

PROCEDE DE LIGATION NATIVE

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne un procédé de fabrication d'un polypeptide
5 comprenant au moins une étape de ligation native à l'aide d'un peptide fonctionnalisé
par un groupement sélénié. L'invention concerne également des peptides et des
composés à base de sélénium. L'invention concerne également un kit de synthèse pour
la synthèse de peptides.

10 **ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE**

La synthèse de polypeptides par des méthodes conventionnelles en phase solide,
acide aminé par acide aminé, est limitée par des rendements faibles lorsque les
polypeptides synthétisés sont de grande taille. Afin de surmonter cette limitation, il est
connu d'assembler deux polypeptides par ligation chimique afin de produire un
15 polypeptide plus long.

La synthèse totale de polypeptides est de plus en plus utile pour la préparation de
protéines de structures bien définies ou portant des modifications naturelles, comme
les modifications post-traductionnelles, ou non naturelles. Les méthodes de ligation
chimique apportent une réponse à ce besoin, cependant elles s'avèrent limitées dans
20 leur emploi et leur application industrielle.

De manière générale, dans ces méthodes, on souhaite que le lien entre les
polypeptides assemblés par ligation soit natif, c'est-à-dire corresponde à la structure
naturelle des polypeptides.

La principale méthode de ligation native existant à ce jour est celle de Kent et
25 Dawson, décrite par exemple dans les demandes internationales WO 96/34878 et WO
98/28434. Cette méthode est fondée sur une réaction chimiosélective entre un peptide
thioester (en C terminal) et un cystéinyl-peptide. Néanmoins, le principal inconvénient
de cette méthode est la fabrication des peptides thioesters qui nécessite des procédés
chimiques complexes. Ces méthodes de l'art antérieur ne sont pas satisfaisantes car
30 elles conduisent inévitablement à des mélanges pouvant être difficilement séparables,
donc affectant la pureté du produit final obtenu, et à des pertes inévitables de
rendement.

Une méthode alternative est la ligation dite de Staudinger, décrite dans les
demandes internationales WO 01/68565 et WO 01/87920. Celle-ci comprend la
35 réaction d'un phosphinothioester avec un azoture et l'hydrolyse des réactifs combinés
pour former une liaison amide. Cependant cette méthode est difficilement applicable à
l'échelle industrielle.

Une autre méthode, décrite dans la demande internationale WO 2007/037812, repose sur la réaction d'un α -cétoacide avec une N-alkoxyamine dans une réaction de condensation décarboxylative. Toutefois, les cétoacides sont des molécules qui sont difficiles à fabriquer et à incorporer dans des peptides. Aussi, cette troisième méthode est difficilement applicable dans les laboratoires de synthèse peptidique ne disposant pas des moyens de réaliser des synthèses organiques complexes.

Le document WO 2011/051906 décrit un procédé de ligation native faisant intervenir un composé thiol. Bien que cette méthode soit extrêmement satisfaisante, la cinétique de réaction de ce composé thiol est parfois lente, notamment lorsque les acides aminés encadrant la liaison entre les deux peptides sont encombrés.

Il subsistait donc le besoin d'une méthode de ligation native dotée d'une cinétique de réaction rapide de façon à rendre plus facile la ligation de peptides par formation d'une liaison entre deux acides aminés encombrés.

RESUME DE L'INVENTION

L'invention repose sur la mise au point d'une méthode de ligation basée sur l'utilisation d'un peptide amide particulier, le peptide SeEA, et d'un cystéinyl peptide. Lorsque ces deux peptides sont mis en contact en solution aqueuse, un lien peptidique natif se forme entre les deux fragments. La ligation est très efficace et s'effectue avec d'excellents rendements. Elle fonctionne dans une large gamme de pH.

Cette ligation présente des similitudes avec la ligation SEA, décrite dans la demande FR 09 57 639, bien que les propriétés de ces deux ligations et des segments SeEA et SEA soient significativement différentes.

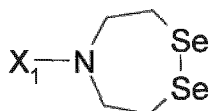
En effet, les cinétiques de ligation SeEA sont *très* significativement supérieures aux cinétiques de ligation SEA, obtenues avec l'analogue souffré SEA, ou aux cinétiques de la Native Chemical Ligation (NCL) basée sur l'utilisation de peptides thioesters.

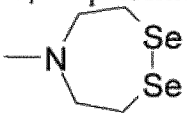
La supériorité cinétique de SeEA ne diminue en rien l'intérêt de la ligation SEA. Au contraire, elle vient la compléter en permettant la formation de jonctions difficiles à produire par les autres techniques de ligation SEA ou NCL (chimie des thioesters).

Dans la présente demande, le groupement SEA représente un groupement $-N(CH_2-CH_2-S-G_4)_2$, avec G_4 représentant H ou un groupement protecteur du soufre ou une liaison disulfure.

Un premier objet de la présente invention concerne un peptide fonctionnalisé choisi parmi :

a) le peptide de formule (I) : $X_1-N(CH_2CH_2SeH)_2$; ou

b) le peptide de formule (I') :  ;

dans lesquels X_1 représente un fragment peptidique et le groupement $-N(CH_2CH_2SeH)_2$ ou  forme une liaison amide avec la terminaison $C=O$ du résidu d'acide aminé du fragment peptidique X_1 qui est en position C-terminale.

Selon un mode de réalisation, X_1 comprend de 2 à 300 résidus d'acides aminés, de préférence de 5 à 100 résidus d'acides aminés, de manière plus particulièrement préférée de 8 à 50 résidus d'acides aminés.

Un autre objet de la présente invention concerne un procédé d'obtention d'un peptide fonctionnalisé (I) ou (I') selon l'invention, comprenant les étapes a1 et b1 suivantes :

a1) synthèse peptidique pour fournir un polypeptide de formule (II) :

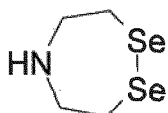
(II) X_1-OH

comportant de préférence des groupements protecteurs sur ses fonctions amines et acides carboxyliques, à l'exception de sa fonction acide carboxylique C-terminale,

b1) fonctionnalisation du polypeptide obtenu à l'étape a) comprenant :

– la réaction du polypeptide de formule (II) avec un composé amine choisi parmi :

(IIIa) $NH(CH_2-CH_2-Se-G_1)_2$

(III') 

dans laquelle G_1 représente un groupement protecteur du sélénium ou un atome d'hydrogène,

en phase liquide, pour former le polypeptide de formule (Ia)

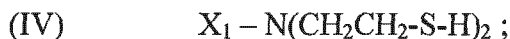
$X_1-N(CH_2CH_2-Se-G_1)_2$, ou (I') ;

– éventuellement la déprotection du polypeptide de formule (Ia) pour conduire au composé de formule (I),

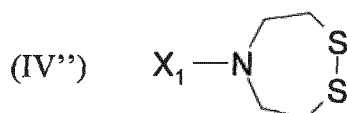
ou comprenant les étapes a2 et b2 suivantes :

a2) l'utilisation

- du composé de formule (IV) ou (IV'') :



5



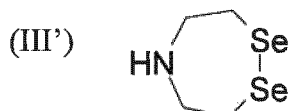
Ou

- d'un peptide fonctionnalisé par un groupement porteur d'une fonction thioester (IV') = $X_1 - SR$ et R représente un groupement alkyle ou aryle éventuellement substitué,

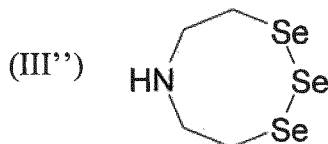
10

b2) la réaction entre le composé de formule (IV) ou (IV'') ou le composé de formule (IV') avec le composé amine de formule (III') ou (III'') :

15



20



en phase liquide, pour former le peptide de formule (I) ou (I').

25

Un autre objet de la présente invention concerne un composé susceptible d'être utilisé dans le procédé d'obtention d'un peptide fonctionnalisé selon l'invention, ce composé étant choisi parmi :

- a) le composé de formule (III') :

30

- b) le composé de formule (III'') :

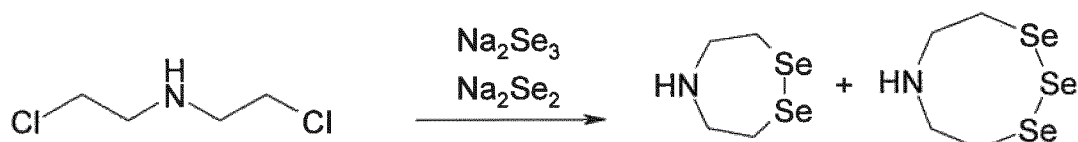
35

L'invention concerne également un procédé de fabrication des composés de formules (III') et (III'') selon l'invention, comprenant la réaction suivante de

traitement par un hydruure métallique illustrée sur le schéma dans le cas de NaBH_4 , mais on peut également employer LiAlH_4 ou LiBH_4 :



5 suivie de la réaction :

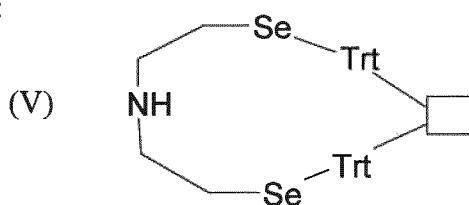


10

Un autre objet de la présente invention concerne un procédé d'obtention d'un peptide fonctionnalisé (I) ou (I') selon l'invention, comprenant les étapes suivantes :

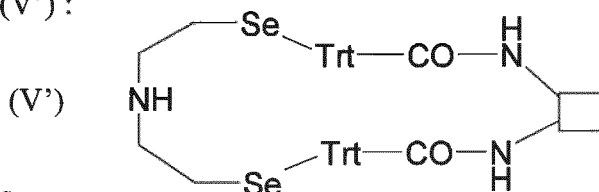
a) Fourniture d'une résine polymère fonctionnalisée présentant la structure (V) :

15



Ou la structure (V') :

20



dans lesquelles,

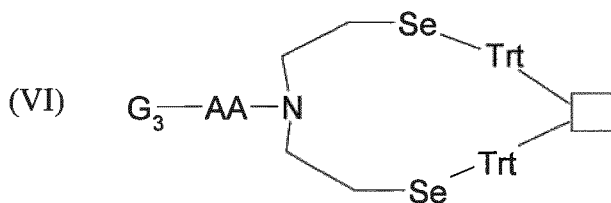
représente un support solide,

25

Trt représente un groupement triphénylméthyle éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants, notamment choisi parmi les substituants chlore, méthoxy, méthyle, fluor et cyano.

