

PETITORIO


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



02 061740 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 02061740 00000000

Folios: 42 ición

Fecha (NBI) 2002-07-17 17:21:31

Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONESFORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
2000-3

1

SOLICITUD DE



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad

2

SOLICITANTE
(71)Nombre **AKZO NOBEL NV**
sociedad constituida y existente de
acuerdo con las leyes de Holanda
Dirección Velperweg 76, 6824 BM
Amhem, HolandaTeléfono 546 09 70
E-mail clientes@camyp.com
Fax 249 40 70

Domicilio BM Amhem Holanda

IDENTIFICACION

C C



NIT



C E



Otro



Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)Nombre Emilio FERRERO
Dirección Carrera 4ª No 72-35Teléfono 347 36 11
E-mail caveller@cavelier.com
Fax 217 92 11
Domicilio Bogotá, Colombia

IDENTIFICACION

C C



NIT



C E



Otro



Número 438 019 TP 31.929

4

INVENTOR(ES)
(72)1- Ivo Franci EGGEN
2- Paulus Bernardus Wilhelmus TEN
KORTENAARP O Box 20,
5340 BH Oss-Holanda,
respectivamente

IDENTIFICACION

C C



NIT



C E



Otro



Número

5

TITULO (54)

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE COMPUESTOS QUE
CONTIENEN UNO O MAS ENLACES AMIDA, EN PARTICULAR PEPTIDOS

6

Clasificación Internacional (51)

