtrada. El residuo fue lavado con una mezcla de acetato de etilo y diclorometano, y los filtrados orgánicos combinados fueron extraídos con Na₂CO₃ al 5%/NaCl al 10% y NaCl al 30%.

2° ciclo: A 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 1-(3'-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato y 2,42 ml de 4-metilmorfolina. Después de agitar la solución resultante hasta que se completó la reacción, se agregaron 1,21 ml de 4-metilmorfolina y 3,51 g de sal p-toluenosulfonato de E-alaninato de bencilo. La mezcla fue agitada por 30 minutos más y extraída con Na₂CO₃ al 5%/NaCl al 10%, KHSO₄ al 5%/NaCl al 10% y Na₂CO₃ al 5%/NaCl al 10%.

La capa orgánica que contenía el tripéptido protegido Z-Phe-Asp(O^tBu)-Ser(^tBu)-O^tBu fue sometida a hidrogenolisis catalítica en presencia de paladio en carbón de leña. Al completarse la reacción, se agregó Na₂CO₃ al 5%/NaCl al 10% y la suspensión resultante fue filtrada. El residuo fue lavado con una mezcla de acetato de etilo y diclorometano, y los filtrados orgánicos combinados fueron extraídos con Na₂CO₃ al 5%/NaCl al 10% y NaCl al 30%.

3er ciclo: A la capa orgánica que contenía el tripéptido H-Phe-Asp(O^tBu)-Ser(^tBu)-O^tBu a 20°C, se agregaron 3,24 g de 1-hidroxibenzotriazol, 4,21 g de Boc-Gly-OH, 4,20 g de 1-(3'-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato y 2,42 ml de 4-metilmorfolina. Después de agitar la solución resultante hasta que se completó la reacción, se agregó 1,25 ml de 3-dimetilamino-1-propilamina. La mezcla fue agitada por 30 minutos más y extraída con Na₂CO₃ al 5%/NaCl al 10%, KHSO₄ al 5%/NaCl al 10%, Na₂CO₃ al 5%/NaCl al 10%, NaCl al 30% y agua. La capa orgánica fue evaporada a sequedad y el residuo fue triturado con metil ter-butyl éter y secado para dar el tetrapéptido protegido deseado, con un 95% de rendimiento en base al material de partida H-Ser(^tBu)-O^tBu. El procedimiento se completó en 6 horas.

Pureza: 98,1% por HPLC de fase inversa (24 a 68% de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1% en 29 minutos a 220 nm, 2,0 ml/min, columna C₁₈ de 5 micrones). Identidad: m/z 425,4 [M-Boc-3^tBu+H]⁺, 469,4 [M-4^tBu+H]⁺, 525,4 [M-3^tBu+H]⁺, 581,4 [M-2^tBu+H]⁺, 637,4 [M-^tBu+H]⁺, 693,4 [M+H]⁺ por MS con electrorrocío; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1,16 (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).

EJEMPLO 2

H-His-Trp-Ser(^tBu)-Tyr(^tBu)-D-Leu-Leu-Orn(Boc)-Pro-O^tBu

Primer ciclo: A una solución con agitación de 1.300 g de H-Pro-O^tBu.HCl en acetato de etilo a 20°C, se agregaron 1.014 g de 1-hidroxibenzotriazol, 2.756 g de Z-Orn(Boc)-OH, 1.378 g de 1-(3'-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato y 1.495 ml de 4-metilmorfolina. Después de agitar la solución resultante hasta que se completó la reacción, se agregaron 377 ml de 4-metilmorfolina y 1.105 g de sal p-toluenosulfonato de E-alaninato de bencilo. La mezcla fue agitada por 30 minutos más y extraída con Na₂CO₃ al 5%/NaCl al 10%, KHSO₄ al 5%/NaCl al 10% y Na₂CO₃ al 5%/NaCl al 10%.

La capa orgánica que contenía el dipéptido protegido Z-Orn(Boc)-Pro-O^tBu fue sometida a hidrogenolisis catalítica en presencia de paladio en carbón de leña. Al completarse la reacción, se agregó Na₂CO₃ al 5%/NaCl al 15% y la suspensión resultante fue filtrada. El residuo fue lavado con acetato de etilo, y los filtrados orgánicos combinados fueron extraídos con Na₂CO₃ al 5%/NaCl al 15% y NaCl al 30%. Las capas acuosas separadas fueron re-extraídas con acetato de etilo.

2° ciclo: A las capas orgánicas combinadas que contenían el dipéptido H-Orn(Boc)-Pro-O^tBu a 20°C, se agregaron 1.014 g de 1-hidroxibenzotriazol, 1.993 g de Z-Leu-OH, 1.320 g de 1-(3'-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato y 754 ml de 4-metilmorfolina. Después de agitar la solución resultante hasta que se completó la reacción, se agregaron 377 ml de 4-metilmorfolina y 1.105 g de sal p-toluenosulfonato de E-alaninato de bencilo. La mezcla fue agitada por 30 minutos

más y extraída con Na_2CO_3 al 5%/NaCl al 10%, KHSO_4 al 5%/NaCl al 10% y Na_2CO_3 al 5%/NaCl al 10%.

La capa orgánica que contenía el tripéptido protegido Z-Leu-Orn(Boc)-Pro- O^tBu fue sometida a hidrogenolisis catalítica en presencia de paladio en carbón de leña. Al completarse la reacción, se agregó Na_2CO_3 al 5%/NaCl al 15% y la suspensión resultante fue filtrada. El residuo fue lavado con acetato de etilo, y los filtrados orgánicos combinados fueron extraídos con Na_2CO_3 al 5%/NaCl al 10% y NaCl al 30%.

3er ciclo: A la capa orgánica que contenía el tripéptido H-Leu-Orn(Boc)-Pro- O^tBu a 20°C , se agregaron 1.014 g de 1-hidroxibenzotriazol, 1.993 g de Z-D-Leu-OH, 1.320 g de 1-(3'-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato y 754 ml de 4-metilmorfolina. Después de agitar la solución resultante hasta que se completó la reacción, se agregaron 377 ml de 4-metilmorfolina y 1.105 g de sal p-toluenosulfonato de E-alaninato de bencilo. La mezcla fue agitada por 30 minutos más y extraída con Na_2CO_3 al 5%, KHSO_4 al 5% y Na_2CO_3 al 5%.

La capa orgánica que contenía el tripéptido protegido Z-D-Leu-Leu-Orn(Boc)-Pro- O^tBu fue sometida a hidrogenolisis catalítica en presencia de paladio en carbón de leña. Al completarse la reacción, se agregó Na_2CO_3 al 5% y la suspensión resultante fue filtrada. El residuo fue lavado con acetato de etilo, y los filtrados orgánicos combinados fueron extraídos con Na_2CO_3 al 5% y NaCl al 10%.

4° a 7° ciclo: Estos ciclos se efectuaron siguiendo el procedimiento del tercer ciclo, reemplazando 1.993 g de Z-D-Leu-OH por Z-Tyr(^tBu)-OH (liberado de 4.497 g de la sal de diciclohexilamonio correspondiente), 2.218 g de Z-Ser(^tBu)-OH, 2.538 g de Z-Trp-OH y 2.172 g de Z-His-OH, respectivamente. Sin embargo, desde el quinto ciclo en adelante, se duplicaron las cantidades de 4-metilmorfolina y sal p-toluenosulfonato de E-alaninato de bencilo durante la etapa de barrido. En el quinto ciclo, las extracciones después del barrido se efectuaron a 35°C. En el séptimo ciclo, el acoplamiento se efectuó a 3°C, 1.014 g de 1-hidroxibenzotriazol fueron reemplazados por 2.561 g de 6-cloro-1-hidroxibenzotriazol, y se agregó una porción adicional de 132 g de 1-(3'-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato después de una hora de acoplamiento. También en el séptimo ciclo, las extracciones después de la hidrogenolisis se efectuaron a 35°C. Al final del séptimo ciclo, la capa orgánica fue evaporada a sequedad para dar el nonapéptido protegido deseado, con un 73% de rendimiento en base al material de partida H-Pro-O^tBu.HCl (o sea, en promedio 98% por cada etapa química).

Pureza: 90,6% por HPLC de fase inversa (24 a 68% de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1% en 29 minutos a 220 nm, 2,0 ml/min, columna C₁₈ de 5 micrones). Identidad: m/z 543,6 [M-Boc-2^tBu+2H]²⁺, 571,6 [M-Boc-^tBu+2H]²⁺, 599,6 [M-Boc+2H]²⁺, 649,8 [M+2H]²⁺, 1.298,0 [M+H]⁺ por MS con electrorrocío.