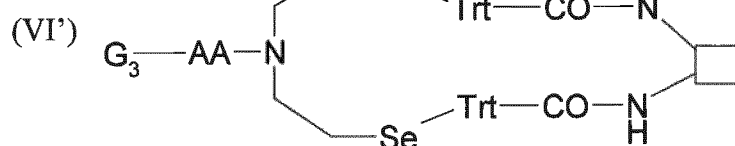
b) Greffage d'un acide aminé sur la résine polymère fonctionnalisée obtenue à l'étape a) pour conduire au composé de structure (VI) :

30



35

Ou de structure (VI') :



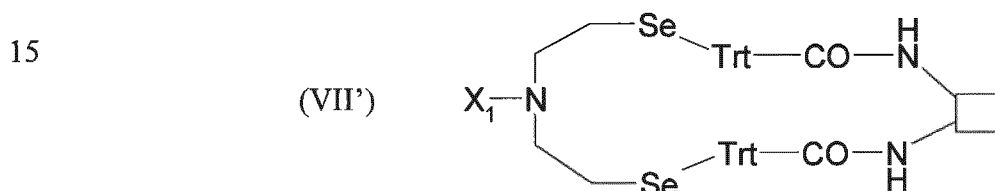
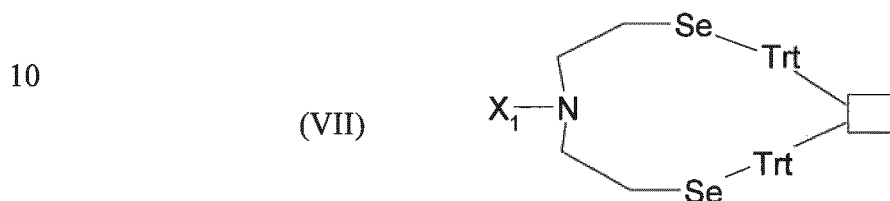
dans lesquelles,

□ et Trt ont la même signification que dans le composé (V) ou (V'),

AA représente un résidu d'acide aminé comportant éventuellement un ou plusieurs groupements protecteurs ;

5 G₃ représente un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur de la fonction amine N-terminale de AA,

c) Synthèse peptidique à partir de l'acide aminé AA pour conduire au composé (VII) ou (VII') :



dans lesquelles,

20 □ représente un support solide,

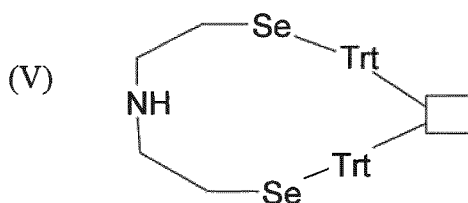
Trt représente un groupement triphénylméthyle éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants, notamment choisi parmi les substituants chlore, méthoxy, méthyle, fluor et cyano,

X₁ représente un fragment peptidique,

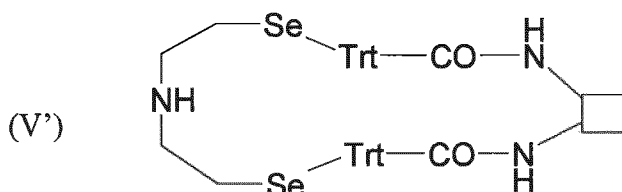
25 d) Coupure de la liaison entre Trt et Se pour conduire au composé (I) ou (I').

30 Selon un mode de réalisation du procédé ci-dessus, le greffage d'un acide aminé sur la résine polymère comprend la mise en présence de la résine fonctionnalisée (V) ou (V') avec un halogénure d'acide aminé ou avec un acide aminé et un agent d'activation, choisi de préférence parmi l'HATU, le PyBOP, le BOP, le PyBROP, de manière plus particulièrement préférée l'HATU.

35 Un autre objet de la présente invention concerne une résine polymère fonctionnalisée susceptible d'être utilisée dans le procédé selon l'invention, présentant la structure (V) :



Ou la structure (V') :

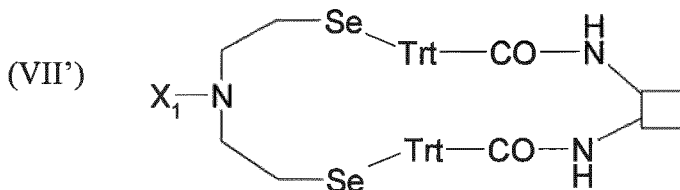
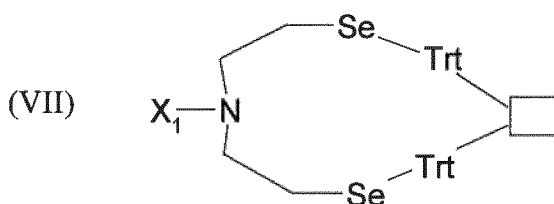


dans lesquelles,

□ représente un support solide,

Trt représente un groupement triphénylméthyle éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants, notamment choisi parmi les substituants chlore, méthoxy, méthyle, fluor et cyano.

Un autre objet de la présente invention concerne une résine polymère comprenant un fragment peptidique répondant à la formule (VII) ou (VII') :



dans lesquelles,

□ représente un support solide,

Trt représente un groupement triphénylméthyle éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants, notamment choisi parmi les substituants chlore, méthoxy, méthyle, fluor et cyano,

X₁ représente un fragment peptidique.

Selon un mode de réalisation, le support solide □ est choisi parmi un polystyrène, un polyacrylamide, un polyéthylèneglycol, une cellulose, un polyéthylène, un polyester, un latex, un polyamide, un polydiméthylacrylamide, un

copolymère polyéthylèneglycol-polystyrène, un copolymère polyéthylèneglycol-polyacrylamide et leurs dérivés.

Un autre objet de la présente invention concerne un procédé de fabrication de la

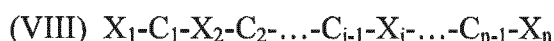
5 résine polymère selon l'invention, comprenant :

a) la fourniture d'un support solide fonctionnalisé par des groupements -Trt ou -NH-CO-Trt ;

b) réaction de la fonction Trt du support solide avec le composé amine de formule (III) : $\text{NH}(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Se-H})_2$

10 Trt ayant la même définition que ci-dessus.

Un autre objet de la présente invention concerne un procédé de fabrication d'un polypeptide de formule (VIII) :



15 dans lequel,

$\text{X}_1, \text{X}_2, \dots, \text{X}_i, \dots, \text{X}_n$ sont des fragments peptidiques,

$\text{C}_1, \text{C}_2, \dots, \text{C}_{i-1}, \dots, \text{C}_{n-1}$ sont des résidus d'acides aminés portant une fonction thiol ou séléniol,

n est un entier supérieur ou égal à 2,

20 i est un nombre entier quelconque allant de 1 à n ,

ce procédé comprenant une ou plusieurs étapes de réaction entre un composé de formule (IX_i) :

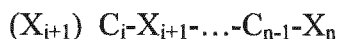


dans laquelle,

25 X'_1 représente X_1

X'_i représente $\text{C}_{i-1}\text{-X}_i$ pour $i > 1$

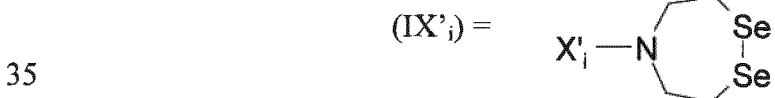
et un composé de formule (X_{i+1}) :



pour former un composé de formule (X_i) :

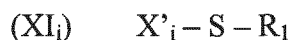
30 $(\text{X}_i) \quad \text{X}'_i\text{-C}_i\text{-X}_{i+1}\text{-}\dots\text{-C}_{n-1}\text{-X}_n$

Selon un mode de réalisation, le composé (IX_i) est formé à partir du composé (IX'_i) :

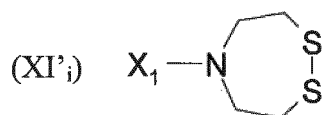


par la mise en présence d'au moins un composé réducteur des liaisons diséléniure.

Selon un mode de réalisation, le composé (IX'_i) est obtenu par réaction entre un composé de formule (XI_i), (XI'_i) ou (XI''_i) :



5



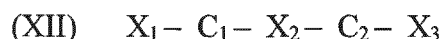
10

dans lesquelles X'_i est un fragment peptidique de la forme C_{i-1}-X_i pour i > 1 et X'₁ représente X₁, R₁ représente un groupement alkyle ou aryle, éventuellement substitué,

et un composé de formule (III') ou de formule (III'') selon l'invention.

15

Selon un mode de réalisation, le procédé ci-dessus est mis en œuvre pour la fabrication d'un polypeptide représenté par la formule (XII) :

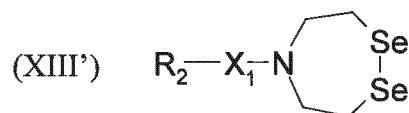


comprenant les étapes suivantes :

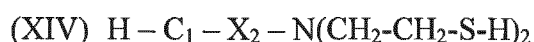
a) réaction entre un composé de formule (XIII) ou (XIII') :



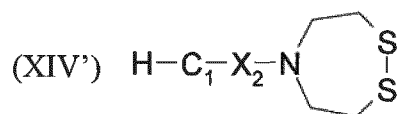
20



et un composé de formule (XIV) ou (XIV') :

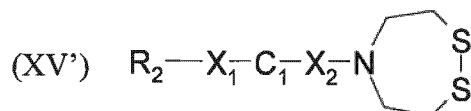
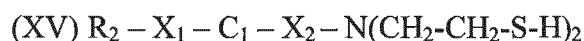


25



pour former le composé de formule (XV) ou (XV') :

30



35

b) réaction entre un composé de formule (XV) ou (XV') et un polypeptide de formule (XVI) :



pour former le composé de formule (XII),

dans lesquelles, R_2 représente H ou un groupement protecteur de la fonction N-terminale de X_1 ; X_1 , X_2 , X_3 représentent, indépendamment les uns des autres, des fragments peptidiques; C_1 et C_2 représentent, indépendamment l'un de l'autre, des résidus d'acides aminés porteurs d'une fonction thiol ou sélénol.

Un autre objet de la présente invention concerne un procédé de fabrication d'un polypeptide cyclique de formule (XVII) :

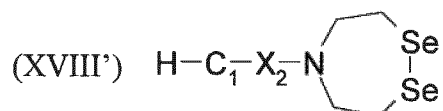


X_2 représentant un fragment peptidique, et C_1 représentant un résidu d'acide aminé comportant une fonction thiol ou sélénol, ledit procédé comprenant au moins une étape de réaction de ligation d'un polypeptide de formule (XVIII) :



avec lui-même.

Selon un mode de réalisation du procédé de fabrication d'un polypeptide cyclique selon l'invention, la réaction de ligation est effectuée en mettant en contact un polypeptide de formule (XVIII') :



avec au moins un composé réducteur des liaisons disélénium.