C07C 237/00, C07K 14

7

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

NL

(32) Fecha

19 de julio de 2001

(31) Número de Solicitud

01202751 2

8

Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los

6 meses ☐12 meses ☐18 meses ☒Otro ☐

9

Comprobante de pago No 02 - 33.609

Fecha 23 de mayo de 2002

Comprobante de pago No 02 - 37.406

Fecha 11 de junio de 2002

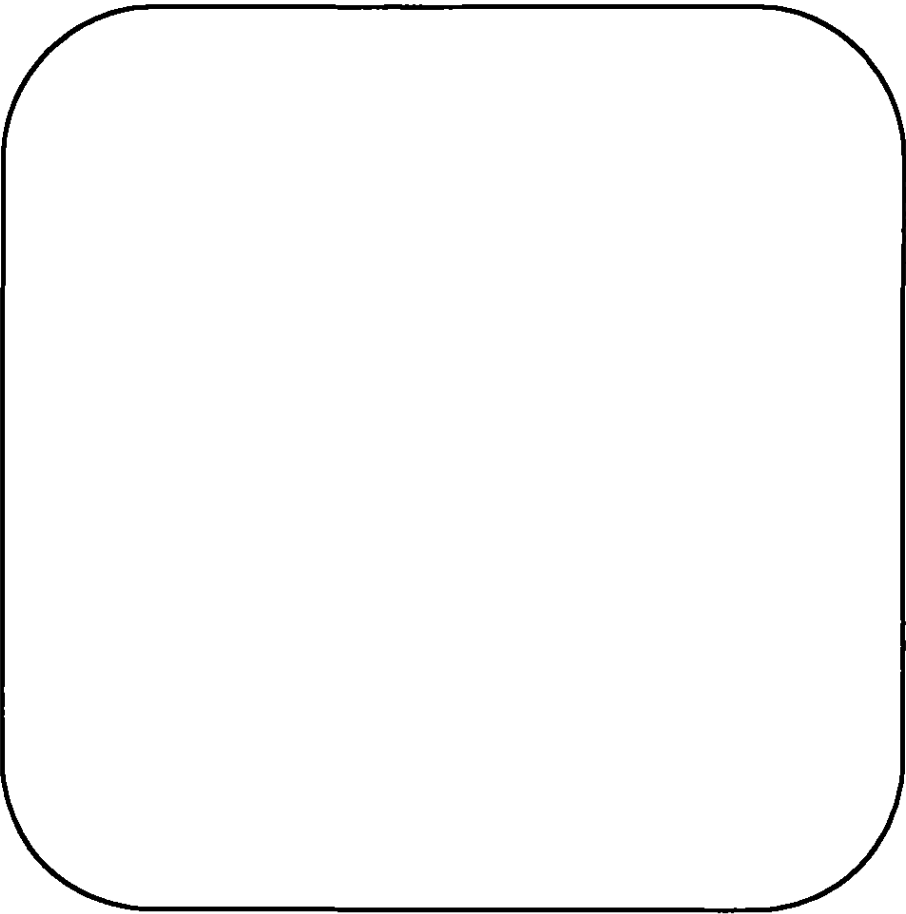
10

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 *Emilio Ferrero*
C C 438 019 de Usaquén T P A. 31 929

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE COMPUESTOS QUE CONTIENEN UNO
O MÁS ENLACES AMIDA, EN PARTICULAR PÉPTIDOS

La invención se refiere a un procedimiento nuevo y versátil para la preparación de compuestos que contienen uno o más enlaces amida, en particular péptidos, especialmente procedimientos efectuados en solución

Los péptidos se sintetizan ya sea en solución o en un soporte sólido. En ambas propuestas, las etapas de acoplamiento y desprotección se alternan repetidamente, y pueden estar separadas por purificaciones intermitentes. Un 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. En la síntesis de péptidos en fase sólida, el componente carboxílico activado residual habitualmente es removido por filtración al final de cada etapa de acoplamiento. En la síntesis en fase de solución, 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 en la síntesis en fase de solución, 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

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 una 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.

Se ha encontrado ahora un nuevo procedimiento para la preparación de péptidos, donde un exceso de un componente carboxílico activado es usado para acilar un componente amino, y donde después de la acilación, una amina que comprende un anión libre o un anión latente (o sea, un anión que se forma con la desprotección) es usada como agente barredor de las funciones carboxílicas activadas residuales. Este nuevo procedimiento permite una elección esencialmente arbitraria del grupo protector en el N-terminal del componente carboxílico activado, ya que, a diferencia del procedimiento de Carpino, su desprotección no necesariamente se efectúa bajo las mismas condiciones de reacción que el barrido del exceso de funciones carboxílicas activadas. Además, 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 barreadores. De preferencia, el procedimiento de la invención se efectúa en solución. Sin embargo, el procedimiento también puede aplicarse en la síntesis de péptidos en fase sólida. El procedimiento de la invención también es adecuado para la preparación de otros compuestos que contienen uno o más enlaces amida.

En una modalidad preferida, una amina que comprende un anión latente se usa como agente barredor. De preferencia, el anión latente en la amina barridora 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 benciloxycarbonilo 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 barredora 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. Por lo tanto, 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.

El nuevo procedimiento de esta invención puede usarse convenientemente en la preparación de oligo- y polipéptidos y, más generalmente, en la preparación de compuestos que contienen uno o más enlaces amida.

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 barredor a la mezcla de reacción. Posteriormente, los grupos protectores temporales son removidos usando métodos adecuados conocidos en el arte, habitualmente seguido por la remoción del compuesto barrido por extracción acuosa básica. 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, 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 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), diciticlopropilmetilo (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 benciloxycarbonilo (Z), otros ejemplos incluyen, pero no están limitados a, las funciones Boc, Trt, fluoren-9-ilmetoxycarbonilo (Fmoc), 2-(metilsulfonil)etoxycarbonilo (Msc), alloxycarbonilo (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-hidroxysuccinimida, 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 *NN*-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

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

A una suspensión con agitación de 5,52 g de H-Phe-O^tBu HCl en una mezcla de acetato de etilo y diclorometano a 20°C, se agregaron 7,76 g de Z-Asp(O^tBu)-OH, 3,24 g de 1-hidroxibenzotriazol, 4,20 g de 1-(3'-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato y 4,62 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)-Phe-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%, NaCl al 30% y agua. La capa orgánica fue evaporada a sequedad para dar el dipéptido deseado con un rendimiento cuantitativo. Pureza 98,4% 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 393,4 [M+H]⁺ por MS con electrorrocío, ¹H NMR (CDCl₃) 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).

