

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4 No 72 35

BOGOTA 8 COLOMBIA

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

TELEFONO (57) (1) 347 3611

TELEFAX (57) (1) 217 9211 (57) (1) 310-4995

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicación 02061740 00000001

Folios: 21

Fecha (ARD): 2002-11-19 17:05:09

Trámite 002 PATENTES y 1 REGISTRO/ 329 COMPLETOS
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

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

Trámite 002

Evento 001

Actuación 329

Referencia Expediente No 02 061 740

Solicitante AKZO NOBEL N V

Asunto Solicitud de patente para PROCEDIMIENTO
PARA LA PREPARACIÓN DE COMPUESTOS
QUE CONTIENEN UNO O MAS ENLACES
AMIDA, EN PARTICULAR PEPTIDOS

Fecha de presentación 17 de julio de 2002

Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, atentamente presento la traducción al español de la copia básica Europea No 01202751 2, presentada el 19 de julio de 2001 El documento original de prioridad se presentó junto con la solicitud

Atentamente solicito que se continúe con su tramitación

Bogotá, 19 NOV 2002
Señora Jefe,



EMILIO FERRERO
T P A No 31 929



Colo 11214 801 028 6
JBP/mrm Id 188

OFICINA DE PATENTES EUROPEA

Certificado

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

Solicitud de patente No 01202751 2

Por el Presidente de la Oficina de Patentes de Europea

(Firmado ilegible)

R C van Dijk

La Haya, 19/06/02

OFICINA DE PATENTES EUROPEA

Página 2 del certificado

Solicitud Nº 01202751-2 Fecha de presentación 19/07/01

Solicitante (s)

AKZO NOBEL N V

6824 BM Arnhem

Holanda

Título del invento PROCESO PARA LA PREPARACIÓN DE PEPTIDOS

Prioridades reivindicadas

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

Clasificación Internacional de Patente

Países contratantes designados en la fecha de presentación

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

Observaciones

PROCESO PARA LA PREPARACIÓN DE PEPTIDOS

La invención se relaciona con un proceso nuevo y versátil para la preparación de péptidos, especialmente para procesos llevados a cabo en solución

Los péptidos son sintetizados sea en solución o sobre un soporte sólido. En ambas enseñanzas las etapas de acoplamiento y desprotección repetidamente se alternan y pueden ser separadas por purificaciones intermitentes. Un exceso de un componente carboxílico activado es usado preferiblemente en una etapa de acoplamiento para asegurar el acoplamiento cuantitativo a un componente amino, así la ocurrencia de la eliminación de secuencias en el producto final puede ser evitado. En una síntesis de péptido de fase sólida el componente carboxílico residual activado se remueve usualmente por filtración y al final de cada etapa de acoplamiento. En la síntesis de fase en solución usualmente se asume que el componente carboxílico activado residual es destruido y removido durante el trabajo acuoso intermitente. La inserción de secuencias de péptido, sin embargo son frecuentemente encontradas en síntesis de fase en solución como impurezas del péptido final debido a la remoción

incompleta del componente carboxílico residual (activado) luego de una etapa de acoplamiento, la cual subsecuentemente se ha acoplado luego de la desprotección. Para poder evitar la ocurrencia de dichas reacciones laterales una etapa de secuestro puede ser introducida directamente después de la etapa de acoplamiento para secuestrar (inactivar) las funciones carboxílicas activadas residuales. Las aminos son usualmente aplicadas como secuestrantes. El uso de poliaminas como secuestrantes lleva a compuestos secuestrados que pueden ser extraídos activamente en una fase acuosa, preferiblemente ácida, que depende de su polaridad {por ejemplo, Kisfahady, I, et al (1974) Tetrahedron Lett 19, 1785-1786}. Esta extracción es usualmente llevada a cabo antes de la etapa de desprotección para evitar la pérdida del péptido en crecimiento en la fase acuosa. Sin embargo, este procedimiento se ha encontrado en numerosos casos que resulta en una purificación intermitente incompleta debido a la hidrofobicidad del compuesto secuestrado. La hidrofobicidad intrínseca de la parte acilo amino del componente carboxílico es promovida por la presencia todavía del grupo de protección amino. La extracción acuosa por lo tanto no es completamente efectiva.