Un autre objet de la présente invention concerne un kit de synthèse de polypeptides comprenant un ou plusieurs peptides de formules (IX_i) ou (IX'_i) susceptibles d'être utilisés dans le procédé de ligation selon l'invention, ou au moins un composé (III') ou (III'') selon l'invention.

Des avantages de la présente invention sont les suivants :

- la ligation native de l'invention permet d'assurer la liaison de jonctions difficiles, telles que les jonctions encombrées,
- la cinétique de ligation native de l'invention est très rapide,
- la ligation native de l'invention peut être combinée avec d'autres méthodes de ligation ayant des cinétiques différentes,
- la ligation native de l'invention est simple à mettre en œuvre,

- la fabrication des peptides SeEA peut être faite à partir d'un support solide,
- La fabrication des peptides SeEA peut être faite à partir de segments SEA ou thioester en solution
- 5 - la ligation native de l'invention peut être mise en œuvre à partir de fragments peptidiques qui peuvent être préparés en phase solide ou en phase liquide,
- la ligation native de l'invention peut être combinée avec d'autres types de ligations natives de l'art antérieur dans un procédé one-pot
- 10 comportant plusieurs ligations successives,
- la ligation native de l'invention peut être effectuée en mettant en œuvre un procédé de ligation de l'art antérieur par simple addition d'un composé sélénié particulier dans le mélange réactionnel.

15 BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description qui suit d'un mode de réalisation préféré de l'invention, donnée à titre d'exemple et en référence au dessin annexé.

20 Les figures 1a et 1b représentent respectivement le chromatogramme HPLC et le spectre de masse d'un composé sélénié selon l'invention.

Les figures 2a et 2b représentent respectivement le chromatogramme HPLC et le spectre de masse d'un composé sélénié selon l'invention.

Les figures 3a et 3b représentent des chromatogrammes HPLC pour le suivi de la synthèse d'un peptide fonctionnalisé selon l'invention.

25 La figure 3c représente le spectre de masse d'un peptide fonctionnalisé selon l'invention.

Les figures 4a et 4b représentent respectivement le chromatogramme HPLC et le spectre de masse d'un peptide fonctionnalisé selon l'invention.

30 Les figures 5a et 5b représentent respectivement le chromatogramme HPLC et le spectre de masse d'un peptide fonctionnalisé selon l'invention après purification.

Les figures 6a et 6b représentent respectivement le chromatogramme HPLC et le spectre de masse d'un polypeptide obtenu par un procédé de ligation selon l'invention.

La figure 7 représente un diagramme mesurant la cinétique de réaction d'un procédé de ligation selon l'invention et selon l'art antérieur.

35 La figure 8 représente un diagramme mesurant la cinétique de réaction d'un procédé de ligation selon l'invention et selon l'art antérieur.

Les figures 9a et 9b représentent respectivement le chromatogramme HPLC et le spectre de masse d'un polypeptide fonctionnalisé obtenu par un procédé selon l'invention.

Les figures 10a et 10b représentent respectivement le chromatogramme et le spectre de masse d'un polypeptide obtenu par un procédé selon l'invention.

Les figures 11a et 11b représentent respectivement le chromatogramme et le spectre de masse d'un polypeptide obtenu par un procédé selon l'invention après purification.

La figure 12 représente un diagramme mesurant la cinétique de réaction d'un procédé de ligation selon l'invention et selon l'art antérieur.

La figure 13 représente un chromatogramme HPLC d'une solution issue de la synthèse d'un peptide fonctionnalisé selon l'invention.

Les figures 14a et 14b représentent respectivement le chromatogramme HPLC et le spectre de masse d'un peptide fonctionnalisé selon l'invention.

DESCRIPTION DE MODES DE REALISATION DE L'INVENTION

L'invention est maintenant décrite plus en détail et de façon non limitative dans la description qui suit.

Par « peptide ou polypeptide » on entend, dans le cadre de la présente demande, une chaîne linéaire de résidus d'acides aminés (en nombre supérieur ou égal à deux) reliés par des liaisons peptidiques. Les « peptides ou polypeptides » au sens de la présente demande peuvent donc par exemple être des oligopeptides, peptides ou protéines selon l'acceptation conventionnelle de ces termes. Les résidus d'acides aminés présents dans les polypeptides selon l'invention peuvent être choisis parmi les résidus d'acides aminés protéinogéniques ou non. De préférence, ils sont choisis parmi les vingt résidus d'acides aminés protéinogéniques et la sélénocystéine.

La notation des polypeptides s'effectue de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. Les résidus d'acides aminés présents le long de la chaîne polypeptidique sont notés selon le code usuel à une lettre ou à trois lettres. Un résidu d'acide aminé est un fragment de polypeptide de formule -NH-(CH-R)-(C=O)- , dans laquelle R représente une chaîne latérale, différente d'un acide aminé à l'autre.

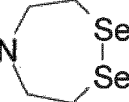
Par « fragment peptidique » on entend, dans le cadre de la présente demande, une portion de polypeptide comprenant au moins un résidu d'acide aminé. Un fragment peptidique, au sens de la présente demande, peut donc être par exemple : une séquence de résidus d'acides aminés (telle que -AHG- ou -Ala-His-Gly-) si le fragment peptidique ne comprend ni l'extrémité N-terminale ni l'extrémité C-terminale du polypeptide ; ou bien une séquence de résidus d'acides aminés présentant

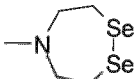
un groupement à son extrémité N-terminale (telle que H-AHG- ou H-Ala-His-Gly-) si le fragment peptidique comprend l'extrémité N-terminale du polypeptide ; ou bien une séquence de résidus d'acides aminés présentant un groupement à son extrémité C-terminale (telle que -AHG-OH ou -Ala-His-Gly-OH) si le fragment peptidique comprend l'extrémité C-terminale du polypeptide.

Peptide fonctionnalisé

Un premier objet de l'invention concerne un peptide fonctionnalisé par un groupement sélénié choisi parmi :

a) le peptide de formule (I) : $X_1-N(CH_2CH_2SeH)_2$;

b) le peptide de formule (I') : X_1-N 

dans lesquels X_1 représente un fragment peptidique et le groupement $-N(CH_2CH_2SeH)_2$ ou  forme une liaison amide avec la terminaison C=O

du résidu d'acide aminé du fragment peptidique X_1 qui est en position C-terminale.

Le fragment peptidique X_1 est de la forme $Y_1-AA_1-AA_2-...-AA_n$ dans laquelle Y_1 est un groupement N-terminal, de préférence un atome d'hydrogène, mais éventuellement aussi tout groupement substituant pour les amines primaires ou secondaires connu de l'homme du métier, par exemple un groupement acyle et notamment un groupement acétyle ; n est un nombre entier supérieur ou égal à 2 ; $AA_1, AA_2, ..., AA_n$ représentent, indépendamment les uns des autres, des résidus d'acides aminés.

Le polypeptide de formule (I) ou (I') comprend de préférence de 2 à 300 résidus d'acides aminés, de préférence de 5 à 100 résidus d'acides aminés, de manière plus particulièrement préférée de 8 à 50 résidus d'acides aminés.

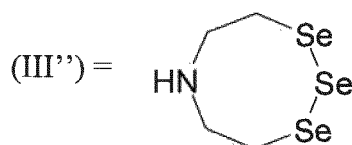
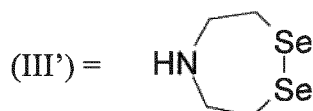
Les polypeptides de formule (I) ou (I') comprennent de préférence uniquement des résidus d'acides aminés choisis parmi les vingt résidus d'acides aminés protéinogéniques et la sélénocystéine. Toutefois, selon un mode de réalisation particulier, les polypeptides de formule (I) ou (I') comprennent un ou plusieurs résidus d'acides aminés non-protéinogéniques.

Les résidus d'acides aminés des polypeptides de formule (I) ou (I') peuvent éventuellement être protégés par des groupements protecteurs des chaînes latérales.

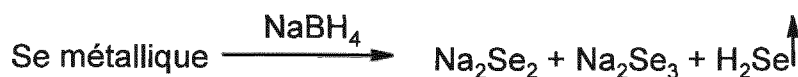
Composé amine de formule (III') et (III'')

Un autre objet de l'invention concerne les composés amines de formule (III') et (III'') ci-dessous et leur procédé de fabrication.

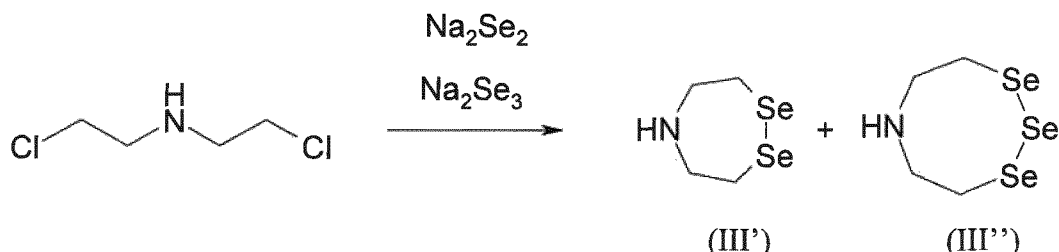
Les composés (III') et (III'') répondent aux formules :



Les composés (III') et (III'') peuvent être obtenus selon le procédé comprenant l'étape a) suivante :



suivie de l'étape b) suivante :



La première étape ci-dessus (étape a) est effectuée de préférence sous atmosphère d'azote. De préférence, les réactifs sont introduits à froid, puis, le mélange est porté à reflux.

Selon un autre mode de réalisation, dans l'étape a), NaBH₄ est remplacé par un autre hydrure métallique, tel que LiAlH₄ ou LiBH₄. Dans le cas des deux hydrures métalliques cités, les composés Li₂Se₂ et Li₂Se₃ sont formés. Ces deux composés Li₂Se₂ et Li₂Se₃ sont ensuite utilisés dans l'étape b) qui suit.

De préférence, la seconde étape (étape b) est réalisée à température ambiante.

De préférence, la phase organique comprenant les produits (III') et (III'') est purifiée à l'issue du procédé, par exemple, par chromatographie liquide haute performance.

Procédé d'obtention des composés (I) et (I') en phase liquide

Un autre objet de l'invention concerne un procédé d'obtention du polypeptide fonctionnalisé (I) ou (I') en phase liquide, ce procédé comprend une première étape de synthèse peptidique et une seconde étape de fonctionnalisation.

- 5 La première étape (étape de synthèse peptidique) permet d'obtenir le polypeptide de formule :



Cette étape de synthèse peptidique peut être effectuée selon toute méthode connue de l'homme du métier. Elle peut en particulier être effectuée en phase liquide
10 ou, de préférence, en phase solide.