Conclusiones: Los péptidos protegidos fueron producidos sin aislación intermitente de los intermediarios. La pureza y la identificación del producto obtenido en el primer ejemplo demuestran que los excesos de los componentes carboxílicos (activados) han sido completamente removidos en todas las etapas de los procedimientos, y no se han formado secuencias de inserción al usar el procedimiento de esta invención. Además, la síntesis del segundo ejemplo demuestra que la síntesis de acuerdo con el procedimiento de esta invención es llevada fácilmente a mayor escala. Los productos de ambos ejemplos se obtienen con alto rendimiento y alta pureza, dentro de un período de tiempo relativamente corto.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la síntesis rápida de un péptido en solución en un solvente orgánico o una mezcla de solventes orgánicos, donde el procedimiento comprende ciclos repetidos de las etapas (a)-(d):

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

(b) una etapa de extinción en que se usa un agente barredor para remover las funciones carboxílicas activadas residuales, donde el agente barredor también puede usarse para la desprotección del péptido en crecimiento,

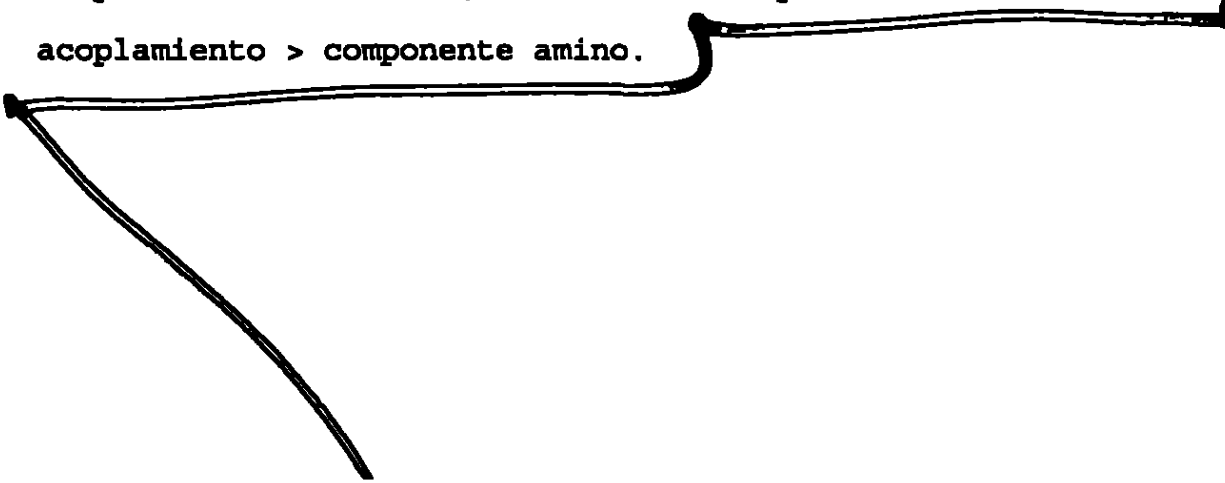
(c) una o más extracciones acuosas y opcionalmente, (d) una etapa de desprotección separada, seguida por una o más extracciones acuosas,

CARACTERIZADO porque

el procedimiento comprende al menos una etapa (b), denominada etapa (b'), en que una amina que comprende un anión libre o un anión latente es usada como agente barredor de las funciones carboxílicas activadas residuales.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque en la etapa (a) las cantidades molares de los reactivos usados están en orden decreciente:

componente carboxílico, aditivo de acoplamiento > reactivo de acoplamiento > componente amino.



3. El procedimiento de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque en la etapa (a) se usa un componente carboxílico pre-activado. ~

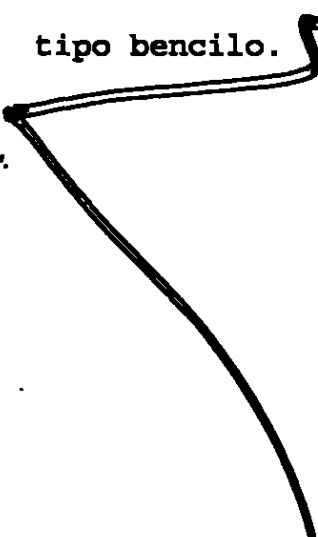
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, CARACTERIZADO porque en la etapa (b') una amina que comprende un anión latente es usada como agente barredor.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque el anión latente en la amina barredora lleva un grupo protector temporal, que puede ser removido selectivamente en presencia de cualesquier grupos protectores permanentes unidos al péptido en crecimiento.

6. El procedimiento de las reivindicaciones 4 ó 5, CARACTERIZADO porque el anión latente en la amina barredora 5 D lleva un grupo protector temporal, que presenta una labilidad similar a la del grupo protector temporal presente en el N-terminal del péptido en crecimiento.

7. El procedimiento de las reivindicaciones 5 ó 6, CARACTERIZADO porque los grupos protectores temporales son grupos que se pueden remover hidrogenolíticamente i.e en tanto que los grupos protectores permanentes son grupos que se pueden remover acidolíticamente.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, CARACTERIZADO porque los grupos protectores temporales son de tipo bencilo.



9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 4-8, CARACTERIZADO porque el agente barredor es una amina primaria que comprende un anión libre o un anión latente.

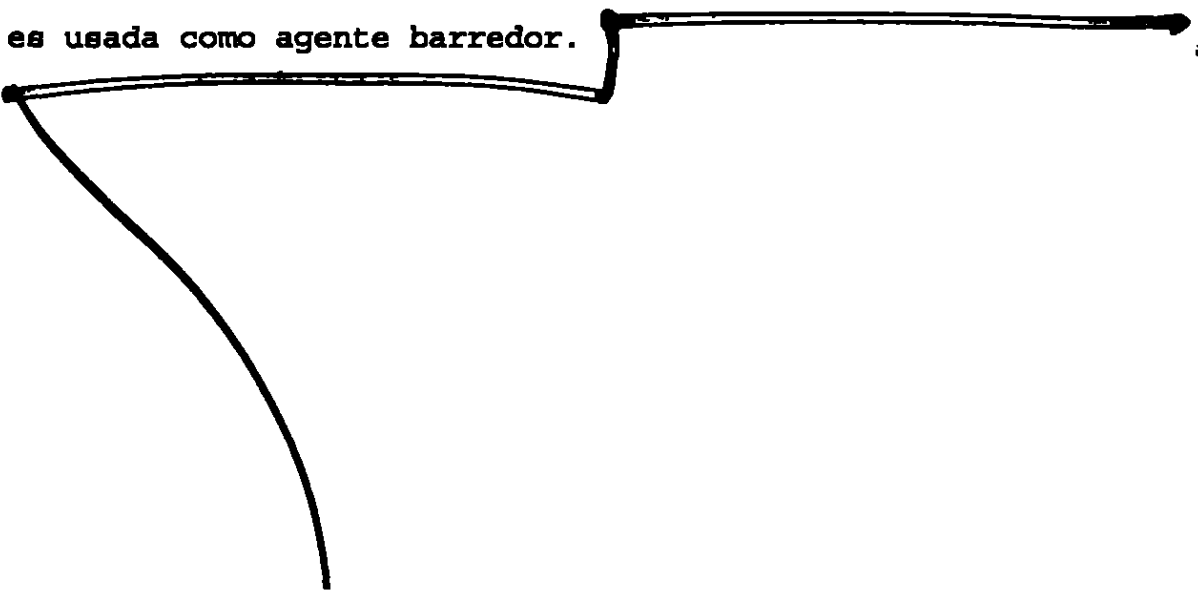
10. El procedimiento de la reivindicación 9, CARACTERIZADO porque la amina primaria es un derivado de amino ácido protegido en el C-terminal.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, CARACTERIZADO porque el amino ácido es E-alanina o un derivado de la misma.

12. El procedimiento de la reivindicación 11, CARACTERIZADO porque el agente barredor es E-alaninato de bencilo o una sal del mismo.

13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, CARACTERIZADO porque un tiol que comprende un anión libre o latente es usado como agente barredor en lugar de una amina que comprende un anión libre o latente.

14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, CARACTERIZADO porque el procedimiento comprende uno o más ciclos donde en la etapa (b) una poliamina es usada como agente barredor.



15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, CARACTERIZADO porque comprende uno o más ciclos donde en la etapa (b) no se produce desprotección, y la etapa subsiguiente (c) comprende extracciones sucesivas básica, ácida y básica.

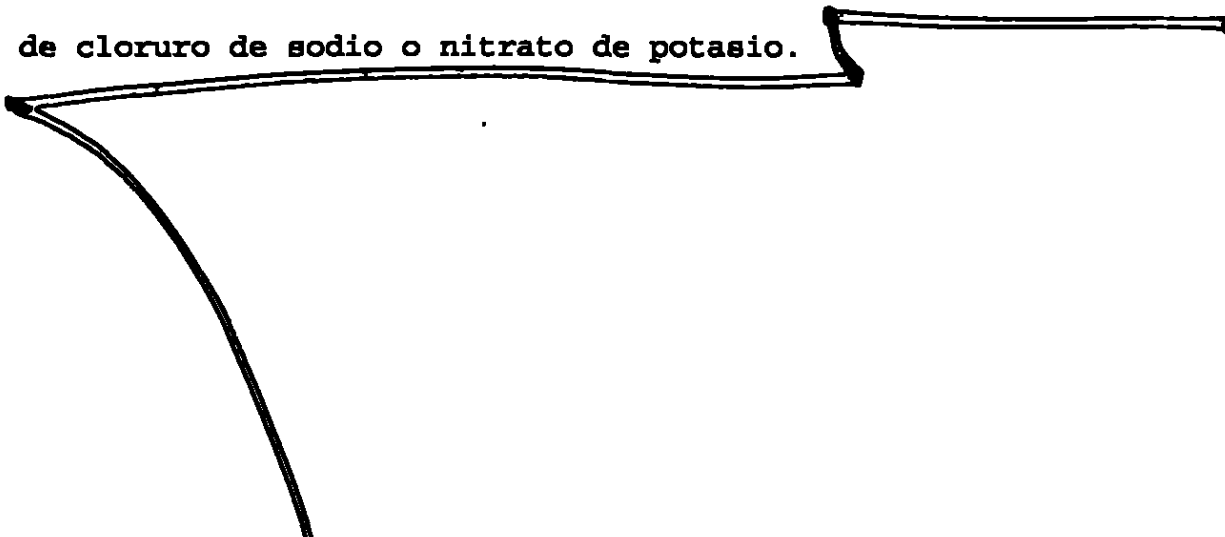
16. El procedimiento de la reivindicación 15, CARACTERIZADO porque las extracciones se efectúan en presencia de cloruro de sodio o nitrato de potasio.