EJEMPLO 2

H Leu Phe NH (CH₂)₇ CH₃

A una solución con agitación de 2,12 ml de n-octilamina en acetato de etilo a 20°C, se agregaron 4,61 g de Z-Phe-OH, 2,08 g de 1-hidroxibenzotriazol, 2,71 g de 1-(3'-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato y 1,55 ml de 4-metilmorfolina. Después de agitar la suspensión resultante hasta que se completó la reacción, se agregaron 0,78 ml de 4-metilmorfolina y 2,26 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 Z-Phe-NH-(CH_2)₇-CH₃ fue diluida con 1-metil-2-pirrolidinona y sometida a hidrogenolisis catalítica en presencia de paladio en carbón de leña. Al completarse la reacción, se agregó NaCl al 30% 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%.

A la capa orgánica que contenía H-Phe-NH-(CH_2)₇-CH₃ a 20°C, se agregaron 4,09 g de Z-Leu-OH, 2,08 g de 1-hidroxibenzotriazol, 2,71 g de 1-(3'-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato, 1,55 ml de 4-metilmorfolina y 1-metil-2-pirrolidinona. Después de agitar la suspensión resultante hasta que se completó la reacción, se agregaron 0,78 ml de 4-metilmorfolina y 2,26 g de sal p-toluenosulfonato de E-alaninato de bencilo. La mezcla fue agitada por 30 minutos más y extraída con NaCl al 30%, 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 Z-Leu-Phe-NH-(CH_2)₇-CH₃ fue diluida con 1-metil-2-pirrolidinona y 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 10%, y la suspensión resultante fue filtrada a 45°C. El residuo fue lavado con acetato de etilo, y los filtrados orgánicos combinados fueron extraídos con Na_2CO_3 al 5%/NaCl al 10%, NaCl al 30% y agua. La capa orgánica fue evaporada a

sequedad para dar el producto deseado con un 85% de rendimiento

Pureza 99,3% 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 390,4 [M+H]⁺, 412,4 [M+Na]⁺, 388,2 [M-H]⁻, 434,2 [M+HCOO]⁻ por MS con electrospray ¹H NMR (CDCl₃) δ 0,89 (m, 9H), 1,12-1,39 (m, 14H), 1,50-1,60 (m, 3H), 3,01-3,22 (m, 4H), 3,35 (dd, 1H), 4,53 (dd, 1H), 5,90 (t, 1H), 7,19-7,32 (m, 5H), 7,83 (d, 1H)

Conclusión La pureza y la identificación de los productos obtenidos demuestran que los excesos del componente carboxílico (activado) han sido completamente removidos, y no se han formado secuencias de inserción de péptidos al usar el procedimiento de esta invención

REIVINDICACIONES

1 Un procedimiento para la preparación de compuestos que contienen uno o más enlaces amida usando un exceso de un componente carboxílico activado para acilar un componente amino, CARACTERIZADO porque después de la acilación, una amina que comprende un anión libre o un anión latente es usada como agente barrador de las funciones carboxílicas activadas residuales

2 El procedimiento de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque una amina que comprende un anión latente es usada como agente barrador

3 El procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 2, CARACTERIZADO porque el anión latente en la amina barradora lleva un grupo protector temporal, que puede ser removido selectivamente en presencia de cualesquier grupos protectores permanentes unidos al péptido en crecimiento

4 El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, CARACTERIZADO porque el anión latente en la amina barradora 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

5 El procedimiento de las reivindicaciones 3 ó 4, CARACTERIZADO porque los grupos protectores temporales son grupos que se pueden remover hidrogenolíticamente, en tanto

que los grupos protectores permanentes son grupos que se pueden remover acidolíticamente

6 El procedimiento de la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque los grupos protectores temporales son de tipo bencilo