Recientemente, Carpino, L A et al [(1999) J Org Chem 64, 4324-4338] reportó una mejora del método de secuestramiento. En adición al uso de una poliamina como un secuestrante el grupo de protección amino 1,1-dioxobenzo[b]diofeno-2-ilmetoxycarbonil (Bsmoc) fue aplicado en el proceso. La función Bsmoc tiene una alta labilidad hacia la base. Como resultado de esto, las funciones carboxílicas activadas residuales son secuestradas y las funciones Bsmoc son removidas en una y la misma etapa usando una poliamina.

Un nuevo proceso ha sido encontrado para la preparación de péptidos, en donde un exceso de un componente carboxílico activado es usado para asilar un componente amino, y en donde después de la asilación una amina comprende un anión libre o un anión latente (por ejemplo un anión que se forma después de la desprotección) es usado como secuestrante de las funciones carboxílicas activadas residuales. Este nuevo proceso permite una escogencia a esencialmente arbitraria del grupo de protección en los terminales N del componente carboxílico activado ya que, en contraste con el proceso Carpino, la desprotección del mismo no

necesariamente tiene lugar bajo las mismas condiciones de reacción que el secuestro del exceso de las funciones carboxílicas activadas. Más aún, el proceso de esta invención permite una remoción altamente eficiente del componente carboxílico activado residual sin encontrar problemas de hidrofobicidad de los procesos del estado de la técnica en los cuales la poliaminas son usadas como secuestrantes. Preferiblemente, el proceso de la invención tiene lugar en solución. Sin embargo, el proceso también puede ser aplicado en síntesis de péptido en fase sólida.

En una modalidad preferida, una amina que comprende un anión latente es usada como secuestrante. Preferiblemente, el anión latente en la amina secuestrante tiene un grupo de protección temporal que puede ser removido de manera selectiva en la presencia de cualquier grupo de protección permanente ligado al péptido en crecimiento. En una modalidad particularmente preferida, el grupo de protección del anión latente en la amina secuestrante muestra una labilidad similar a aquella del grupo de protección temporal presente en los terminales N del péptido en crecimiento. Esto permite la desprotección del secuestrante resultando el anión y la

desprotección del terminal N del péptido en crecimiento tiene lugar en una etapa de proceso única. Especialmente preferido es el proceso de la invención en donde en los grupos de protección temporal presentes en los terminales N del péptido en crecimiento y opcionalmente presente en el secuestrante, son grupos de remoción hidrogenolíticamente mientras que los grupos de protección permanente son grupos de protección removibles ácidolíticamente. Preferiblemente, dichos grupos de protección temporal son del tipo benzilo, por ejemplo benzilo (sustituidos) y grupos benziloxycarbonilo. Un secuestrante preferido es una amina primaria que comprende un anión libre o un anión latente, y en particular un derivado de ácido amino protegido con terminal C. Aparte del carboxilato, la amina secuestrante puede comprender otras funciones aniónicas tales como sulfonato o fenolato. Un ácido amino altamente preferido para uso como secuestrante es la β -alanina o un derivado de la misma (por ejemplo un derivado ester). El secuestrante más preferido es el benzil β -alanina o una sal del mismo.

El uso de un secuestrante de acuerdo con la presente invención lleva a compuestos secuestrados hidrofílicos

que pueden ser extraídos activamente en una fase acuosa básica luego de la etapa de desprotección luego de la desprotección (si es aplicable), la hidrofiliicidad es promovida por la presencia tanto de una función amino libre como una función carboxílica libre en las especies secuestradas. Así, el proceso de esta invención resulta en una purificación efectiva intermitente debido a la posibilidad de extraer activamente un compuesto secuestrado hidrofílico. Adicionalmente, un exceso posiblemente presente de componente carboxílico que no fue activado y cuyo grupo de protección temporal también fue removido durante la desprotección, es extraído de la mezcla de reacción al mismo tiempo. El nuevo proceso de esta invención puede convenientemente ser usado en la producción de oligo-y polipéptidos y, más generalmente, en la formación de enlaces amida.