17. El procedimiento de las reivindicaciones 15 ó 16, CARACTERIZADO porque comprende una etapa subsiguiente (d) que comprende desprotección y extracciones sucesivas básica y neutra.

18. El procedimiento de la reivindicación 17, CARACTERIZADO porque las extracciones se efectúan en presencia de cloruro de sodio o nitrato de potasio.

19. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, CARACTERIZADO porque comprende uno o más ciclos donde en la etapa (b) se produce tanto extinción como desprotección, y la etapa subsiguiente (c) comprende extracciones sucesivas básica y neutra.

20. El procedimiento de la reivindicación 19, CARACTERIZADO porque las extracciones se efectúan en presencia de cloruro de sodio o nitrato de potasio.



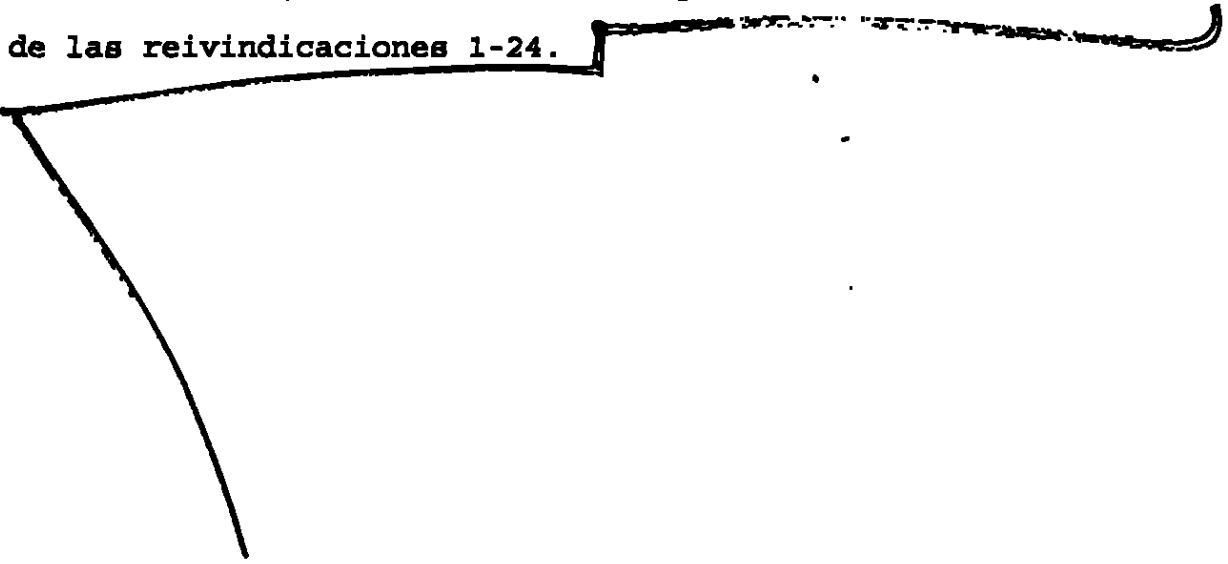
21. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, CARACTERIZADO porque en el último ciclo, en la etapa (a) los grupos protectores del componente carboxílico presentan una labilidad similar a la de los grupos protectores permanentes del péptido en crecimiento, y en la etapa (b) el agente barredor es una poliamina.

22. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-21, CARACTERIZADO porque el solvente orgánico o mezcla de solventes orgánicos es acetato de etilo o una mezcla de acetato de etilo y diclorometano, una mezcla de acetato de etilo y 1-metil-2-pirrolidinona, una mezcla de acetato de etilo y N,N-dimetilformamida o una mezcla de acetato de etilo y tetrahidrofurano.

23. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, CARACTERIZADO porque el procedimiento se efectúa dentro de un rango de temperaturas de 0 a 50°C.

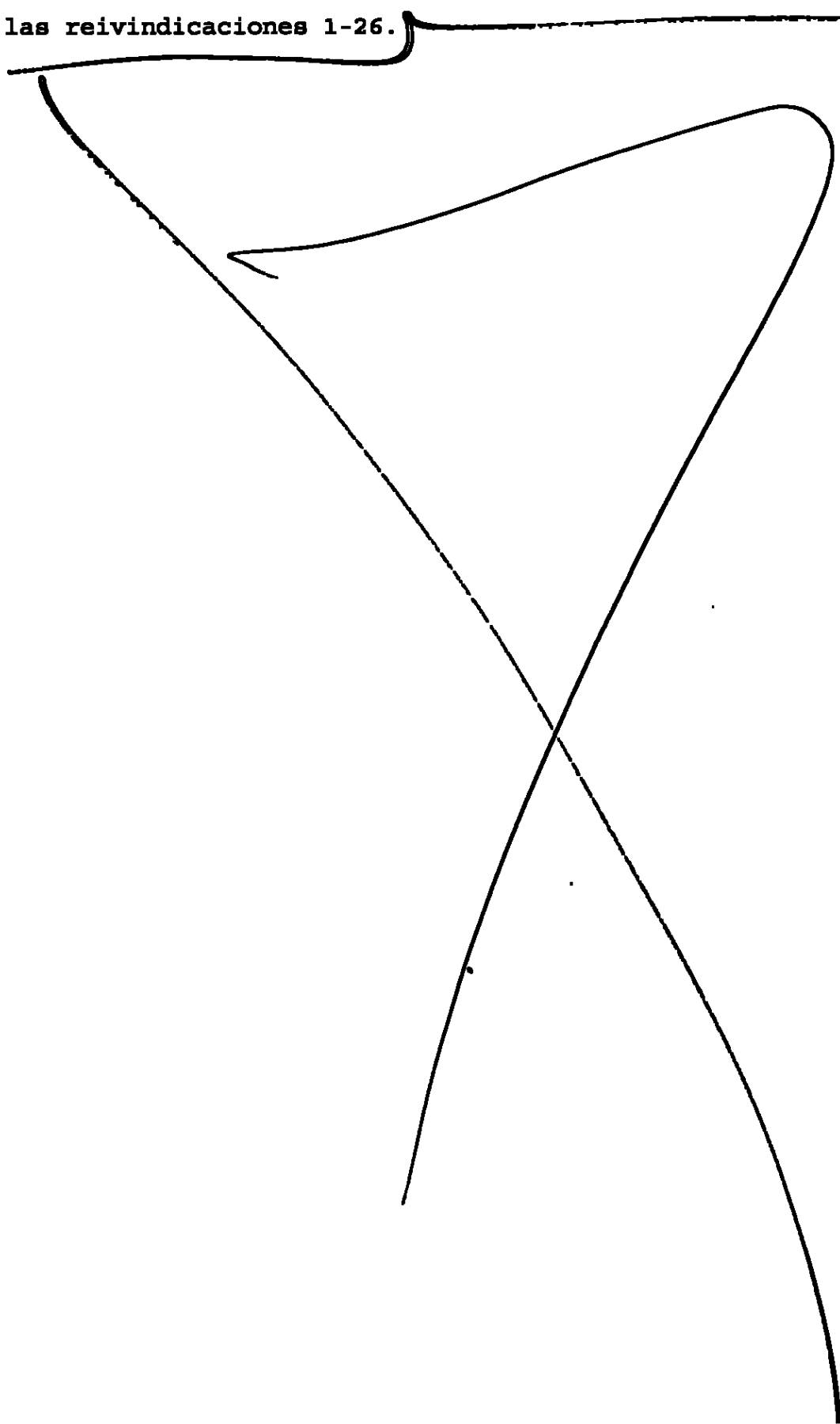
24. El procedimiento de la reivindicación 23, CARACTERIZADO porque el procedimiento se efectúa a temperatura ambiente.

25. Un método para la síntesis combinatoria de bibliotecas de péptidos usando el método de dividir y mezclar, CARACTERIZADO porque se aplica el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-24.



26. Un método para la síntesis automatizada de péptidos en solución, CARACTERIZADO porque se aplica el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-25.

27. Un péptido o una mezcla de péptidos, CARACTERIZADO porque se prepara de acuerdo con un procedimiento que comprende el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-26.