De manière schématique, la synthèse peptidique comprend une succession de couplages d'acides aminés à partir d'une amorce (acide aminé initial ou fragment peptidique résultant des additions d'acides aminés précédentes) et de déprotections. Plus précisément, la synthèse peptidique peut successivement comprendre :

- 15 (a) la fourniture d'un fragment peptidique présentant une extrémité N-terminale non protégée, et d'un acide aminé protégé à son extrémité N-terminale ;
- (b) l'établissement d'une liaison peptidique entre l'acide aminé et le fragment peptidique, à l'extrémité N-terminale dudit fragment
20 peptidique ;
- (c) la déprotection de l'extrémité N-terminale de l'acide aminé lié, pour fournir le fragment peptidique de l'étape (a) suivante.

Au cours des différentes réactions de couplage, il est avantageux d'utiliser un composé activateur, notamment un carbodiimide (par exemple
25 dicyclohexylcarbodiimide ou diisopropylcarbodiimide) en présence d'un triazole (par exemple 1-hydroxy-benzotriazole ou 1-hydroxy-7-azabenzotriazole), ou un sel phosphonium ou uronium d'un anion non-nucléophile (par exemple HBTU, HATU, TBTU ou PyBOP) ; ou encore d'utiliser des acides aminés activés sous forme d'halogénures d'acide, par exemple de fluorures d'acide.

30 Au cours des différentes réactions de couplage, les extrémités N-terminales des acides aminés sont avantageusement protégées par un groupement protecteur, de préférence un groupement Fmoc (9H-fluorèn-9-ylméthoxycarbonyl) ou encore un groupement t-Boc (tert-butoxycarbonyl) ou NSC (2-(4-nitrophénylsulfonyl)éthoxycarbonyl).

35 De même, les chaînes latérales des résidus d'acides aminés sont de préférence protégées au cours des différentes réactions de couplage par un ou plusieurs

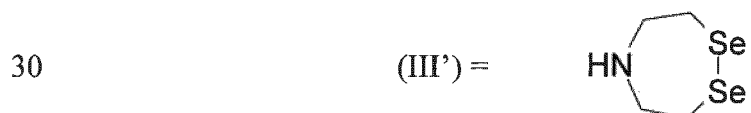
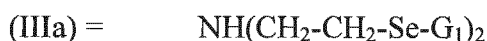
groupements protecteurs appropriés, par exemple un groupement tert-butyle pour les chaînes portant une fonction acide carboxylique.

Dans ce cas, une fois la dernière réaction de couplage d'acide aminé effectuée, on peut prévoir une réaction de déprotection des chaînes latérales. Il faut toutefois noter qu'il peut être préférable de conserver l'ensemble des protections (à l'exception d'une éventuelle protection de la fonction COOH à l'extrémité C-terminale) en vue de l'étape de fonctionnalisation.

Fonctionnalisation

L'étape de fonctionnalisation comprend successivement :

- Eventuellement, la protection de l'extrémité N-terminale du polypeptide de formule (II) avec un groupement protecteur, de préférence choisi parmi la famille des carbamates, des amides ou des groupements alkyles, et notamment un groupement tert-butoxycarbonyle (t-Boc), Fmoc (9H-fluorèn-9-ylméthoxycarbonyle), trifluoroacétyle ou triphénylméthyle.
- Eventuellement également, la protection des fonctions des chaînes latérales des résidus d'acides aminés du polypeptide de formule (II), et tout particulièrement des fonctions amines (de préférence au moyen des groupements protecteurs ci-dessus) et des fonctions acides carboxyliques (au moyen par exemple de groupements tert-butyles).
- Alternativement, et selon un mode de réalisation plus simple, on peut fournir le polypeptide de formule (II) directement sous une forme dans laquelle l'ensemble des fonctions amines et acides carboxyliques sont protégées, en prévoyant une déprotection sélective de la fonction COOH de l'extrémité C-terminale.
- La réaction de couplage en phase liquide du polypeptide de formule (II) avec un composé amine choisi parmi les composés (IIIa) et (III') où :



dans lesquels G₁ représente un groupement protecteur du sélénium,

- Eventuellement la déprotection du polypeptide.

Selon un mode de réalisation, le groupement protecteur G₁ du composé (IIIa) est choisi parmi les groupements de type triphénylméthyle et benzyle et en particulier parmi le para-méthylbenzyle ou para-méthoxybenzyle.

Dans le cas où le composé (IIIa) est utilisé comme réactif de départ pour le couplage avec le composé (II), une étape ultérieure de déprotection du groupement G_1 est prévue afin d'obtenir le composé (I) ou (I'). De préférence, la déprotection s'effectue par traitement avec un acide comme l'acide trifluoroacétique ou l'acide fluorhydrique, ou un oxydant comme l'iode.

Un activateur est avantageusement présent lors de la réaction de couplage, par exemple l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium (PyBOP) ou l'hexafluorophosphate de bromo-trispyrrolidinophosphonium (PyBROP) ou l'acide aminé C-terminal lui-même est activé sous la forme d'un dérivé halogéné (en particulier sous la forme d'un fluorure d'acide aminé ou chlorure d'acide aminé), celui-ci pouvant être préformé ou formé *in situ* à l'aide de réactifs appropriés connus de l'homme de l'art. Parmi les halogénures d'acides aminés, les fluorures d'acides aminés sont préférés, préformés par réaction avec la 1,3,5-trifluorotriazine ou formés *in situ* à l'aide de TFFH (tétraméthylfluoroformamidinium hexafluorophosphate).

De manière générale, on peut également envisager tout réactif permettant l'activation de la fonction acide carboxylique de l'acide aminé connu de l'homme de l'art comme l'HBTU, le TBTU, l'HATU, le BOP... (on pourra se rapporter par exemple à *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins* par Lloyd-Williams, P., Albericio, F., Giralt, E., 1997, CRC Press). Le PyBOP, le PyBROP, le BOP (l'hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium) ou de façon plus générale les phosphoniums sont préférés.

Le polypeptide fonctionnalisé (I) ou (I') selon l'invention peut être obtenu selon une seconde variante.

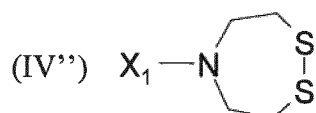
Les segments SeEA peuvent être formés séparément par échange à partir d'un segment SEA de type $X_1-N(CH_2CH_2-S-G_4)_2$ ou thioester X_1-S-R_1 à l'aide des réactifs de structure (III') ou (III''), G_4 représentant un atome d'hydrogène, un groupement protecteur des fonctions thiol ou une liaison disulfure et R_1 représentant un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle ou aryle, éventuellement substitué. .

Les segments SeEA peuvent également être formés *in situ*, pendant la ligation par échange à partir d'un segment SEA de type X_1 -SEA ou thioester X_1-SR_1 à l'aide des réactifs (III') ou (III''). Le segment de type H-Cys- X_2 présent en solution consomme le segment X_1 -SeEA formé par échange. En général, le segment X_1 -SeEA formé *in situ* n'est pas observé puisqu'il réagit très rapidement avec le segment H-Cys- X_2 . Du fait de la rapidité de l'échange et de la ligation SeEA, il en résulte une accélération très significative de la ligation, dès lors que le réactif (III') ou (III'') est introduit dans le milieu réactionnel de ligation.

Ainsi, selon une seconde variante, l'obtention des composés (I) et (I') comprend les étapes successives suivantes :

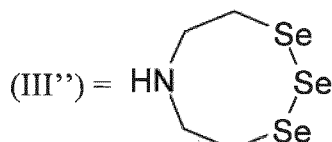
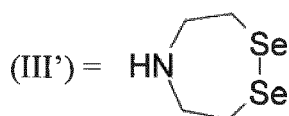
a2) la fourniture

- d'un peptide fonctionnalisé sur son extrémité C-terminale par un groupement porteur d'une fonction thiol répondant à la formule (IV) ou (IV'') :



- d'un peptide fonctionnalisé par un groupement porteur d'une fonction thioester (IV') = $X_1 - SR$ et R représente un groupement alkyl ou aryl éventuellement substitué,

b2) la réaction en phase liquide entre le composé de formule (IV) ou le composé de formule (IV'') ou le composé de formule (IV') et un composé amine de formule (III') ou (III'') :



en présence éventuellement d'un composé réducteur des liaisons disulfures dans le cas où le composé (IV'') est utilisé.

Le composé de formule (IV) ou de formule (IV'') peut notamment être obtenu selon le protocole décrit dans le document WO 2011/051906.

Dans la formule (IV'), le groupement R représente de préférence un alkyl en C1-C12 éventuellement substitué ou un aryle en C6-C12 éventuellement substitué. De tels composés sont décrits notamment par WO96/34878 et WO98/28434.

Selon un mode de réalisation, le composé réducteur des liaisons disulfures peut être choisi parmi les composés thiol, tels que l'acide 4-mercaptophénylacétique (MPAA), le dithiothréitol (DTT), le thiophénol et ses dérivés, un alkylthiol (notamment le benzylmercaptan), parmi les composés séléniol comme le sélénothiophénol ou le diphenylséléniure ou parmi les phosphines telles que la tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP), ou leurs mélanges.

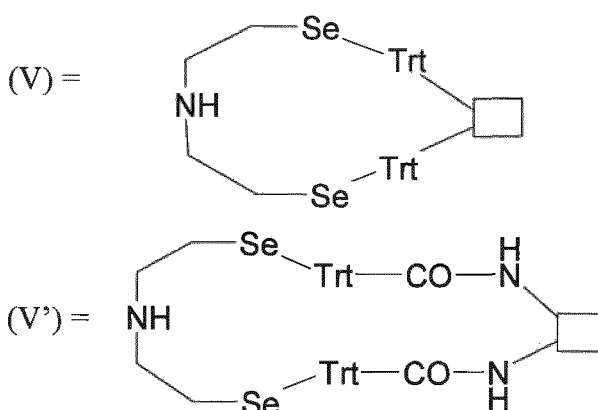
A l'issue de la réaction de couplage précédente, le composé (I') est obtenu. Le composé (I) est obtenu en mettant en contact le composé (I') avec un composé réducteur des liaisons disélénium ou trisélénium.

Parmi les composés connus comme réducteurs des liaisons di-sélénium ou tri-sélénium, on peut citer : la tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP), les thiols réducteurs comme l'acide 4-mercaptophénylacétique (MPAA), le thiophénol, le benzylmercaptan, le dithiothréitol (DTT), le sélénophénol ou le diphenylsélénure plus un agent réducteur des liaisons disélénium, le zinc métallique, les hydrures comme NaBH₄, LiBH₄, NaBH₃CN, NaBH(OAc)₃.