7 El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, CARACTERIZADO porque el agente barrador es una amina primaria que comprende un anión libre o un anión latente

8 El procedimiento de la reivindicación 7, CARACTERIZADO porque la amina primaria es un derivado de amino ácido protegido en el C-terminal

9 El procedimiento de la reivindicación 8, CARACTERIZADO porque el amino ácido es E-alanina o un derivado de la misma

10 El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, CARACTERIZADO porque el agente barrador es E-alaninato de bencilo o una sal del mismo

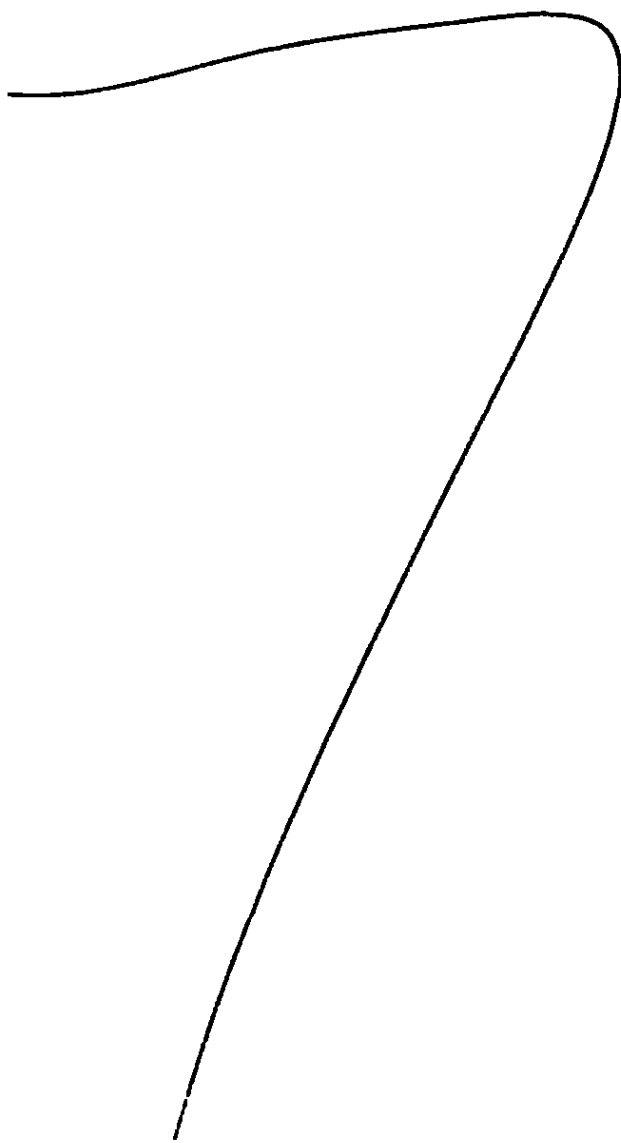
11 El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, CARACTERIZADO porque un tiol que comprende un anión libre o latente es usado como agente barrador en lugar de una amina que comprende un anión libre o latente

18

12 El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, CARACTERIZADO porque el procedimiento se efectúa en solución

13 El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, CARACTERIZADO porque se prepara un péptido

14 Un compuesto que contiene uno o más enlaces amida, CARACTERIZADO porque el compuesto se prepara de acuerdo con un procedimiento que comprende el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-13



RESUMEN

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de péptidos usando un exceso de un componente carboxílico activado para acilar un componente amino, donde después de la acilación, una amina que comprende un anión libre o un anión latente es usada como agente barredor de las funciones carboxílicas activadas residuales

Este procedimiento es útil para la producción de oligo- y polipéptidos y, más generalmente, para la preparación de compuestos que contienen uno o más enlaces amida

REPRESENTACION Y PODER

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

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

REPRESENTATION AND
POWER OF ATTORNEY

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 parágrafo 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 suplentes, 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.