RESUMEN

La presente invención se refiere a un procedimiento para la síntesis rápida de un péptido en solución, que comprende ciclos repetidos de las etapas (a)-(d):

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

(b) una etapa de extinción en que se usa un agente barredor para remover las funciones carboxílicas activadas residuales, donde el agente barredor también puede usarse para la desprotección del péptido en crecimiento,

(c) una o más extracciones acuosas y opcionalmente, (d) una etapa de desprotección separada, seguida por una o más extracciones acuosas,

el procedimiento caracterizado porque comprende al menos una etapa (b), denominada etapa (b'), en que una amina o un tiol que comprende un anión libre o un anión latente se usa como agente barredor de las funciones carboxílicas activadas residuales.

Durante el procedimiento de esta invención, el péptido en crecimiento no necesita ser aislado hasta que se haya obtenido la secuencia final del péptido.

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

0197301 CO

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

91

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND
POWER OF ATTORNEY11214
1538

I (we), the undersigned / Yo (nosotros), abajo firmado (s)

AKZO NOBEL N.V.

of/domiciliado (s) en Velperweg 76, 6824

BM Arnhem, THE NETHERLANDS

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el párrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primer o segundo suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first, or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, especially those administrative, administrative commissions and courts as before Arbitration Courts, in the following: a) Obtaining of patents, utility models, industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; their renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative cancellation, nullity, infringement, granting of TUTELA, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this Day and Month of 6 AUG 1998

F.G.M. Hermans

in/en Director Patents Pharma

Signature

AKZO NOBEL N.V.

E.H. Reerink

Deputy Director
Legal AffairsCAVELIER ABOGADOS
WPPODERE-179 (MINUTA N° 12.1.12.5)

TRADUCCION No. 18.11/98
MARIA ELVIRA MAS ELO
Traductora e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 28/9 Min. Justicia

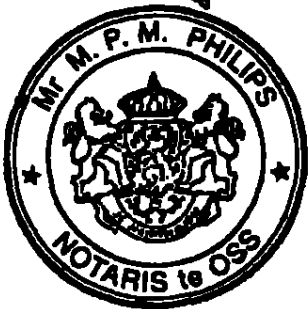
LEGALIZACION

El Señor Cónsul de Colombia debe expedir un certificado consular sobre (1) la existencia legal de la compañía que otorga el poder, (2) que ésta ejerce su objeto social, y (3) que las personas que otorgan el poder están autorizadas para darlo. A este efecto les solicitamos que muestren al Señor Cónsul las pruebas que acreditan esos hechos (1), (2) y (3).

LEGALIZATION

The Colombia Consul must issue a consular certificate on the legal existence of the company; (1) the Power-of-Attorney, (2) that it is in accordance with its company purposes, and (3) that the persons who execute the Power of Attorney is authorized to do so. To this effect, please show the Consul the evidence to prove the above facts (1), (2) and (3).

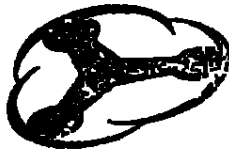
Seen for legalization of the signatures of Mr. F.G.M. Hermans and Mr. E.H. Reerink by me, Mr. Martinus Petrus Maria Philips, notary public at Oss, the Netherlands, on this 26th day of August 1998.



[Handwritten signature]

15499

TRADUCCION No.: 18.11/98
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia



CHAMBER OF COMMERCE AND INDUSTRY
FOR GOOSTBRABANT (NEDERLAND)
EXCLUSIVE PLACE FOR LEGALIZATION OF
THE SIGNATURE(S)

27 AUG 1998

KAMERVAN GOOSTBRABANT
GOOSTBRABANT
HERTOGENBOSCH

J. Schellekens

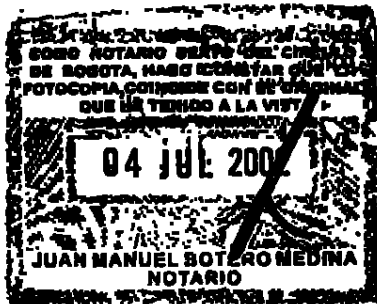
Gezien voor legalisatie van de handtekening van J. Schellekens

's-Gravenhage, 9 SEP 1998



De Minister van
Buitenlandse Zaken
voordeze,

Leges f 20,- H.H. van POORTEN



NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL DE COLOMBIA: Según los artículos 65 del C. de P.C. y 480 del C. de Co., si el poderdante es una sociedad, el Señor Cónsul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de su existencia, que ejerce su objeto social y que quien confiere el poder es su representante.



CONSULADO DE COLOMBIA

COLD 112 : 4-201-001-3

32

El suscrito Cónsul de Colombia en La Haya, Holanda,
vistos los documentos presentados por los interesados,

CERTIFICA:

Que el Señor Martinus Petrus Maria PHILIPS, quien como Notario Público de Oss, Países Bajos, autenticó las firmas de los signatarios del poder precedente, ejercía en la fecha las funciones indicadas, y su firma corresponde a la registrada en este Consulado.

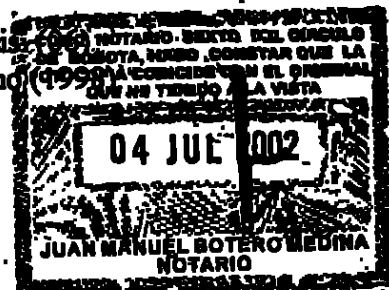
Que la Compañía AKZO NOBEL N.V. es una Sociedad constituida de acuerdo con las leyes de los Países Bajos, cumple su objeto conforme a las mismas y se halla registrada en la Cámara de Comercio y Fábricas de Centraal Gelderland, Arnhem, bajo el número 09007809;

Que los Señores Franciscus Guilielmus Maria HERMANS y Engbert Harmen REERINK, signatarios del presente documento, quienes en su carácter de Apoderados de la Empresa AKZO NOBEL N.V., conjuntamente tienen facultad para ello, y cuyas firmas fueron autenticadas ante el Notario Público de Oss, Señor Martinus Petrus Maria PHILIPS, son los representantes legales de la citada Empresa en este País.

El Cónsul de Colombia en La Haya, Países Bajos, no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

Esta certificación se expide en La Haya, Países Bajos, a los seis días del mes de Noviembre de mil novecientos noventa y ocho (1998).

Impuesto de Timbre	US\$	6.00.
Derechos Consulares	US\$.	100.00
Costo Total Pagado	US\$.	106.00



Certificación No. 206

JOSE IGNACIO VILLEGAS CORTES
CONSUL DE COLOMBIA
LA HAYA

TRADUCCION No: 18.11/98
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

90 NOV 19 11:56

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

BOGOTA, D.C. 04 JUN 2002
NOTARIO
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

300803

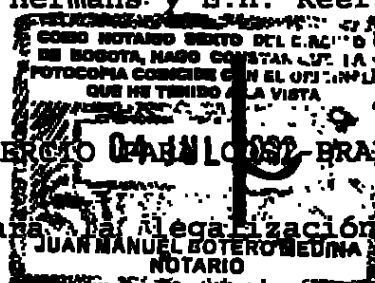
SI LA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 18.11/98 preparada por María Elvira Martelo, Traductora Oficial debidamente aprobada por el Ministerio de Justicia de Colombia por Resolución 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

(A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento escrito en inglés y español, por el cual AKZO NOBEL N.V. otorga poder a EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y GERMAN CAVELIER). Dado y firmado el 6 de agosto de 1998. (Firma ilegible) F.G.M. Hermans, Director de Patentes Farmacéuticas. (Firma ilegible) E.H. Reerink, Subdirector de Asuntos Jurídicos. (Sello Corporativo) AKZO NOBEL N.V.

(Al dorso) Visto por mí, Sr. Martinus Petrus Maria Philips, notario público en Oss, Países Bajos, hoy 26 de agosto de 1998, para legalización de las firmas de F.G.M. Hermans y E.H. Reerink. (Firma ilegible).

(Legalización) CAMARA DE INDUSTRIA Y COMERCIO LA HAYA - PRABANT (PAÍSES BAJOS). Visto exclusivamente para la legalización de la(s) firma(s) que antecede(n). Agosto 27 de 1998. (Firma ilegible) J. Schellenkens.



(Sello en holandés).

(En español) Certificación de las firmas que anteceden y de la existencia legal de AKZO NOBEL N.V. expedida por el Consulado de Colombia en La Haya el día 6 de noviembre de 1998, bajo el No.