A l'issue de l'étape de fonctionnalisation, le polypeptide de formule (I) ou (I') est obtenu. Il est avantageux de prévoir à ce stade une étape de purification du composé, par exemple par chromatographie en phase liquide.

Résine polymère fonctionnalisée

Un autre objet de l'invention concerne les résines polymères fonctionnalisées répondant à la structure (V) ou (V') :



dans lesquelles,

□ représente un support solide,

Trt représente un groupement triphénylméthyle éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants, notamment choisi parmi les substituants chlore, méthoxy, méthyle, fluor et cyano.

Ces résines polymères sont ensuite utilisées pour préparer le peptide fonctionnalisé SeEA.

A titre de support solide □, on utilise un polymère soluble ou insoluble, le polymère insoluble étant de préférence sous forme de particules (billes). On peut par exemple utiliser une résine à base de polystyrène (de préférence) ou encore à base de polyacrylamide, polyéthylèneglycol, cellulose, polyéthylène, polyester, latex, polyamide, polydiméthylacrylamide, copolymère polyéthylèneglycol-polystyrène,

copolymère polyéthylèneglycol-polyacrylamide ou encore une résine dérivée de celles-ci.

Pour préparer la résine polymère fonctionnalisée (V) ou (V'), on utilise un support solide □ porteur d'une fonctionnalisation adaptée, □-Z, dans laquelle Z est un groupement lieur. De préférence, le support solide présente des groupements chloro-triphénylméthyle (ou chlorotrityle), où le triphénylméthyle est éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants, notamment choisis parmi les substituants chlore, méthoxy, méthyle, fluor et cyano.

A titre d'exemples de support solide □-Z fonctionnalisé, on peut citer les résines polystyrènes présentant des groupements lieurs chlorure de trityle, chlorure de 2-chlorotrityle, chlorure de 4-méthyltrityle ou chlorure de 4-méthoxytrityle. De tels supports solides sont disponibles commercialement, par exemple auprès de Glycopep.

Selon un autre mode de réalisation, le support solide fonctionnalisé □-Z présente des groupements lieurs qui sont des groupements de type trityl-alcool, c'est à dire des groupements OH-Trt-CO-NH-, où le triphénylméthyle (Trt) est éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants, notamment choisis parmi les substituants chlore, méthoxy, méthyle, fluor et cyano. Des supports solides présentant de tels groupements lieurs ont été décrits par exemple dans Quibell, JACS 1995, 117, 11656-11668, et sont disponibles commercialement, par exemple dans la gamme ChemMatrix® de supports solides polyéthylèneglycol.

L'utilisation de supports solides de ce type nécessite une étape préliminaire d'activation du support solide :

- soit avec un agent bromé (notamment bromure d'acétyle) pour modifier les groupements lieurs sous la forme Br-Trt-CO-NH- ;
- soit avec un agent chloré (notamment chlorure d'oxalyle) pour modifier les groupements lieurs sous la forme Cl-Trt-CO-NH- ;
- soit avec un acide comme l'acide trifluoroacétique, pour modifier les groupements lieurs sous la forme H₂O⁺-Trt-CO-NH- ;
- soit avec BF₃.Et₂O, pour modifier les groupements lieurs sous la forme BF₃:HO-Trt-CO-NH-. selon Singh, S. et al., *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 4551-4554.

Une étape d'activation de ce type est décrite par exemple dans Harre et al., *Reactive & functional polymers* 1999, 41, 111-114.

La préparation de la résine polymère fonctionnalisée s'effectue en couplant le composé amine de formule :



au support solide fonctionnalisé, $\square$ -Z, ci-dessus. Le composé amine (III) peut lui-même être obtenu par déprotection du composé amine de formule (IIIa) ci-dessus, dans lequel G_1 est un groupement protecteur du sélénium.

Le couplage s'effectue en milieu acide afin de limiter les risques de démasquage de l'amine secondaire, ce qui induirait des réactions secondaires.

Les groupements chlorure de trityle en excès sont de préférence neutralisés, par exemple avec du méthanol. Il est alors important d'ajouter une base pour neutraliser le HCl formé.

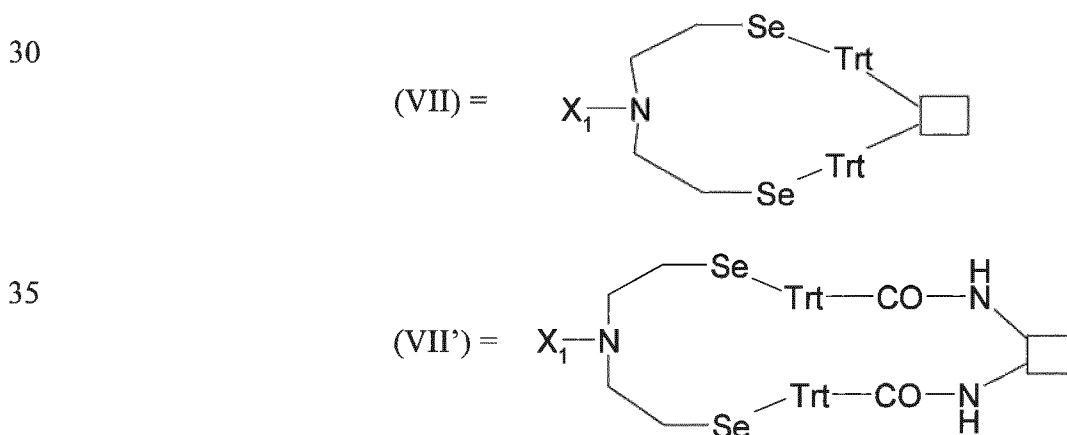
On peut prévoir que la préparation de la résine polymère fonctionnalisée fasse partie intégrante du procédé de fabrication en phase solide des polypeptides de formule (I) et (I').

Alternativement, la résine polymère fonctionnalisée peut être préparée à l'avance et de manière distincte, afin d'être prête à l'emploi dans le cadre du procédé de fabrication en phase solide des peptides de formule (I) et (I').

L'utilisation de supports solides de ce type peut permettre d'utiliser des squelettes de résine de type polyéthylèneglycol ou polyéthylèneglycol-polystyrène, plus adaptés à la préparation de longs polypeptides que les résines de type polystyrène.

De préférence, les particules de résine présentent un Dv_{50} compris entre 1 et 1000 μm . Le Dv_{50} est défini comme étant le 50^{ème} centile de la distribution de taille des particules, c'est-à-dire que 50 % des particules ont une taille inférieure au Dv_{50} et 50 % ont une taille supérieure au Dv_{50} . De manière générale, le Dv_{50} est caractéristique du profil granulométrique (distribution volumétrique) des particules, et il peut être déterminé par granulométrie laser (pour une taille inférieure à 200 μm), ou par tamisage (pour une taille supérieure à 200 μm).

Un autre objet de l'invention concerne un peptide greffé sur une résine polymère fonctionnalisée présentant la structure (VII) ou (VII') :



dans lesquelles,

□ représente un support solide,

Trt représente un groupement triphénylméthyle éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants, notamment choisi parmi les substituants chlore, méthoxy, méthyle, fluor et cyano,

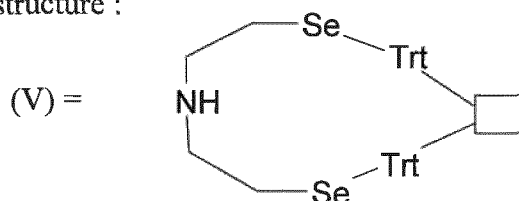
X₁ représente un fragment peptidique fonctionnalisé sur son extrémité C-terminale.

Procédé d'obtention des peptides de formules (I) et (I') en phase solide

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de fabrication en phase solide des peptides (I) et (I') précédemment décrit.

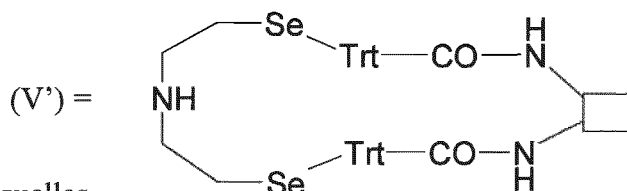
Ce procédé en phase solide comprend une phase de fonctionnalisation suivie par une phase de synthèse peptidique.

La première étape comprend la fourniture d'une résine polymère fonctionnalisée présentant la structure :



20

Ou



dans lesquelles,

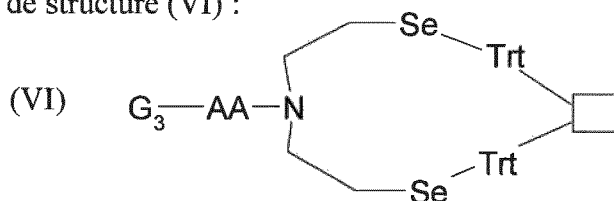
25

□ représente un support solide,

Trt représente un groupement triphénylméthyle éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants, notamment choisi parmi les substituants chlore, méthoxy, méthyle, fluor et cyano.

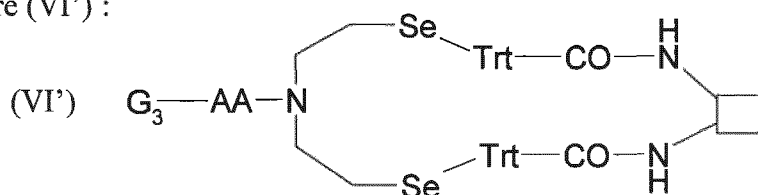
30

La seconde étape du procédé comprend le greffage d'un acide aminé G₃ – AA sur la résine polymère fonctionnalisée (V) ou (V') obtenue à la première étape pour conduire au composé de structure (VI) :



35

Ou de structure (VI') :



dans lesquelles,

□ et Trt ont la même signification que dans le composé (V) ou (V'),

AA représente un résidu d'acide aminé comportant éventuellement un ou plusieurs groupements protecteurs ;

G₃ représente un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur de la fonction amine N-terminale de AA.

De préférence l'acide aminé AA est protégé à son extrémité N-terminale par un groupement protecteur G₃ labile en présence de base, de préférence choisi parmi les groupements 2-(4-nitrophénylsulfonyl)éthoxycarbonyl (NSC) ou Fmoc.