Ademas, 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 contencioso-administrative, judicial, and Arbitration Courts in all matters relating to the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs, the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin, its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above-mentioned. b) Actions of unfair competition, protection of the consumer, oppositions or observations administrative or judicial, nullity infringement, granting of licenses, 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 of August 1998

F. G. M. Hermans

In/en

Director Patents Pharma

E. H. Reerink

Deputy Director

Legal Affairs

Signature

AKZO NOBEL N.V.

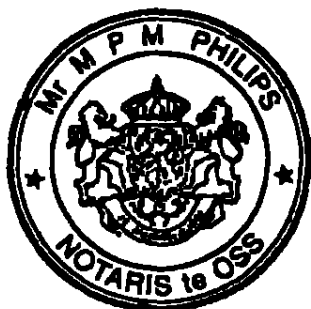
LEGALIZACION

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 (1) the legal existence of the company, (2) that it is in actual exercise of 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



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

15499

CHAMBER OF COMMERCE AND INDUSTRY
FOR GOST BRABANT (NEDERLAND)

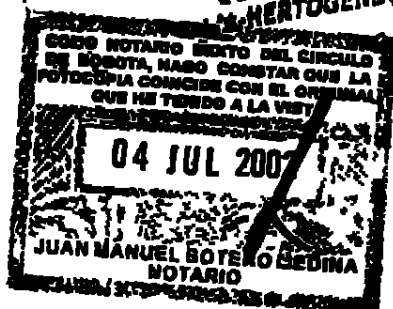
EXCLUSIVE PLACE FOR VERIFICATION OF
THE SIGNATURE(S)



27 AUG 1998

KAMERVANAC
GOST-BRABANT
HERTOGENBOSCH

J Schellekens



Gezien voor legalisatie van de handtekening
van d'r/mw J. Schellekens

s-G enhage 9 SEP 1998



De Minister van
Buitenlandse Zaken
voor deze,

Leges f 20,- Hh 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 11214-201-001-3

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

CERTIFICA

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

Que la Compañia **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 Camara de Comercio y Fabricas de Centraal Gelderland, Arnhem, bajo el numero 09007809,

Que los Señores **Franciscus Guihelmus 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 Publico de Oss, Señor **Martinus Petrus Maria PHILIPS**, son los representantes legales de la citada Empresa en este Pais

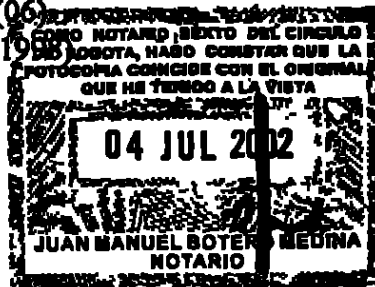
El Cónsul de Colombia en La Haya, Países Bajos, no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento

Esta certificacion se expide en La Haya, Países Bajos, a los seis (06) dias 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 181198
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

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
[Signature]
300803

RELACIONES
EXTERIORES

LA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑANDO
LAS FUNCIONES INDICADAS

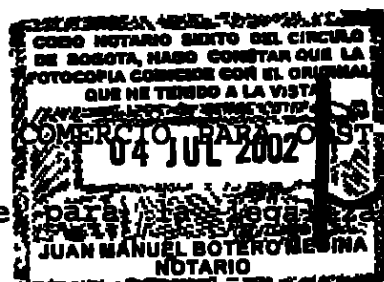
NOTARIO BERTO DEL CIRCULO
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
COPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
04 JUL 2002
JUAN MANUEL SOTERO MEDINA
NOTARIO

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 PARA OOST-BRABANT (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 CORTÉS, 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