206. Firmado JOSE IGNACIO VILLEGAS CORTES, Cónsul de Colombia, La Haya. Pagado impuesto de timbre.

(Al dorso) Legalización de la firma que antecede expedida por el MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES bajo el No. 300803 del 19 de NOVIEMBRE de 1998, firmado por el Jefe de Legalizaciones.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

COLO 11214-801-001-3

Id. 6

Nov. 20/98

Maria E. Martelo
TRADUCCION No. 11214-801-001-3
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

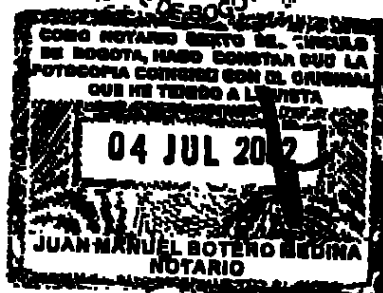
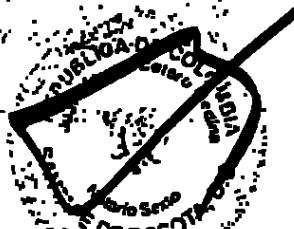
COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIRMA(S) FUE(RO)N POR

[Signature]

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 23 NOV. 1998



198457
Maria Martelo
CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

98 NOV 24 PM 12:06
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

B ✓
35

CAVELIER
ABOGADOS
 EDIFICIO SISKI
 CARRERA 4ª N° 72-35
 BOGOTÁ, 8- COLOMBIA

CESION

ASSIGNMENT

Yo, (nosotros), abajo firmado(s)

I (we), the undersigned

EGGEN,
Ivo, Franci

TEN KORTENAAR,
Paulus, Bernardus, Wilhelmus

HAASNOOT,
Cornells, Albert, Gruson

domiciliado (s) en

Diosynth B.V.
P.O. Box 20,
5340 BH Oss
The Netherlands

Diosynth B.V.
P.O. Box 20,
5340 BH Oss
The Netherlands

of

Diosynth B.V.
P.O. Box 20,
5340 BH Oss
The Netherlands

declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s)
 inventor(es) de la invención:

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the
 invention:

"Process for rapid solution synthesis of peptides"

declaro(amos) así mismo que cedo(emos) y transfiero
 (erimos), sin limitación, a favor de la sociedad

state as well, that assign, without reservations or
 limitations in favour of

Akzo Nobel N.V.

constituida y existente de conformidad con las leyes de

a corporation constituted and existing in conformity
 with the laws of

The Netherlands

domiciliada en

domiciled in

Velperweg 76

6824 BM ARNHEM

The Netherlands

todos los derechos inherentes a dicha invención y
 que los citada Compañía queda facultada para
 solicitar en su nombre la patente correspondiente
 en la República de Colombia.

all rights inherent to said invention and that the above
 mentioned company hereby is enabled to apply, in its
 name, for the corresponding patent in the
 Republic of Colombia

Dado y firmado hoy/Given and signed this

28 - June 2002

EGGEN,
Ivo, Franci

TEN KORTENAAR,
Paulus, Bernardus, Wilhelmus

HAASNOOT,
Cornells, Albert, Gruson

en/in

Firma

Signature

28-6-02

(Legalization required)

(Legalización necesaria)

AUTENTICACION NOTARIAL (INDIVIDUE)

NOTARIAL AUTHENTICATION (INDIVIDUAL)

A los días del mes de _____ de 19 _____
ante mí, Notario Público de _____
compareció(eron) personalmente _____

On this__ day of _____ 19 _____
before me, a Notary Public of _____
personally appeared _____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y
quien(es) tiene(n) capacidad legal para otorgarlo.

to me known, and known to me to be the person(s) who
executed that foregoing document, and who has(have)
legal capacity to execute it.

_____ Notario Público _____ Notary Public _____

Seen by me, mr. Robbert Alexander Gallas, civil-law notary practising in The Hague, for the authentication of the signatures on the attached document of:

- Mr Ivo Franci Eggen, born on the eighteenth of March nineteenhundred sixty-nine in Heelen, The Netherlands, residing at Oss, The Netherlands, holder of a Dutch passport, number N96874650;
- Mr Paulus Bernardus Wilhelmus Ten Kortenaar, born on the twentieth of January nineteenhundred fifty-three in Amsterdam, The Netherlands, residing at Wijchen, The Netherlands, holder of a Dutch drivers licence, number 3104824421, and
- Mr Cornelis Albert Curson Haasnoot, born on the second of July nineteenhundred fifty-one in Rotterdam, The Netherlands, residing at Wijchen, The Netherlands, holder of a Dutch drivers licence, number 3174252581,

The Hague, the eighth of July twothousandtwo.



All instructions are carried out on the basis of an agreement as meant in Section 400 of Book 7 of the Dutch Civil Code by Pels Rijcken & Droogleevers Fortuijn, a partnership consisting of private companies with limited liability. The agreement is subject to terms of business registered with the District Court at The Hague. A limitation of liability is included in these terms of business. The terms of business will be provided on request. These can also be accessed at www.pdf.nl.

2

A P O S T I L L E

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: THE NETHERLANDS
This public document
2. has been signed by mr. A.A. Gallas
3. acting in the capacity of notary at 's-Gravenhage
4. bears the seal/stamp of aforesaid notary

Certified

5. at 's-GRAVENHAGE 6. the 9 juli 2002
7. by the registrar of the court (rechtbank)
8. no. 2002-1923
9. Seal/stamp:

10. Signature:

J. Heesterman



A large, stylized handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. Heesterman', written over a horizontal line.

TRADUCCIÓN OFICIAL 101/2002 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL, REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL APROBADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA Y MEDIANTE EL CUAL **EGGEN, Ivo Franci; TEN KORTENAAR, Paulus Bernardus Wilhelmus y HAASNOOT, Cornelis Albert Gruson**, LOS TRES DOMICILIADOS EN DIOSYNTH B.V. P.O. BOX 20, 5340 BH OSS, THE NETHERLANDS (PAÍSES BAJOS) INVENTORES ÚNICOS Y VERDADEROS DE LA INVENCION: **PROCESO PARA SÍNTESIS**

RÁPIDA EN SOLUCIÓN DE PÉPTIDOS, POR EL PRESENTE

DECLARAN QUE CEDEN DICHA INVENCION A AKZO NOBEL N.V., EMPRESA ORGANIZADA Y EXISTENTE BAJO LAS LEYES DE LOS PAÍSES BAJOS, DOMICILIADA EN VELPERWEG 76, 6824 BM ARNHEM, THE NETHERLANDS, JUNTO CON TODOS LOS DERECHOS INHERENTES Y QUE DICHA COMPAÑÍA QUEDA FACULTADA PARA SOLICITAR EN SU NOMBRE LA PATENTE CORRESPONDIENTE EN LA REPÚBLICA DE COLOMBIA.

DADO Y FIRMADO HOY 28 DE JUNIO DE 2002.

TRES FIRMAS: DE IVO, FRANCI EGGEN; DE PAULUS BERNARDUS WILHELMUS TEN KORTENAAR Y DE CORNELIS ALBERT GRUSON HAASNOT

Visto por mi ROBBERT ALEXANDER GALLAS, notario de ley civil quien practica en LA HAYA para la autenticación en el documento adjunto de las firmas que allí aparecen de:

Ivo Franci Eggen, nacido el dieciocho de marzo de mil novecientos sesenta y nueve en Heelen, Países Bajos, residente en Oss, Países Bajos, portador del pasaporte holandés número N96874650; de Paulus Bernardus Wilhelmus Ten Kortenaar, nacido el veinte de enero de mil novecientos cincuenta y tres en Amsterdam, Países Bajos, residente en Wijchen, Países Bajos, portador de la licencia de conducción holandesa número 3104824421 y de Cornelis Albert Curson Haasnoot, nacido el 2 de julio de mil novecientos cincuenta y uno en Rotterdam, Países Bajos, residente en Wijchen, Países Bajos, portador de la licencia de conducción holandesa número 3174252581 La Haya, 8 de julio de 2002.

Firma ilegible

Sello: Señor R.A. Gallas

Todas las instrucciones se realizan con base en un convenio de acuerdo con la Sección 400 del Libro 7 del Código Civil Holandés por Pels Rijcken & Droogleever Fortuijn, una sociedad formada por compañías privadas combinadas con una de responsabilidad limitada. El convenio está sujeto a las condiciones del negocio registrado ante la Corte de Distrito de La Haya. Una limitación de responsabilidad se incluye en estas condiciones del negocio. Dichas condiciones del negocio se suministrarán si así se solicitan. Ellas pueden ser consultadas en la dirección de internet: www.prdf.nl.

Pels Rijcken & Droogleever Fortuijn

APOSTILLA:

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. Los Países Bajos

Este documento público

2. ha sido firmado por R.A. GALLAS

3. quien actúa en su calidad de NOTARIO DE GRAVENHAGE (LA HAYA)

4. lleva el sello del NOTARIO PÚBLICO arriba mencionado
CERTIFICADO

5. en GRAVENHAGE

6. el 9 de julio de 2002

7. por el registrador del juzgado

8. Número 2002-1923

9. Sello:

10. Firma: J. Heesterman

(firma ilegible)

COLO-11214-801-028-6

WPCL002G. ID 3515

Bogotá, 15 de julio de 2002.

Eduardo Calado N.