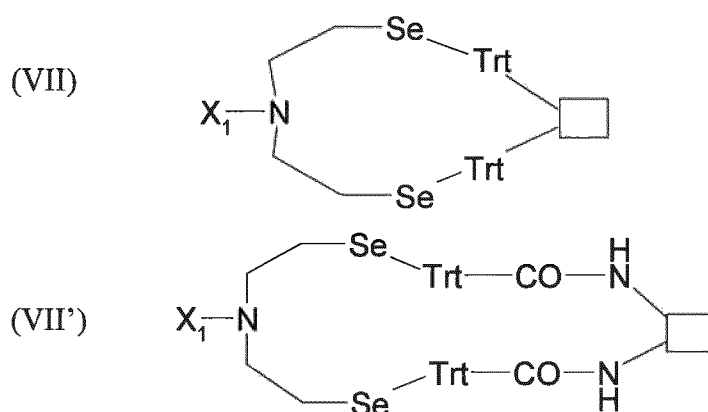
De préférence, l'acide aminé AA comporte des groupements protecteurs sur la totalité ou une partie (de préférence la totalité) des fonctions présentes sur sa chaîne latérale, et notamment les fonctions acide carboxylique (acides aspartique et glutamiques), amine (pour la lysine), alcool (pour la sérine ou la thréonine), phénol (pour la tyrosine), thiol ou sélénol (pour la cystéine ou sélénocystéine), guanidine (pour l'arginine) et imidazole (pour l'histidine). De tels groupements protecteurs sont connus de l'homme du métier. On pourra se reporter par exemple à l'ouvrage de référence *Protective groups in organic synthesis*, 2ème édition, T. Greene et P. Wuts, John Wiley & Sons, Inc.

De préférence, l'acide aminé est activé en présence d'HATU (2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate Methanaminium), de PyBOP ou de BOP ou de manière plus particulièrement préférée en présence de PyBROP, ou encore sous forme d'un halogénure, notamment fluorure (c'est-à-dire qu'un atome de fluor est lié au groupement acyle du résidu d'acide aminé).

L'acide aminé réagit avec la fonction amine secondaire présente sur le support solide fonctionnalisé pour former une liaison amide. Après couplage de l'acide aminé, on peut éventuellement procéder à la déprotection de celui-ci.

Ainsi, l'étape de fonctionnalisation consiste dans ce mode de réalisation à créer un support solide amorce à partir d'un support solide préalablement fonctionnalisé.

La troisième étape comprend la synthèse peptidique à partir de l'acide aminé AA greffé sur la résine polymère pour conduire au composé (VII) ou (VII') :



L'étape de synthèse peptidique est effectuée de manière analogue à ce qui a déjà été décrit précédemment, concernant la synthèse peptidique en phase liquide, l'amorce initiale étant fournie par l'acide aminé AA greffé sur le support solide.

Enfin, une fois la synthèse peptidique terminée, on prévoit une réaction de séparation (ou clivage) du polypeptide de son support, par coupure de la liaison entre Trt et Se pour conduire au composé (I) ou (I'). De préférence, la coupure s'effectue avec une solution d'acide trifluoroacétique comprenant les pièges à carbocations connus de l'homme du métier comme l'eau, le triisopropylsilane, le thiophénol, le thioanisole, l'anisole, le diméthylsulfure, etc...

On peut également éventuellement prévoir les déprotections adéquates des chaînes latérales des acides aminés pour l'obtention du peptide fonctionnalisé de formule (I) ou (I').

Comme pour le procédé en phase liquide, il est avantageux de prévoir à ce stade une étape de purification du composé, par exemple par chromatographie en phase liquide.

Procédé de ligation native

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de fabrication d'un polypeptide de formule (VIII) :



dans lequel,

$X_1, X_2, \dots, X_i, \dots, X_n$ sont des fragments peptidiques,

$C_1, C_2, \dots, C_{i-1}, \dots, C_{n-1}$ sont des résidus d'acides aminés portant une fonction thiol, ou sélénol

n est un entier supérieur ou égal à 2,

i est un nombre entier quelconque allant de 1 à n ,

ce procédé comprenant une ou plusieurs étapes de réaction entre un composé de formule (IX_i) :

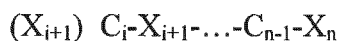


dans laquelle :

X'_1 représente X_1

et X'_i représente $C_{i-1}-X_i$ pour $i > 1$

5 et un composé de formule (X_{i+1}) :



pour former un composé de formule (X_i) :



10 Le résidu C_i est un résidu d'acide aminé comportant une fonction thiol ou sélénol. Cette fonction thiol ou sélénol peut être en particulier une fonction béta-amino thiol ou béta-amino sélénol (auquel cas le résidu C_i représente de préférence le résidu cystéine ou le résidu sélénocystéine), une fonction gamma-amino thiol ou gamma-amino sélénol (auquel cas le résidu C_i représente de préférence le résidu homocystéine ou homosélénocystéine).

15 L'invention permet de produire des polypeptides en enchaînant successivement plusieurs réactions de ligation. Ceci peut s'avérer approprié pour obtenir des polypeptides de grande taille, par exemple des polypeptides comprenant plus d'environ 100 résidus d'acides aminés. En effet, dans de tels cas la fabrication de polypeptides de formules (IX_i) et (X_i) par synthèse directe peut avoir un faible
20 rendement, et il est donc avantageux d'utiliser deux ou plus de deux ligations successives, afin d'avoir à synthétiser directement uniquement des polypeptides comprenant par exemple moins d'environ 50 résidus d'acides aminés.

A titre d'exemple, l'utilisation de deux ligations successives permet d'obtenir un polypeptide comprenant environ 150 résidus d'acides aminés sans avoir à synthétiser
25 directement de polypeptide comprenant plus d'environ 50 résidus d'acides aminés ; l'utilisation de trois ligations successives permet d'obtenir un polypeptide comprenant environ 200 résidus d'acides aminés sans avoir à synthétiser directement de polypeptide comprenant plus d'environ 50 résidus d'acides aminés.

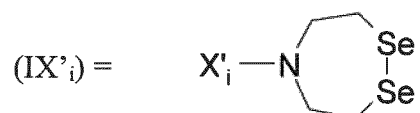
30 Le polypeptide de formule (VIII) peut être obtenu en utilisant plusieurs méthodes de ligation. D'autres méthodes de ligation sont par exemple des méthodes faisant intervenir des thioesters ou faisant intervenir des composés soufrés particuliers tels que décrit dans le document WO 2011/051906.

35 Le procédé de fabrication du polypeptide de formule (VIII) selon l'invention comprend au moins une étape de réaction entre un composé de formule (IX_i) et un composé de formule (X_i) .

Ainsi, le procédé selon l'invention permet d'obtenir un polypeptide de formule (VIII); chaque X_i , pour i entier entre 1 et n , étant un fragment peptidique ; et chaque C_i , pour i

entier entre 1 et n, étant un résidu d'acide aminé comportant une fonction thiol ou sélénol, et notamment un résidu cystéine ou sélénocystéine selon un mode de réalisation particulier, en utilisant n-1 ligations successives.

- 5 Selon un mode de réalisation de l'invention, le composé (IX_i) peut être obtenu à partir du composé (IX'_i) :



- 10 en présence d'au moins un composé réducteur des liaisons disélénium et/ou trisélnium. En effet, le polypeptide de formule (IX'_i) est alors réduit in situ et fournit le polypeptide de formule (IX_i) pour la réaction de ligation.

- Selon un mode de réalisation, le composé réducteur est choisi parmi la tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP), l'acide 4-mercaptophénylacétique (MPAA), le
15 benzylmercaptan, le thiophénol, le DTT, le 2-mercaptoéthylsulfonate de sodium (MESNa), le sélénophénol.

- De manière analogue à ce qui a été décrit précédemment pour les composés (I) et (I'), selon un mode de réalisation, les composés (IX_i) et (IX'_i) peuvent être formés par échange, à partir d'un segment SEA de structure X'_i - N(CH₂CH₂-S-G₅)₂ ou d'un
20 thioester de structure X'_i - S - R₁ à l'aide des composés sélénés de structure (III') ou (III''), éventuellement en présence de composés réducteur des liaisons disulfure et/ou disélénium, G₅ représentant H, un groupement protecteur des fonctions thiol ou une liaison disulfure et R₁ représentant H ou un groupement protecteur du soufre.

- Dans le cas où i est égal à 1, les composés (IX_i) et (IX'_i) correspondent
25 respectivement aux composés (I) et (I').

- De manière générale, la réaction de ligation à partir du polypeptide de formule (IX'_i) en tant que réactif peut être plus pratique à mettre en œuvre que la réaction de ligation directement avec le polypeptide de formule (IX_i). En effet, le polypeptide de formule (IX_i) a naturellement tendance à s'oxyder en le polypeptide de formule (IX'_i),
30 notamment sous l'action de l'oxygène de l'air. Par exemple, il est possible que le polypeptide de forme ouverte (IX_i) s'oxyde dans le temps lorsqu'il est stocké sous forme lyophilisée. En d'autres termes, une préparation du polypeptide de formule (IX_i) contient généralement nécessairement en partie le polypeptide de formule (IX'_i). La présence de ces deux formes peut compliquer la caractérisation et la purification.
35 C'est pourquoi il peut être plus simple de mettre en œuvre la réaction de ligation par mise en contact du polypeptide de formule (IX'_i) avec le polypeptide de formule (X_i),

le polypeptide à terminaison cyclique de formule (IX'_i) étant réduit *in situ* en le polypeptide ouvert de formule (IX_i).

Pour les mêmes raisons, même lorsque la réaction de ligation est effectuée directement par mise en contact du polypeptide de formule (IX_i) avec le polypeptide de formule (X_i), il est préférable d'utiliser lors de la réaction un ou plusieurs des composés réducteurs des liaisons disélénium mentionnés ci-dessus.

La réaction de ligation intervient de préférence en phase liquide, et notamment en milieu aqueux, par exemple dans un tampon phosphate. De préférence, cette réaction est effectuée à un pH compris entre 4 et 8,5, de manière plus particulièrement préférée à un pH compris entre 5 et 7,5 et idéalement à un pH voisin de 5,5.

La réaction de ligation est effectuée de préférence à une température comprise entre 0 et 50°C, et idéalement à une température d'environ 37°C. La durée de la réaction est ajustée en fonction du choix des réactifs et des autres conditions de la réaction. La durée appropriée peut également être ajustée selon les résultats d'une analyse de chromatographie liquide – spectrométrie de masse au cours de la réaction. La durée appropriée sera typiquement de quelques heures à quelques jours.

Chacun des polypeptides de formule (IX_i) et (X_i) est de préférence présent à une concentration comprise entre 0,01 et 50 mM, lors de la réaction. Le rapport de concentration molaire entre les polypeptides de formule (IX_i) et (X_i) lors de la réaction est de préférence compris entre 2:3 et 3:2.

La réaction de ligation décrite ci-dessus peut être suivie d'une étape de purification du polypeptide de formule (X_i) obtenu, par exemple par chromatographie en phase liquide ou par toute autre technique usuelle.

La cinétique de ligation selon la présente invention est significativement supérieure à la cinétique de ligation obtenue avec des composés soufrés décrits dans le document WO 2011/051906 ou avec des thioesters comme ceux enseignés par Kent et Dawson.