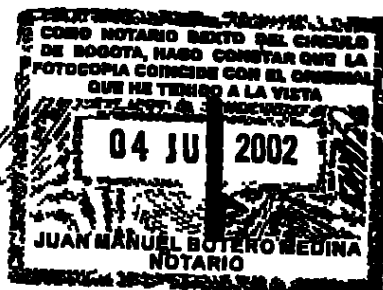
COLO 11214-801-001-3

Id 6

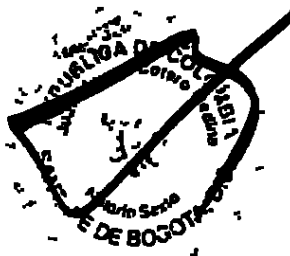
Nov 20/98

Maria E Martelo
TRADUCCION No. 151198
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCUITO DE SANTA FE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE (S) ANTERIOR(ES) FIR-
MA(S) FUE(S) POR *[Signature]*
IDENTIFICADOS CON C C No (s)
SANTA FE DE BOGOTA *23 NOV. 1998*
ES(S) AUTENTICA(S)



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
198457
Maria Martelo
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPA-
NAS LAS FUNCIONES INDICADAS



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
98 NOV 24 PM 12 06
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTA FE DE BOGOTA D.C.

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

domiciliado (s) en _____
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 the preparation of peptides"

declaro(amos) así mismo que cedo(amos) y transfiero
 (emos), 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

en/fin _____

Firma

Signature



(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

NOTA LA AUTHENTICACION CONSULAR ES NECESARIA

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 nineteenthundred sixty-nine in Heelen, The Netherlands, residing at Oss, The Netherlands, holder of a Dutch passport, number N96874650, and
- Mr Paulus Bernardus Wilhelmus Ten Kortenaar, born on the twentieth of January nineteenthundred fifty-three in Amsterdam, The Netherlands, residing at Wijchen, The Netherlands, holder of a Dutch drivers licence, number 3104824421,

The Hague, the elighth of July twothousandtwo



A handwritten signature in black ink, consisting of a series of fluid, connected loops and strokes, extending from the right side of the notary seal.

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

TRADUCCIÓN OFICIAL 100/2002 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, y TEN KORTENAAR, Paulus, Bernardus, Wilhelmus**, AMBOS 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 LA PREPARACIÓN 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

DOS FIRMAS DE IVO, FRANCI EGGEN Y DE PAULUS, BERNARDUS, WILHELMUS TEN KORTENAAR

Visto por mí 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 y 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

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 & Droogleevers 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.prd.nl

Pels Rijcken & Droogleevers 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
Eduardo Cuadros Negreiros
"TRADUCTOR OFICIAL"
BOGOTÁ, COLOMBIA
Rev. 541 febrero de 1997

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
243799
CUIA FIRMA APTARECE EN EL
DOCUMENTO DESDEPERA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2002 JUL 16 P 12 20
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTÁ D.C.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, H. G. CONSTANQUE (S) ANTERIORES
MA(S) PUESI, A POR

CONTINUA LOS CL. C. C. No (s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 16 JUL 2002

[Handwritten signature]



**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°

01202751 2

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,
LA HAYE, LE**

19/06/02



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° 01202751 2

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 the preparation of peptides

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

Staat
State:
Pays:

Tag:
Date:
Date:

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt

Internationale Patentklassifikation
International Patent classification
Classification internationale des brevets.

/

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten
Contracting states designated at date of filing.
Ets 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 THE PREPARATION OF PEPTIDES

The invention relates to a new and versatile process for the preparation of peptides, especially for processes performed in solution.

5

Peptides are synthesized either in solution or on a solid support. In both approaches coupling and deprotection steps repetitively alternate and may be separated by intermittent purifications. An 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. In solid phase peptide synthesis residual activated carboxylic component is usually removed by filtration at the end of each coupling step. In solution phase synthesis 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 in solution phase synthesis 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. Kischinsky, I. 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.

25

30

Recently, Carpuat, 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-dioxobenzob[5]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 Bmoc functions are removed in one and the same step using a polyamine.