Un proceso adecuado de acuerdo con la presente invención es el acoplamiento de un exceso de un componente carboxílico a un componente amino, en donde la función carboxílica es preactivada o activada in situ usando un reactivo de acoplamiento y, si se desea, un aditivo. Luego de la etapa de acoplamiento, las funciones carboxílicas activadas residuales son secuestradas.

agregando el secuestrante a la mezcla de reacción Subsecuentemente, los grupos de protección temporal son removidos usando métodos adecuados conocidos en la técnica, seguido por la remoción del compuesto secuestrado por una extracción acuosa básica Al mismo tiempo, un exceso posiblemente presente de componente carboxílico que no fue activado y cuyos grupos de protección temporal también fueron removidos durante la desprotección, es extraído de la mezcla de reacción

El término componente amino se refiere a una molécula que comprende una función amino libre En particular, el componente amino puede ser cualquier amino, ácido amino o oligopeptido que lleva una función amino libre y cuyo otros grupos funcionales están protegidos de tal manera que ellos no interfieren con la reacción de acoplamiento deseada La función terminal C del ácido amino aplicado o oligopeptido aplicado puede ser protegida como una amida sustituida o no sustituida o como un ester, ejemplos de esto último incluyen, pero no están limitados a, metilo, etilo, t-butilo, benzilo, fenacilo, 3-(3 metil)pentilo(Mpe), 2-(2-fenil)propilo (Pp), 2-clorotriilo (Clt), difenil(4-piridil)metilo(PyBzh), diciclopropilmetilo (Dcpm), 9-

fluorenilmetilo (Fm), alilo (All), 2-(trimetilsilil)etilo (Tmse) y 4-{N-[1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutil]-amino}benzil (Dmab) esteres [Roeske, R W (1981) en "The peptides", vol 3 (Gross, E y Melenhofer, J, eds) Academic Press, New York, pp 101-136, para Mpe Karlstrom, A y Unden, A (1996) Tetrahedron Lett 37, 4343-4246, para Pp Yue, C et al (1993) Tetrahedron Lett 34, 323-326, para Clt Athanassopoulos, P et al (1995) Tetrahedron Lett 36, 5645-5648 PARA PyBzh Mergler, M et al (2001) P154, segundo simposio de péptidos internacional & 17abo simposio de péptido americano, para Dcpm Carpino, L A et al (1995) J Org Chem 60, 7718-7719, para Fm Al-Obeidi, F et al (1990) Int J Peptide Protein Res 35, 215-218, para All Kunz, H et al (1985) Int J Peptide Protein Res 26, 493-497, para Tmso Sieber, P (1977) Helv Chim Acta 60, 2711-2716, para Dmab Cham W C et al (1995) J Chem SOC Común 2209-2210] Las funciones del tipo t-butilo o las funciones de labilidad similar son preferidas para la protección permanente de otros grupos funcionales, estos incluyen pero no están limitados a -t-butilo (^tBu) para la protección del Asp, Glu, Ser, Thr y cadenas laterales Tyr, t-butoxicarbonilo (Boc) para las protecciones de las cadenas Lys y Trp laterales, tritilo (Trt) para la

protección de las cadenas laterales Asn, Gln, y His y 2,2,5,7,8 pentametilcromano-6-sulfonilo (Pmc) o 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo (Pbf) para la protección de la cadena lateral Arg [Barany, G y Merrifield R B (1980) en 2The peptide, vol 2 (Gross E y Meienhofer, J , eds)Academic Press, New York, pp 1-284, para Trp(Boc) Franzen, H et al (1984) J Chem Soc , Chem Común, 1699-1700, para Asu(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 Pme Ramaje, R y Green, J (1987) Tetrahedron Lett 28, 2287-2290, para Phf Carpino, L A et al (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, ácido amino o oligopeptido que lleva una función carboxílica libre y cuyos otros grupos disfuncionales están protegidos de tal manera que no interfieren con la reacción de acoplamiento deseada En una modalidad preferida, el grupo amino del ácido amino aplicado oligopeptido aplicado es protegido temporalmente