Eduardo Calado Noguera
"TRADUCTOR OFICIAL"
BULE - ESPAÑOL - INGLÉS
Res 54. febrero de 1999

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
COLOMBIA
CUBA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPLEA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2002 JUL 15 P 12:19
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LAS ANTERIORES (MA(S) PUESTAS) POS

[Signature]

LOS C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTA FE DE BOGOTA, 16 JUL 2002



NOTARIO

[Signature]

FRIO MENDEZ

EL ALIAS



**Europäisches
Patentamt**

**European
Patent Office**

**Office européen
des brevets**

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

01202753.8

Der Präsident des Europäischen Patentamts:
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk

**DEN HAAG, DEN
THE HAGUE, 19/06/02
LA HAYE, LE**

42



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

**Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation**

Anmeldung Nr.:
Application no.:
Demande n°: **01202753.8**

Anmeldetag:
Date of filing:
Date de dépôt: **19/07/01**

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
**Akzo Nobel N.V.
6824 BM Arnhem
NETHERLANDS**

Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:
Process for rapid solution synthesis of peptides

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat: State: Pays:	Tag: Date: Date:	Anzeichen: File no. Numéro de dépôt:
---------------------------	------------------------	--

Internationale Patentklassifikation:
International Patent classification:
Classification internationale des brevets:
/

Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:
Contracting states designated at date of filing:
Eats contractants désignés lors du dépôt: **AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE/TR**

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

PROCESS FOR RAPID SOLUTION SYNTHESIS OF PEPTIDES

The invention relates to a new and versatile process for rapid solution synthesis of peptides, wherein the growing peptide is present in a permanent organic phase and is not isolated before
5 the assembly of the desired sequence is completed.

Peptides are synthesised either on a solid support or in solution. In both approaches coupling and deprotection steps repetitively alternate and, depending on the approach, may be separated by intermittent purifications.

- 10 In the solid phase approach, a sequence is assembled completely while attached to a solid support before it is eventually cleaved from said support. Removal of excess reagents and by-products takes place by filtration. Solid phase synthesis clearly has advantages: it is more or less generally applicable and easy to automate. However, it has also some serious drawbacks. For example, reactions are diffusion-controlled and are usually rather slow under the applied
15 heterogeneous conditions: in order to avoid deletion sequences excesses of reagents are needed. In addition, all reactive side chains of the growing peptide must be protected: since no intermittent purifications take place, side reactions due to the presence of unprotected side chains may lead to impurities in the final product. The solid phase approach is difficult to scale up and it is costly in terms of reagents and materials.
- 20 The classical solution phase approach, on the other hand, is easier to scale up and is less expensive in terms of reagents and materials. Fully protected amino acids are usually not needed, since by-products resulting from side reactions of unprotected side chains may be removed by intermittent purifications. However, the solution phase approach requires sequence-specific protocols and the production of a complete sequence is very time-consuming.
- 25 Because of the drawbacks of these approaches there is a need for a process which combines the advantages of both these classical methods, in particular for large scale syntheses of peptides. A new process should be rapid, easy to scale up and generally applicable.

- 30 In solution phase synthesis, a slight excess of an activated carboxylic component is preferably used in each coupling step to ensure quantitative coupling to an amino component; thus the occurrence of deletion sequences in the final product can be avoided. It is usually assumed that

the residual activated carboxylic component is destroyed and removed during the intermittent aqueous work-up. Insertion peptide sequences, however, are often encountered as impurities of the final peptide due to incomplete removal of residual (activated) carboxylic component after a coupling step, which subsequently has coupled following deprotection. In order to avoid the occurrence of said side reactions a scavenging step may be introduced directly after the coupling step to scavenge (inactivate) the residual activated carboxylic functions. Amines are usually applied as scavengers. The use of polyamines as scavengers leads to scavenged compounds which may be actively extracted into a - preferably acidic - aqueous phase, depending on their polarity [e.g. Kisfaludy, L. *et al.* (1974) *Tetrahedron Lett.* 19, 1785-1786]. This extraction is usually performed before the deprotection step to avoid loss of the growing peptide into the aqueous phase. However, this procedure has in numerous cases been found to result in incomplete intermittent purification due to the hydrophobicity of the scavenged compound: the intrinsic hydrophobicity of the amino acyl part of the carboxylic component is enhanced by the still present amino-protecting group. Aqueous extraction is thus not completely effective.

15 Recently, Carpino, L.A. *et al.* [(1999) *J. Org. Chem.* 64, 4324-4338] reported an improvement of the scavenging method. In addition to the use of a polyamine as a scavenger the amino-protecting group 1,1-dioxobenzo[*b*]thiophene-2-ylmethoxycarbonyl (Bamoc) was applied in the process. The Bamoc function has very high lability towards base. As a result thereof, residual activated carboxylic functions are scavenged and Bamoc functions are removed in one and the same step using a polyamine. The use of the Bamoc function has been described as a significant improvement for the production of (oligo)peptides using rapid continuous solution phase techniques allowing the assembly of a peptide in a single series of steps within a relatively short period of time.

20 A new process has now been found for rapid continuous solution synthesis of peptides, wherein a scavenger is used which allows an essentially arbitrary choice of the amino-protecting group (the protecting group at the N-terminus of the activated carboxylic component). In contrast to the Carpino process, deprotection of the N-terminal function does not necessarily take place under the same reaction conditions as the scavenging of excess of activated carboxylic functions.

30 Therefore, the process of this invention is much more generally applicable than the Carpino process.

✓

The new process according to this invention is a process for rapid solution synthesis of a peptide comprising repetitive cycles of steps (a)-(d):

(a) a coupling step, using an excess of an activated carboxylic component to acylate an amino component,

5 (b) a quenching step in which a scavenger is used to remove residual activated carboxylic functions, wherein the scavenger may also be used for deprotection of the growing peptide (i.e. the peptide that is being formed),

(c) one or more aqueous extractions and

optionally, (d) a separate deprotection step, followed by one or more aqueous extractions, 10 characterised in that the growing peptide is present in a permanent organic phase and is not isolated until the final peptide sequence (i.e. final product of the process of this invention) has been obtained, and the process comprises at least one step (b), referred to as step (b'), in which an amine comprising a free anion or a latent anion is used as a scavenger of residual activated carboxylic functions.

15 Since during the process of the invention the growing peptide is not isolated, the process is significantly less time-consuming than the classical solution phase processes and easy to scale up. The process of this invention allows for highly efficient removal of residual activated carboxylic component without encountering the hydrophobicity problems of other prior art processes in which polyamines are used as scavengers. Thus peptides of high purity are obtained.

20 Preferably, in step (a) of the process of this invention the molar amounts of the reagents used are in decreasing order: carboxylic component, coupling additive > coupling reagent > amino component. Further preferred is a process wherein in step (a) a pre-activated carboxylic component is used.

In another preferred embodiment, in step (b') an amine comprising a latent anion is used as the 25 scavenger. Preferably, the latent anion in the scavenging amine bears a temporary protecting group which can be selectively removed in the presence of any permanent protecting group attached to the growing peptide. In a particularly preferred embodiment the protecting group of the latent anion in the scavenging amine displays a lability similar to that of the temporary protecting group present at the N-terminus of the growing peptide. This allows the deprotection 30 of the scavenger yielding the anion and the N-terminal deprotection of the growing peptide to take place in a single process step. Especially preferred is the process of the invention wherein

the temporary protecting groups, present at the N-terminus of the growing peptide and optionally present in the scavenger, are hydrogenolytically removable groups whereas the permanent protecting groups are acidolytically removable protecting groups. Preferably, said temporary protecting groups are of the benzyl type, e.g. (substituted) benzyl and benzyloxycarbonyl groups. A preferred scavenger is a primary amine comprising a free anion or a latent anion, and in particular a C-terminally protected amino acid derivative. Besides carboxylate, the scavenging amine may comprise other anionic functions such as sulfonate or phenolate. A highly preferred amino acid for use as a scavenger is β -alanine or a derivative thereof (e.g. an ester derivative). The most preferred scavenger is benzyl β -alaninate or a salt thereof.

The use of a scavenger according to the present invention leads to hydrophilic scavenged compounds which may be actively extracted into a basic aqueous phase after the deprotection step: upon deprotection (if applicable), hydrophilicity is enhanced by the presence of both a free amino function and a free carboxylic function in the scavenged species. Thus, the process of this invention results in a very effective intermittent purification due to the possibility of actively extracting a hydrophilic scavenged compound. In addition, a possibly present excess of carboxylic component which was not activated and whose temporary protecting group was also removed during deprotection, is extracted from the reaction mixture at the same time.

According to the process of this invention, each cycle of the process may comprise a step (b') wherein a free anion or a latent anion is used as a scavenger of residual activated carboxylic functions. However, according to a further embodiment of this invention, the process may comprise also one or more cycles wherein in step (b) a polyamine is used as the scavenger.

Another preferred process of this invention comprises one or more cycles wherein in step (b) deprotection does not occur (thus the circumstances are chosen such that the scavenger is only used for quenching, e.g. using the Z protecting group and an amine comprising a latent anion as a scavenger) and the subsequent step (c) comprises sequential basic, acidic and basic extractions, which are preferably performed in the presence of sodium chloride. This process comprises a subsequent step (d) which comprises deprotection and sequential basic and neutral extractions; these extractions are preferably performed in the presence of sodium chloride.

Another preferred process of this invention comprises one or more cycles wherein in step (b) both quenching and deprotection occur (e.g. using the Bmoc protecting group and a polyamine

✓

as a scavenger) and the subsequent step (c) comprises sequential basic and neutral extractions, which are preferably performed in the presence of sodium chloride.