A new process has now been found for the preparation of peptides, wherein an excess of an activated carboxylic component is used to acylate an amino component, and wherein after the acylation an amine comprising a free anion or a latent anion (i.e. anion forming upon deprotection) is used as a scavenger of residual activated carboxylic functions. This new process allows an essentially arbitrary choice of the protecting group at the N-terminus of the activated carboxylic component, since - in contrast to the Carpino process - deprotection thereof does not necessarily take place under the same reaction conditions as the scavenging of excess of activated carboxylic functions. Furthermore, 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. Preferably, the process of the invention takes place in solution. However, the process may also be applied in solid phase peptide synthesis.

In a preferred embodiment, an amine comprising a latent anion is used as the 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 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 carboxylic acids, 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.

The new process of this invention may conveniently be used in the production of oligo- and polypeptides and, more generally, in the formation of amide bonds.

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 preactivated 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, temporary protecting groups are removed using suitable methods known in the art, followed by removal of the scavenged compound by basic 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, is extracted from the reaction mixture.

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, phenoxyl, 3-(3-methyl)pentyl (Mpe), 2-(2-phenyl)propyl (Pp), 2-chlorotriptyl (Clt), diphenyl(4-pyridyl)methyl (PyBzh), dicyclopropylmethyl (Dcpm), 9-fluorenylmethyl (Fm), allyl (Al), 2-(1-methylisobutyl)ethyl (Tmc) and 4-{N-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)-3-methylbutyl]-amino}benzyl (Dmab) esters [Rooske, R.W (1981) in *The Peptides* vol 3 (Gross, E. and Muenhofer, J., eds.) Academic Press, New York, pp. 101-136, for Mpe; Karlström, A. and Undén, A. (1996)

95

- Tetrahedron Lett.* 37, 4343-4246, for Pp: Yue, C *et al.* (1993) *Tetrahedron Lett.* 34, 323-326; for Cht. Athanassopoulos, P *et al.* (1995) *Tetrahedron Lett.* 36, 5645-5648, for PyBzh. Margler, M. *et al.* (2001) P154, 2nd International Peptide Symposium & 17th American Peptide Symposium, for Dopep: Carpino, L.A. *et al.* (1995) *J. Org. Chem.* 60, 7718-7719, for Fm. Al-
- 5 Obedi, 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 Tmcc: Sieber, P (1977) *Helv. Chim. Acta* 60, 2711-2716; for Dmcc: 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 (P_{bu}) for
- 10 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-pentamethylchromane-6-sulfonyl (Pmc) or 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-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 Kunz, H. (1991) *Tetrahedron Lett.* 32, 739-742, for His(Trt): Sieber, P and Kunz, H. (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]
- 20 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, the amino group of the applied amino acid or oligopeptide is temporarily protected by a
- 25 benzyloxycarbonyl (Z) function, other examples include - but are not limited to - the Boc, Trt, fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), 2-(methylsulfonyl)ethoxycarbonyl (Mec), allyloxycarbonyl (Allu) functions or functions of the arylsulfonyl type, such as *ortho*-nitrobenzenesulfonyl (*o*-NBS) [Gelger, R. and Kiang, W (1981) in *The Peptides*, vol. 3 (Gross, E. and Meinkoth, J eds.) Academic Press, New York, pp. 1-99 for Alloc: Kunz, H. and Unverzagt, C. (1984) *Angew. Chem.* 96, 426-427, for arylsulfonyl: Fukuyama, T *et al.* (1997) *Tetrahedron Lett.* 38, 5831-5834]
- 30 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, 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 (HONHSu), 1-hydroxybenzotriazole (HOBt), 3-hydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-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 Peptider*, vol. 1 (1979) (Gross, E. and Meinhof, J., eds.) Academic Press, New York, Li, P and Xu, J.-C. (2000) *Chin. J. Chem.* 18, 456-466].

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.

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 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.