por una función benziloxycarbonilo (Z), otros ejemplos incluyen pero no están limitados a -el Boc, Trt, fluoren-9-ilmetoxycarbonil (Fmoc), 2-(metilsulfonil)etoxycarbonil(Msc), aliloxycarbonilo (Alloc)funciones o funciones de ellos del tipo arilsulfonilo, tales como orto-nitrobenzenosulfonilo (o-NBS) [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 arilsulfonil Fukuyama, T et al (Tetrahedron Lett 38, 5831-5834] Las funciones del tipo t-butilo o funciones de labilidad similar se prefieren para la protección permanente de otros grupos funcionales como se describió anteriormente El componente carboxílico puede ser preactivado como un éster activo, preferiblemente un N-hidroxisuccinimida, benzotriazol-1-il, pentafluorofenilo o un éster de 4-nitrofenilo, un haluro, un anhídrido de N-carboxianhídrido o como un anhídrido simérico Alternativamente, el componente carboxílico puede ser activado in situ como un anhídrido mezclado o usando un reactivo de acoplamiento, tal como una carbodiimida, preferiblemente N-N -diciclohexilcarbodiimida (DCC) o un hidrocloreto de 1-(3 -dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), un

57,
57

uronio o una sal de fosfonio en la presencia posible de un aditivo de acoplamiento, preferiblemente N-hidroxisuccinimida (HONSu), 1-hidroxibenzotriazol (HIOBt), 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 la presencia de una amina terciaria ["The peptide" , 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 de protección temporal puede ser removido de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica (vide supra) La función Z puede ser removida por hidrogenólisis usando procedimientos estándar Durante este proceso todos los grupos de protección tipo benzilo son removidos y los grupos de protección del tipo t-butilo o funciones de labilidad similar son mantenidos Estos últimos pueden ser removidos por acidólisis de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica

Una persona versada en la técnica entenderá que lo que se quiere significar con el término extracción acuosa básica Sin embargo, las extracciones acuosas básicas son

llevadas a cabo preferiblemente usando soluciones acuosas de hidrogenocarbonato de sodio o carbonato de sodio, si se desea en la presencia de cloruro de sodio. El término extracción acuosa activa se refiere a una extracción en la cual sea que el componente amino es extraído bajo condiciones ácidas en la forma protonada completamente (amonio) o un componente carboxílico es extraído bajo condiciones básicas en la forma desprotonada completamente (carboxilato).

La invención se ilustra adicionalmente por el siguiente ejemplo, que no debe ser interpretado como una limitación de la presente invención.

EJEMPLO

H-Asp(O^tBu)-Phc-O^tBu

A una suspensión agitada de 5,52 g de H-Phe-O^tBu-HCl en una mezcla de acetato de etilo y diclorometano a 20°C,

agitar la solución resultante hasta la completación de la reacción, 1,21 ml de 4-metilmorfolina y 3,51 g de sal de benzil β -alaninato p-toluensulfonato fueron agregados. La mezcla fue agitada durante otros 30 minutos y fue extraída con 5% de Na_2CO_3 /10% de NaCl, 5% de KHSO_4 /10% de NaCl y 5% de Na_2CO_3 /10% de NaCl.

La capa orgánica que contiene el dipéptido protegido Z-Asp (O^tBu)-Phe-O^tBu fue sometido a hidrogenólisis catalítica en la presencia de paladio o sobre carbón. Luego de completar la reacción, 5% de Na_2CO_3 /10% de NaCl fueron agregados y la suspensión resultante fue filtrada. El residuo fue lavado con una mezcla de acetato de etilo y diclorometano, y los filtrados combinados fueron extraídos con 5% de Na_2CO_3 /10% de NaCl, 30% de NaCl y agua. La capa orgánica fue filtrada, secada sobre Na_2SO_4 y evaporada hasta secado para dar el dipéptido deseado en producción cuantitativa.