Also preferred is a process, wherein in the last cycle in step (a) the protecting groups of the carboxylic component display a similar lability to that of the permanent protecting groups of the amino component and in step (b) the scavenger is a polyamine.

The process according to this invention may be performed in several organic solvents which are commonly used for the production of peptides. A highly preferred permanent organic phase (organic solvent) in which the growing peptide is continuously present is ethyl acetate or a mixture of ethyl acetate and dichloromethane. Also preferred are mixtures of ethyl acetate and other organic solvents, such as 1-methyl-2-pyrrolidinone or *N,N*-dimethylformamide.

The process of this invention may be performed at temperatures well known in the art for such steps in classical solution phase peptide synthesis. However, preferably the process is performed within a temperature range of 0 to 50 °C, and in particular at ambient temperature.

The process of this invention is very suitable for combinatorial synthesis of peptide libraries using the split and mix method. Couplings are performed separately while the individual coupling mixtures are combined for extractions and deprotections.

The process of this invention is very suitable for automation since standard protocols are used.

The new process of this invention is a highly efficient process which may conveniently be used in the production of oligo- and polypeptides of high purity.

A suitable process according to the present invention is the coupling of an excess of a carboxylic component to an amino component, wherein the carboxylic function is pre-activated or activated *in situ* using a coupling reagent and, if desired, an additive. Following the coupling step, residual activated carboxylic functions are scavenged by adding the scavenger to the reaction mixture.

Subsequently or at the same time, temporary protecting groups are removed using suitable methods known in the art, followed by removal of the scavenged compound by aqueous extraction. At the same time, a possibly present excess of carboxylic component which was not activated and whose temporary protecting group was also removed during deprotection, as well as other water-soluble reagents and by-products are extracted from the reaction mixture. Next, another cycle of coupling, quenching, deprotection and extraction steps may follow depending on the length of the desired peptide.

The term amino component refers to a molecule comprising a free amino function. In particular, the amino component may be any amine, amino acid or oligopeptide which bears a free amino function and whose other functional groups are protected in such a manner that they do not interfere with the desired coupling reaction. The C-terminal function of the applied amino acid or oligopeptide may be protected as a substituted or unsubstituted amide or as an ester; examples of the latter include – but are not limited to – methyl, ethyl, *t*-butyl, benzyl, phenacyl, 3-(3-methyl)pentyl (Mpe), 2-(2-phenyl)propyl (Pp), 2-chlorotriyl (Clt), diphenyl(4-pyridyl)methyl (PyBzh), dicyclopropylmethyl (Dcpm), 9-fluorenylmethyl (Fm), allyl (All), 2-(trimethylsilyl)ethyl (Tmse) and 4-{N-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)-3-methylbutyl]-amino}benzyl (Dmab) esters [Rocake, R.W. (1981) in: *The Peptides*, vol. 3 (Gross, E. and Meisenhofer, J., eds.) Academic Press, New York, pp. 101-136; for Mpe: Karlström, A. and Undén, A. (1996) *Tetrahedron Lett.* 37, 4343-4246; for Pp: Yue, C. *et al.* (1993) *Tetrahedron Lett.* 34, 323-326; for Clt: Athanassopoulos, P. *et al.* (1995) *Tetrahedron Lett.* 36, 5645-5648; for PyBzh: Mergler, M. *et al.* (2001) P154, 2nd International Peptide Symposium & 17th American Peptide Symposium; for Dcpm: Carpino, L.A. *et al.* (1995) *J. Org. Chem.* 60, 7718-7719; for Fm: Al-Obeidi, F. *et al.* (1990) *Int. J. Peptide Protein Res.* 35, 215-218; for All: Kunz, H. *et al.* (1985) *Int. J. Peptide Protein Res.* 26, 493-497; for Tmse: Sieber, P. (1977) *Helv. Chim. Acta* 60, 2711-2716; for Dmab: Chan, W.C. *et al.* (1995) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 2209-2210]. Functions of the *t*-butyl type or functions of similar lability are preferred for the permanent protection of other functional groups; these include – but are not limited to – *t*-butyl (Bu) for the protection of the Asp, Glu, Ser, Thr and Tyr side chains, *t*-butoxycarbonyl (Boc) for the protection of the Lys and Trp side chains, trityl (Trt) for the protection of the Asn, Gln and His side chains and 2,2,5,7,8-pentamethylchromano-6-sulfonyl (Pmc) or 2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) for the protection of the Arg side chain [Barany, G. and Merrifield, R.B. (1980) in: *The Peptides*, vol. 2 (Gross, E. and Meisenhofer, J., eds.) Academic Press, New York, pp. 1-284; for Trp(Boc): Franzén, H. *et al.* (1984) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1699-1700; for Asn(Trt) and Gln(Trt): Sieber, P. and Rinkler, B. (1991) *Tetrahedron Lett.* 32, 739-742; for His(Trt): Sieber, P. and Rinkler, B. (1987) *Tetrahedron Lett.* 28, 6031-6034; for Pmc: Ramage, R. and Green, J. (1987) *Tetrahedron Lett.* 28, 2287-2290; for Pbf: Carpino, L.A. *et al.* (1993) *Tetrahedron Lett.* 34, 7829-7832].

- The term carboxylic component refers to a molecule comprising a free carboxylic function. In particular, the carboxylic component may be any carboxylic acid, amino acid or oligopeptide which bears a free carboxylic function and whose other functional groups are protected in such a manner that they do not interfere with the desired coupling reaction. In a preferred embodiment,
- 5 the amino group of the applied amino acid or oligopeptide is temporarily protected by a benzyloxycarbonyl (Z) function; other examples include but are not limited to – the Boc, Trt, fluoren-9-ylmethoxycarbonyl (Fmoc), 2-(methylsulfonyl)ethoxycarbonyl (Msc), allyloxycarbonyl (Alloc) functions or functions of the arylsulfonyl type, such as *ortho*-nitrobenzenesulfonyl (*o*-NBS) [Geiger, R. and König, W. (1981) in: *The Peptides*, vol. 3 (Gross, E. and Meienhofer, J., eds.) Academic Press, New York, pp. 1-99; for Alloc: Kimm, H. and Unverzagt, C. (1984) *Angew. Chem.* 96, 426-427; for arylsulfonyl: Fukuyama, T. *et al.* (1997) *Tetrahedron Lett.* 38, 5831-5834]. Functions of the *t*-butyl type or functions of similar lability are preferred for the permanent protection of other functional groups as described above. The carboxylic component may be preactivated as an active ester, preferably an *N*-hydroxysuccinimide, benzotriazol-1-yl,
- 10 pentafluorophenyl or 4-nitrophenyl ester, a halide, an *N*-carboxyanhydride or as a symmetric anhydride. Alternatively, the carboxylic component may be activated *in situ* as a mixed anhydride or using a coupling reagent, such as a carbodiimide, preferably *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) or 1-(3'-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), a uronium or a phosphonium salt in the possible presence of a coupling additive, preferably *N*-hydroxysuccinimide (HONSu), 1-hydroxybenzotriazole (HOBt), 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-
- 15 1,2,3 benzotriazine (HOObt), 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) or 6-chloro-1-hydroxybenzotriazole (Cl-HOBt) and if required in the presence of a tertiary amine [*The Peptides*, vol. 1 (1979) (Gross, E. and Meienhofer, J., eds.) Academic Press, New York; Li, P. and Xu, J.-C. (2000) *Chin. J. Chem.* 18, 456-466].
- 20 The temporary protecting group may be removed according to methods known in the art (*vide supra*). The Z function may be removed by hydrogenolysis using standard procedures. During this process all benzyl-type protecting groups are removed and protecting groups of the *t*-butyl type or functions of similar lability are maintained. The latter may be removed by acidolysis according to the methods known in the art.
- 25 A person skilled in the art will understand what is meant with the term basic aqueous extraction. However, basic aqueous extractions are preferably performed using aqueous solutions of sodium
- 30

hydrogencarbonate or sodium carbonate, if desired in the presence of sodium chloride. The term active aqueous extraction refers to an extraction in which either an amino component is extracted under acidic conditions in the completely protonated form (ammonium) or a carboxylic component is extracted under basic conditions in the completely deprotonated form (carboxylate).

The invention is further illustrated by the following example, which is not to be interpreted as a limitation of this invention.

10 EXAMPLE

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

To a stirred solution of 4.34 g of H-Ser(Bu)-O'Bu in a mixture of ethyl acetate and dichloromethane at 20 °C, were added 3.24 g of 1-hydroxybenzotriazole, 7.76 g of Z-Asp(O'Bu)-OH, 4.20 g of 1-(3'-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride and 2.42 ml of 4-methylmorpholine. After stirring the resulting solution until completion of the reaction, 1.21 ml of 4-methylmorpholine and 3.51 g of benzyl β-alanine *p*-toluenesulfonate salt were added. The mixture was stirred for another 30 minutes and was extracted with 5 % Na₂CO₃ / 10 % NaCl, 5 % KHSO₄ / 10 % NaCl and 5 % Na₂CO₃ / 10 % NaCl.