Du fait de la rapidité de la ligation SeEA, elle peut être réalisée en présence d'autres groupements capables de participer à une réaction de ligation native, comme les segments SEA ou thioester.

La combinaison des ligations SeEA et SEA constitue un outil très performant pour la synthèse totale de protéines. Pour la production d'une protéine qui doit être synthétisée par ligation de plusieurs fragments on peut par exemple mettre en œuvre la ligation SEA pour les jonctions faciles, et la ligation SeEA pour les jonctions difficiles. En effet, la ligation SeEA permet de former facilement des jonctions encombrées, en 4 heures par exemple pour la jonction Val-Cys, alors que ce type de

jonction demande des temps de ligation de 96 heures avec la ligation SEA ou et de 8 heures pour la ligation NCL.

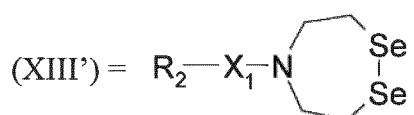
Une autre façon intéressante d'exploiter les ligations SeEA et SEA est la ligation one-pot séquentielle SeEA-SEA. Celle-ci peut être mise en œuvre pour lier
5 trois fragments sans isolement et purification intermédiaire (réaction dite en un pot) lorsque les jonctions ont un encombrement stérique analogue. Un exemple de mise en œuvre de cette variante est explicité ci-dessous.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le procédé de ligation de l'invention permet la fabrication à partir de trois fragments peptidiques d'un
10 polypeptide représenté par la formule (XII) :

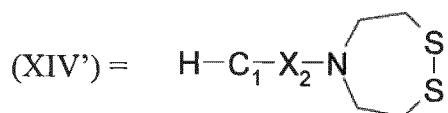
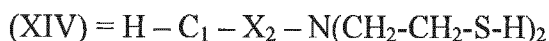


ledit polypeptide étant obtenu par un procédé comprenant les étapes suivantes :

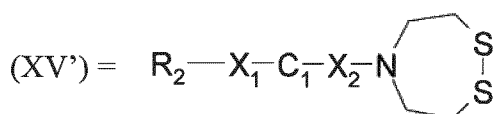
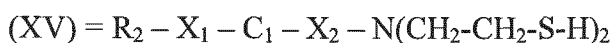
a) réaction entre un composé de formule (XIII) ou (XIII') :



et un composé de formule (XIV) ou (XIV') :



pour former le composé de formule (XV) ou (XV') :



b) réaction entre un composé de formule (XV) ou (XV') et un polypeptide de formule (XVI) :



pour former le composé de formule (XII),

dans lesquelles,

R_2 représente un groupement protecteur de la fonction N-terminale de X_1 ,

X_1 , X_2 , X_3 représentent, indépendamment les uns des autres, des fragments
35 peptidiques,

C_1 et C_2 représentent, indépendamment l'un de l'autre, des résidus d'acides aminés porteurs d'une fonction thiol ou sélénol.

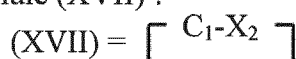
De façon analogue à ce qui est décrit précédemment pour l'obtention des composés (I) et (I'), les composés ci-dessus (XIII) et (XIII') peuvent être formés in situ, par échange à partir de réactifs de type (IIIa), (III') ou (III'') en présence de composés SEA de structure $R_2 - X_1 - SEA$ ou thioester de structure $R_2 - X_1 - S - R_1$, dans lequel R_1 représente H ou un alkyle ou un aryle éventuellement substitué, permettant ainsi d'accélérer la deuxième étape de ligation.

Cette réaction de ligation one-pot de trois segments peut être mise en œuvre pour lier trois fragments sans isolement et purification intermédiaire (réaction dite « one-pot ») lorsque les jonctions ont un encombrement stérique analogue. L'encombrement des jonctions étant analogue, la ligation entre le composé (XIII) ou (XIII') et le composé (XIV) ou (XIV') sera plus rapide que la cyclisation du composé (XIV) ou (XIV') par ligation SEA intramoléculaire, ou que la polymérisation du segment (XIV) ou (XIV') par ligation SEA intermoléculaire. Les ligations SEA intramoléculaire ou intermoléculaire sont décrites dans le document WO 2011/051906.

Production d'un polypeptide cyclique par auto-ligation native

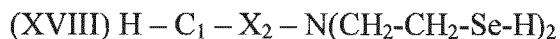
Les principes utilisés pour la ligation native décrits ci-dessus peuvent également être utilisés pour produire des polypeptides cycliques, par auto-ligation native d'un polypeptide (ligation d'une extrémité du polypeptide avec l'autre extrémité du même polypeptide).

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de fabrication d'un polypeptide cyclique de formule (XVII) :



X_2 représentant un fragment peptidique, et C_1 représentant un résidu d'acide aminé comportant une fonction thiol ou séléno,

ledit procédé comprenant au moins une étape de réaction de ligation d'un polypeptide de formule (XVIII) :



avec lui-même.

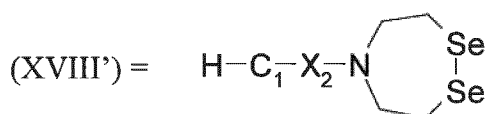
Le polypeptide de formule (XVIII) comprend de préférence entre 2 et 300 résidus d'acides aminés, de préférence entre 5 et 100 résidus d'acides aminés, de manière plus particulièrement préférée entre 8 et 50 résidus d'acides aminés.

Le polypeptide de formule (XVIII) comprend un atome d'hydrogène et un résidu C_1 à l'extrémité N-terminale, C_1 ayant la signification indiquée ci-dessus. X_2 représente ici un fragment peptidique de la forme $AA_1 AA_2 \dots AA_n$ où n est un nombre entier supérieur ou égal à 1 et chaque AA_i représente un résidu d'acide aminé.

Le polypeptide de formule (XVIII) comprend de préférence uniquement des résidus d'acides aminés choisis parmi les vingt résidus d'acides aminés protéinogéniques et la sélénocystéine. Toutefois, selon un mode de réalisation particulier, le polypeptide de formule (XVIII) comprend un ou plusieurs résidus d'acides aminés non- protéinogéniques, autres que la sélénocystéine.

Les résidus d'acides aminés du polypeptide de formule (XVIII) peuvent éventuellement être protégés par des groupements protecteurs des chaînes latérales.

Il est possible d'effectuer la réaction de ligation ci-dessus en mettant en présence le polypeptide de formule (XVIII') :



avec au moins un composé réducteur des liaisons disélénium, qui est de préférence tel que décrit ci-dessus. En effet, le polypeptide de formule (XVIII') est alors réduit *in situ* et fournit le polypeptide de formule (XVIII) pour la réaction de ligation.

De manière générale, même lorsque la réaction de ligation est effectuée directement à partir du polypeptide de formule (XVIII), il est préférable d'utiliser lors de la réaction un ou plusieurs des composés réducteurs des liaisons disélénium mentionnés ci-dessus.

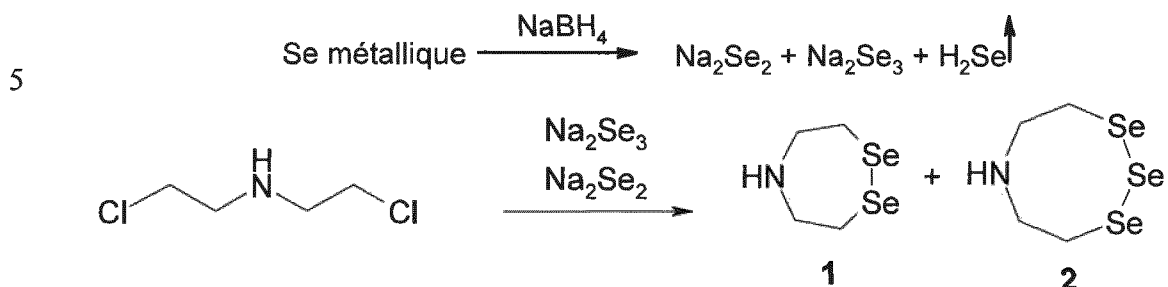
En général, la cyclisation du polypeptide de formule (XVIII) n'est pas gênée par des multimérisations concurrentes, si la réaction est effectuée en conditions suffisamment diluées. On peut par exemple utiliser une concentration de polypeptide de formule (XVIII) comprise entre 0,01 et 50 mM, typiquement d'environ 1 mM (ou éventuellement entre 0,01 et 0,1 mM en cas de risques sérieux de multimérisations).

Par ailleurs, les conditions préférées de mise en œuvre de la réaction de ligation sont les mêmes que celles décrites ci-dessus pour la réaction à partir des polypeptides de formule (IX) et (X).

La réaction de ligation décrite ci-dessus peut être suivie d'une étape de purification du polypeptide cyclique de formule (XVII) obtenu, par exemple par chromatographie en phase liquide ou par toute autre technique usuelle.

Kit de synthèse

Un autre objet de l'invention concerne un kit de synthèse de polypeptide comprenant un ou plusieurs peptides de formules (IX_i) ou (IX'_i), ou au moins un composé de formule (III') ou (III''), et éventuellement un ou plusieurs réactifs de couplage, de protection, de déprotection, ou des solvants.

EXEMPLESExemple 1 : Synthèse des composés 1 (Se₂EA) et 2 (Se₃EA)

Sous balayage d'azote, de l'éthanol absolu V = 19 mL est additionné goutte à goutte, sous agitation à un mélange de sélénium Se (940 mg, 11,9 mmol, 1,5 eq) et de borohydrure de sodium (NaBH₄) (300 mg, 7,9 mmol) refroidi dans un bain de glace.

10 Après une réaction vive, le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 1h30. Le diséléniure de sodium Na₂Se₂ formé en solution est de couleur brun-rouge.

A température ambiante, le bis(2-chloroéthyl)amine hydrochloride (847 mg, 4,7 mmol, 0,5eq) en solution dans un mélange NaOHaq (0,5 M)/EtOH (1/1) V = 3 mL est additionnée goutte à goutte pendant 10 minutes sur la solution de Na₂Se₂ et Na₂Se₃ précédente.

15 Le milieu réactionnel est agité 45 minutes à température ambiante.

Le milieu réactionnel est alors dilué V = 10 mL par une solution de NaOHaq (0,5M) puis extrait par du CH₂Cl₂ (3 × 30 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées par du Na₂SO₄, puis concentrées jusqu' à 1/3 du volume total.