Pureza 98,4% por fase inversa de HPLC (24 a 68% de acetonitrilo en 0,1% de ácido trifluoroacético en 29 minutos a 220 nm, 2,0 ml/min, 5 micrómetros C_{18} columna). Identidad m/z 393 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, mediante electrorroseado MS, $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1,41 (s, 9H), 1,46

(s, 9H) 1,63 (bs, 2H), 2,39 (dd, 1H), 2,79 (DD, 1H), 3,39 (d, 2H), 3,65 (m, 1H), 4,72 (m, 1H), 7,17-7,32 (m, 5H), 7,81 (d, 1H)

Conclusión La pureza e identificación del producto obtenido demuestra que el exceso del componente carboxílico (activado) ha sido removido completamente y no hay una secuencia de inserción de péptido que haya sido formada usando el proceso de esta invención

REIVINDICACIONES

1 Un proceso para la preparación de péptidos usando un exceso de un componente carboxílico activado para asilar un componente amino en donde luego de la asilación una amina comprende un anión libre o un anión latente que es usado como un secuestrante de las funciones carboxílicas activadas residuales

2 El proceso de la reivindicación 1, en donde una amina comprende un anión latente que es usado como el secuestrante

3 El proceso de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anión latente en la amina secuestradora lleva un grupo de protección temporal que puede ser removido selectivamente en la presencia de cualquier grupo protector permanente ligado al péptido en crecimiento

4 El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anión latente en la amina secuestrante lleva un grupo de protección temporal que muestra una labilidad similar a aquella del grupo de protección

temporal presente en los terminales N del péptido en crecimiento

5 El proceso de las reivindicaciones 3 o 4, en donde los grupos de protección temporal son grupos removibles hidrogenolíticamente mientras que los grupos de protección permanente son grupos removibles acidolíticamente

6 El proceso de la reivindicación 5, en donde los grupos de protección temporal son del tipo benzilo

7 El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el secuestrante es una amina primaria que comprende un anión libre o un anión latente

8 El proceso de la reivindicación 7, en donde la amina primaria es un derivado de ácido amino protegido en el terminal C

9 El proceso de la reivindicación 8 en donde el aminoácido es β -alanina o un derivado de el

10 El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el secuestrante es benzil β -alaninato o una sal del mismo

11 El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el proceso se lleva a cabo en solución

RESUMEN

La presente invención se relaciona con un proceso para la preparación de peptidos usando un exceso de un componente carboxílico activado para asilar un componente amino, en donde luego de la asilación una amina comprende un anión libre o un anión latente que es usada como un secuestrante de las funciones carboxílicas activadas residuales

Este proceso es útil para la producción de oligo-y polipéptidos y, más generalmente, en la formación de enlaces de amida



2do. EXAMEN DE FORMA PATENTE DE INVENCION

Folio 65

Radicación no 02-61740

Concepto Técnico no 681

Clasificación Internacional de Patentes. C07C 237/00, C07K 1/14

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

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

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

□

EXAMINADOR TÉCNICO
202051

Bogotá D C , mayo 2 de 2003



2020
Bogotá DC

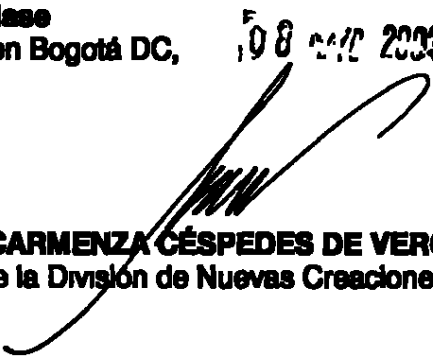
Doctor(a)
EMILIO FERRERO
Apoderado(a)

REFERENCIA.	Radicación No	02-61740
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	416
	Oficio No	695
	Folios	001

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

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

Cúmplase
Dado en Bogotá DC, 10 8 2003


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

202051