The organic layer containing the protected dipeptide Z-Asp(O^tBu)-Ser(^tBu)-O^tBu was subjected to catalytic hydrogenolysis in the presence of palladium on charcoal. Upon completion of the reaction, 5 % Na₂CO₃ / 10 % NaCl was added and the resulting suspension was filtered. The residue was washed with a mixture of ethyl acetate and dichloromethane, and the combined filtrates were extracted with 5 % Na₂CO₃ / 10 % NaCl and 30 % NaCl.

To the organic layer containing the dipeptide H-Asp(O^tBu)-Ser(^tBu)-O^tBu at 20 °C, were added 3.24 g of 1-hydroxybenzotriazole, 7.18 g of Z-Phe-OH, 4.20 g of 1-(3'-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride and 2.42 ml of 4-methylmorpholine. After stirring the resulting solution until completion of the reaction, 1.21 ml of 4-methylmorpholine and 3.51 g of benzyl β-alaninate *p*-toluenesulfonate salt were added. The mixture was stirred for another 30 minutes and was extracted with 5 % Na₂CO₃ / 10 % NaCl, 5 % KHSO₄ / 10 % NaCl and 5 % Na₂CO₃ / 10 % NaCl.

The organic layer containing the protected tripeptide Z-Phe-Asp(O^tBu)-Ser(^tBu)-O^tBu was subjected to catalytic hydrogenolysis in the presence of palladium on charcoal. Upon completion of the reaction, 5 % Na₂CO₃ / 10 % NaCl was added and the resulting suspension was filtered. The residue was washed with a mixture of ethyl acetate and dichloromethane, and the combined filtrates were extracted with 5 % Na₂CO₃ / 10 % NaCl and 30 % NaCl.

To the organic layer containing the tripeptide H-Phe-Asp(O^tBu)-Ser(^tBu)-O^tBu at 20 °C, were added 3.24 g of 1-hydroxybenzotriazole, 4.21 g of Boc-Gly-OH, 4.20 g of 1-(3'-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride and 2.42 ml of 4-methylmorpholine. After stirring the resulting solution until completion of the reaction, 1.25 ml of 3-dimethylamino-1-propylamine was added. The mixture was stirred for another 30 minutes and was extracted with 5 % Na₂CO₃ / 10 % NaCl, 5 % KHSO₄ / 10 % NaCl, 5 % Na₂CO₃ / 10 % NaCl, 30% NaCl and water. The organic layer was filtered, dried over Na₂SO₄ and evaporated to dryness to give the desired protected tetrapeptide in 95 % yield based on the starting material H-Ser(^tBu)-O^tBu. The process was completed within 6 hours.

Purity: 98.1 % by reversed phase HPLC (24 to 68 % acetonitrile in 0.1 % trifluoroacetic acid in 29 minutes at 220 nm, 2.0 ml/min, 5 micron C₁₈ column). Identity: *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]⁺ by electrospray MS; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.16 (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).

Conclusion: The protected tetrapeptide was produced without intermittent isolation of the growing peptide. The purity and identification of the obtained product demonstrate that the excesses of (activated) carboxylic components have been removed completely in all stages of the process and no insertion sequences have been formed using the process of this invention. The product is obtained in high yield and purity within a relatively short period of time.

CLAIMS

1. A process for rapid solution synthesis of a peptide, the process comprising repetitive cycles of steps (a)-(d):

5 (a) a coupling step, using an excess of an activated carboxylic component to acylate an amino component,

(b) a quenching step in which a scavenger is used to remove residual activated carboxylic functions, wherein the scavenger may also be used for deprotection of the growing peptide,

(c) one or more aqueous extractions and

10 optionally, (d) a separate deprotection step, followed by one or more aqueous extractions, characterised in that

the growing peptide is present in a permanent organic phase and is not isolated until the final peptide sequence has been obtained, and the process comprises at least one step (h), referred to as step (h'), in which an amine comprising a free anion or a latent anion is used as a

15 scavenger of residual activated carboxylic functions.

2. The process of claim 1, wherein in step (a) the molar amounts of the reagents used are in decreasing order:

carboxylic component, coupling additive > coupling reagent > amino component.

20

3. The process of claim 1, wherein in step (a) a pre-activated carboxylic component is used.

4. The process of any one of claims 1-3, wherein in step (h') an amine comprising a latent anion is used as the scavenger.

25

5. The process of claim 4, wherein the latent anion in the scavenging amine bears a temporary protecting group which can be selectively removed in the presence of any permanent protecting groups attached to the growing peptide.

6. The process of claims 4 or 5, wherein the latent anion in the scavenging amine bears a temporary protecting group which displays a lability similar to that of the temporary protecting group present at the N-terminus of the growing peptide.

5 7. The process of claims 5 or 6, wherein the temporary protecting groups are hydrogenolytically removable groups whereas the permanent protecting groups are acidolytically removable groups.

8. The process of claim 7, wherein the temporary protecting groups are of the benzyl type.

10

9. The process of any one of claims 4-8, wherein the scavenger is a primary amine comprising a free anion or a latent anion.

15

10. The process of claim 9, wherein the primary amine is a C-terminally protected amino acid derivative.

11. The process of claim 10, wherein the amino acid is β -alanine or a derivative thereof.

12. The process of claim 11, wherein the scavenger is benzyl β -alaninate or a salt thereof.

20

13. The process of any one of claims 1-12, wherein the process comprises one or more cycles wherein in step (b) a polyamine is used as the scavenger.

25

14. The process of any one of claims 1-13, comprising one or more cycles wherein in step (b) deprotection does not occur and the subsequent step (c) comprises sequential basic, acidic and basic extractions.

15. The process of claim 14, wherein the extractions are performed in the presence of sodium chloride.

30

JY

16. The process of claim 14 or 15, comprising a subsequent step (d) which comprises deprotection and sequential basic and neutral extractions.

17. The process of claim 16, wherein the extractions are performed in the presence of sodium chloride.

18. The process of any one of claims 1-13, comprising one or more cycles wherein in step (b) both quenching and deprotection occur and the subsequent step (c) comprises sequential basic and neutral extractions.

19. The process of claim 18, wherein the extractions are performed in the presence of sodium chloride.

20. The process of any one of claims 1 - 19, wherein in the last cycle in step (a) the protecting groups of the carboxylic component display a similar lability to that of the permanent protecting groups of the growing peptide and in step (b) the scavenger is a polyamine.

21. The process of any one of claims 1-20, wherein the organic phase is ethyl acetate or a mixture of ethyl acetate and dichloromethane.

22. The process of any one of claims 1-21, wherein the process is performed within a temperature range of 0 to 50 °C.

23. The process of claim 22, wherein the process is performed at ambient temperature.

24. A method for combinatorial synthesis of peptide libraries using the split and mix method, wherein the process of any one of claims 1-23 is applied.

25. A method for automated solution synthesis of peptides, wherein the process of any one of claims 1-24 is applied.

55

ABSTRACT

The present invention relates to a process for rapid solution synthesis of a peptide, the process comprising repetitive cycles of steps (a)-(d):

5 (a) a coupling step, using an excess of an activated carboxylic component to acylate an amino component,

(b) a quenching step in which a scavenger is used to remove residual activated carboxylic functions, wherein the scavenger may also be used for deprotection of the growing peptide,

(c) one or more aqueous extractions and

10 optionally, (d) a separate deprotection step, followed by one or more aqueous extractions, characterised in that

the growing peptide is present in a permanent organic phase and is not isolated until the final peptide sequence has been obtained, and the process comprises at least one step (b), referred to as step (b'), in which an amine comprising a free anion or a latent anion is used as a scavenger of

15 residual activated carboxylic functions.

This highly efficient process is useful for the production of oligo- and polypeptides of high purity.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

NIT : 800174089-2

Radicación : 02061736 00000000

Folios: 57

Fecha (IMP): 2002-07-27 17:20:11

Trámite : QUE PUNTOS 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	5087339	01/04/2002	37,092,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	78,000.00
		7 TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUS	78,000.00
		TOTAL :	156,000.00

SON: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

610 11214-801-027-B

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800174089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 02061736 00000000
Fecha (RND) : 2002-07-17 17:20:21
Tramite : 002 PATENTES Y 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 8020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 57

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 33,594
FECHA : MAYO 23 DE 2002

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2874479	23/05/2002	9.928.000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN MI	106.000.00
	TOTAL :	106.000.00

SON: CIENTO SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

0610 11714-801-027-8

REQUISITOS NEC SARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

USUARIO RADICADOR

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD

[] []

[] []

[] []

[] []

[] []

[] []

COMPLETA

INCOMPLETA

[] []

DISEÑO INDUSTRIAL

Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial

[] []

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

[] []

Representación gráfica y foto gráfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño

[] []

Comprobante de pago de las tasas establecidas

[] []

COMPLETA

INCOMPLETA

[] []

ESQUEMA DE TRAZADO

Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado

[] []

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

[] []

Representación gráfica del esquema de trazado

[] []

Comprobante de pago de las tasas establecidas

[] []

COMPLETA

INCOMPLETA

[] []

Firma Responsable

Fecha

Carrera 13 No 27-00 Piso 2 m 2
Gonm tador 302 08 40
Fax 350 52 20 e-mail o@sic.g
Bogotá D C Colombia