EXAMPLE**H-Asp(O^tBu)-Phe-O^tBu**

- 5 To a stirred suspension of 5.52 g of H-Phe-O^tBu.HCl in a mixture of ethyl acetate and dichloromethane at 20 °C, were added 7.76 g of L-Asp(O^tBu)-OH, 3.24 g of 1-hydroxybenzotriazole, 4.20 g of 1-(3'-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride and 4.62 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*-trifluanesulfonate salt
10 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)-Phe-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
15 residue was washed with a mixture of ethyl acetate and dichloromethane, and the combined filtrates were extracted with 5 % Na₂CO₃ / 10 % NaCl, 30 % NaCl and water. The organic layer was filtered, dried over Na₂SO₄ and evaporated to dryness to give the desired dipeptide in quantitative yield.

Purity: 98.4 % by reversed phase HPLC (21 to 68 % acetonitrile in 0.1 % trifluoroacetic acid in
20 29 minutes at 220 nm, 2.0 ml/min, 5 micron C₁₈ column). Identity: *m/z* 393.4 [M+H]⁺ by electrospray MS, ¹H NMR (CDCl₃) 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).

Conclusion: The purity and identification of the obtained product demonstrate that the excess of
25 (activated) carboxylic component has been removed completely and no insertion peptide sequence has been formed using the process of this invention.

CLAIMS

- 1 A process for the preparation of peptides using an excess of an activated carboxylic component to acylate an amino component, wherein after the acylation an amine comprising
5 a free anion or a latent anion is used as a scavenger of residual activated carboxylic functions.
- 2 The process of claim 1, wherein an amine comprising a latent anion is used as the scavenger
- 10 3 The process of claims 1 or 2, 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.
- 15 4 The process of any of the claims 1-3, 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.
- 20 5 The process of claims 3 or 4, wherein the temporary protecting groups are hydrogenolytically removable groups whereas the permanent protecting groups are acidolytically removable groups.
- 6 The process of claim 5, wherein the temporary protecting groups are of the benzyl type.
- 7 The process of any one of claims 1-6, wherein the scavenger is a primary amine comprising a
25 free anion or a latent anion.
- 8 The process of claim 7, wherein the primary amine is a C-terminally protected amino acid derivative.
- 30 9 The process of claim 8, wherein the amino acid is β -alanine or a derivative thereof.

8

10. The process of any one of claims 1-9, wherein the scavenger is benzyl β -alaninate or a salt thereof.

11 The process of any one of claims 1-10, wherein the process is performed in solution.

5

ABSTRACT

The present invention relates to a process for the preparation of peptides using an excess of an activated carboxylic component to acylate an amino component, wherein after the acylation an
5 amine comprising a free amon or a latent amon is used as a scavenger of residual activated carboxylic functions.

This process is useful for the production of oligo- and polypeptides and, more generally, in the formation of amide bonds.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

NIT : 899174998-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion 02061740 00000000

Folios: 42

Fecha (AÑO) 2002-07-17 17:21:21

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA 02 - 33 600
FECHA MAYO 23 DE 2002

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
CAVELIER AROGADOS	CONSIGNACION	BARCO POPULAR	050-00110-6	2894479	23/05/2002	9 928,000 00

CONCEPTO

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		7 TRAMITES DE SOL DE DISENOS INDUS	378,000 00
		TOTAL	378 000 00

SOM TRESIENTOS SETENTA Y OCHO 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

66 11214-801-028-6

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 37 406
FECHA : JUNIO 11 DE 2002

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 02061740 00000000 Folios: 42
Fecha (MM) 2002-07-17 17 21:21
Tramite : 002 PATENTES B 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PAGO	Vr PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	8087302	11/06/2002	45,430,000 00

CONCEPTO

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	00005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	106 000 00
		TOTAL	106,000 00

SON CIENTO SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No

Do 11714-801-02B-6

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

USUARIO RADICADOR

PATENTE DE INVENCION [✓]

MODELO DE UTILIDAD

[] []

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [] [✓]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [] [✓]
- Descripción de la invención [] [✓]
- Dibujos de ser estos pertinentes [] [✓]
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas [] [✓]

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 mezzanina,
Conmutador 382 08 40
Fax 350 52 20 e-mail info@sic.gov.co
Bogotá D C - Colombia