Le concentrât organique obtenu est alors extrait par une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique (TFA) (10%) puis purifié directement par RP-HPLC :

20 Colonne C18 X-bridge (d = 1,9 cm, L = 20 cm, 130 Å, 5 µm), détection UV (λ = 215 nm), tampon A : H₂O/TFA (1:0,05% en v/v), tampon B : CH₃CN/H₂O/TFA (4:1:0,05% en v/v/v), isocratique : tampon A (3 min), puis gradient : tampon B (0 à 50% en 9 min, 25 mL/min).

25 Après lyophilisation, les composés **1** (Se₂EA) 230 mg (Rendement R=21 %) et les composés **2** (Se₃EA) 240 mg (Rendement R= 16 %) sont obtenus sous forme d'une poudre jaune.

30 *Analyse LC-MS Chromatogramme RP-HPLC des composés 1 (Se₂EA) et 2 (Se₃EA) respectivement*

LC-MS : Tampon A : H₂O/TFA (1/0,1% v/v), Tampon B : CH₃CN/H₂O/TFA (4/1:0,1% v/v/v).

RP-HPLC sur une colonne C18 Xbridge BEH (300 Å, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm) en utilisant un gradient linéaire 0-100% B en 30 min, débit 1 mL/min, détection UV ($\lambda = 215$ nm).

MS : Mode Ionisation Electrospray positif, voltage cône 30V, analyseur quadripolaire.

Le chromatogramme et le spectre de masse du composé **1** sont représentés sur les figures 1a et 1b respectivement.

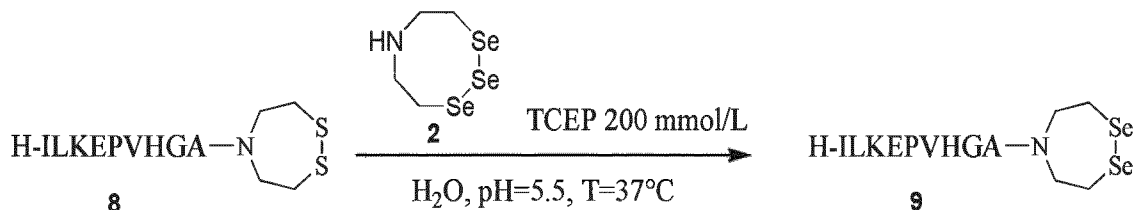
Le chromatogramme et le spectre de masse du composé **2** sont représentés sur les figures 2a et 2b respectivement.

Exemple 2 : Synthèse et isolement des segments SeEA selon l'invention par échange, à partir de segments SEA.

Synthèse du peptide 8 : H-ILKEPVHGA-SEA

La méthode de synthèse de ce peptide est décrite dans le document Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. *Organic letters* **2010**, 12, 5238-41.

Synthèse du peptide 9 : H-ILKEPVHGA-SeEA



La réaction est réalisée dans une boîte à gant (la concentration en dioxygène est inférieure à 50 ppm) sous atmosphère d'azote. Une solution de TCEP à 200 mmol/L est préparée dans un tampon phosphate 0,1M à pH = 7,2. Le pH de la solution TCEP/MPAA obtenue est ajusté à pH = 5,5.

Le peptide **8** (3,8 mg, 3 µmol) et du linker Se₃EA **2** (8,4 mg, 28 µmol, 10 eq) sont dissous dans la solution précédente de TCEP V = 297 µL. Le milieu réactionnel est agité 24 h à 37°C.

En fin de réaction, le milieu réactionnel est dilué V = 2 mL par une solution de TFA (0,1%) puis purifié directement par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC) (Colonne C18 Nucleosil (d=1 cm, L=20 cm, 120 Å, 5 µm), détection UV ($\lambda = 215$ nm), tampon A : H₂O/TFA (1:0,05% en v/v), tampon B : CH₃CN/H₂O/TFA (4:1:0,05% en v/v/v), gradient : tampon B (0 à 20% en 5 min puis 20 à 42% en 60 min, 6 mL/min)). 1,96 mg de peptide **9** sont obtenus (rendement 62%).

Analyse LC-MS Chromatogramme RP-HPLC du peptide 9

LC-MS : Tampon A : H₂O/TFA (1/0,1% v/v), Tampon B : CH₃CN/H₂O/TFA (4/1:0,1% v/v/v).

5 RP-HPLC sur une colonne C18 Xbridge BEH (300 Å, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm) en utilisant un gradient linéaire 0-100% B en 30 min, débit 1 mL/min, détection UV (λ = 215 nm).

MS : Mode Ionisation Electrospray positif, voltage cône 30V, analyseur quadripolaire.

10 La figure 3a correspond au chromatogramme de la solution après un temps de réaction t de 0,8 h. Pour t = 0,8 h, la réaction d'échange n'est pas terminée, en effet, le pic correspondant au peptide 8 est encore présent en quantité significative.

La figure 3b correspond au chromatogramme de la solution après un temps de réaction t de 6 h et la figure 3c est le spectre de masse correspondant. Ce chromatogramme montre que la réaction d'échange est terminée.

Les figures 4a et 4b correspondent au chromatogramme et au spectre de masse du peptide 9 après purification.

20 Exemple 2bis : Synthèse et isolement des segments SeEA de grande taille selon l'invention par échange, à partir de segments SEA.

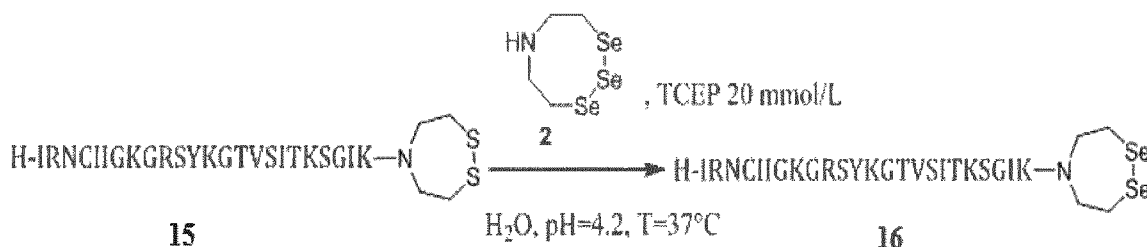
Synthèse du peptide 15 : H-IRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIK-SEA

La méthode de synthèse de ce peptide est décrite dans le document Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. *Organic letters* **2010**, 12, 5238-41.

25

Synthèse du peptide 16 : H-IRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIK-SeEA

30



35

La réaction est réalisée sous atmosphère d'azote. Une solution de TCEP à 20 mmol/L est préparée dans un tampon acétate 0,1M à pH=5,5. Le pH de la solution TCEP obtenue est ajusté à pH= 4,2.

Le peptide **15** (4 mg, 1,4 μmol) et du linker Se_3EA **2** (4,4 mg, 14,3 μmol , 10 eq) sont dissous dans la solution précédente de TCEP $V = 719 \mu\text{l}$. Le milieu réactionnel est agité 24 h à 37°C.

En fin de réaction, le milieu réactionnel est dilué $V = 3 \text{ mL}$ par une solution de TFA (0,1%) puis purifié directement par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC) (Colonne C18 Nucleosil ($d = 1 \text{ cm}$, $L = 20 \text{ cm}$, $120 \text{ \AA}$, $5 \mu\text{m}$), détection UV ($\lambda = 215 \text{ nm}$), tampon A : $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (1:0,05% en v/v), tampon B : $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (4:1:0,05% en v/v/v), gradient : tampon B (0 à 20% en 5 min puis 20 à 42% en 60 min, 6 mL/min)). 1,8 mg de peptide **16** sont obtenus (Rendement 38%).

Analyse LC-MS Chromatogramme RP-HPLC du peptide **16**

LC-MS : Tampon A : $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (1/0,1% v/v), Tampon B : $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (4/1:0,1% v/v/v).

RP-HPLC sur une colonne C18 Xbridge BEH ($300 \text{ \AA}$, $3,5 \mu\text{m}$, $4,6 \times 150 \text{ mm}$) en utilisant un gradient linéaire 0-100% B en 30 min, débit 1 mL/min , détection UV ($\lambda = 215 \text{ nm}$).

MS : Mode Ionisation Electrospray positif, voltage cône 30V, analyseur quadripolaire.

La figure 13 correspond au chromatogramme de la solution après un temps de réaction t de 24 h. Le pic correspondant au peptide **16** est bien présent et indique que la réaction d'échange est terminée.

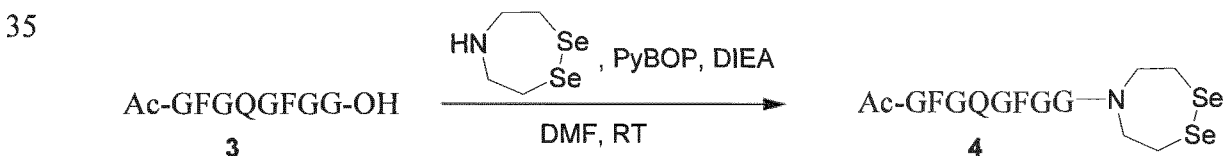
Les figures 14a et 14b correspondent respectivement au chromatogramme et au spectre de masse du peptide **16** après purification.

Exemple 3 : Ligation native avec des composés à base de sélénium selon l'invention ou à base de soufre selon l'art antérieur

Synthèse du peptide **3**, SEQ ID NO : 1 Ac-GFGQGFGG-OH

La méthode de synthèse de ce peptide est décrite dans le document Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. *Organic letters* **2010**, 12, 5238-41.

Synthèse du peptide **4** : Ac-GFGQGFGG-SeEA



Le peptide **3** (50 mg, 0,07 mmol) et la molécule **1** (30 mg, 0,13 mmol, 2 eq) sont dissous dans V = 3,5 mL de DMF (*N,N*-diméthylformamide) suivi par l'ajout de benzotriazol-1-yloxy-tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphate (PyBOP) (68 mg, 0,14 mmol, 2 eq). De la *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) est alors additionnée (45 µL, 0,28 mmol, 4 eq). Le milieu réactionnel est agité 1,5 heures à température ambiante puis précipité dans un mélange froid d'éther diéthylique/heptane (75 mL, 1:1 v/v), centrifugé, puis dissous dans un minimum d'eau et lyophilisé.

Le peptide **4** brut est purifié directement par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC) (Colonne C18 Nucleosil (d = 1 cm, L = 20 cm, 120 Å, 5 µm), détection UV (λ = 215nm), tampon A : H₂O/TFA (1:0,05% en v/v), tampon B : CH₃CN/H₂O/TFA (4:1:0,05% en v/v/v), gradient : tampon B (0 à 20% en 5 min puis 20 à 42% en 60 min, 6 mL/min)). 15 mg de peptide **4** sont obtenus (Rendement 24 %).

15

Analyse LC-MS Chromatogramme RP-HPLC du peptide 4

LC-MS : Tampon A : H₂O/TFA (1/0,1% v/v), Tampon B : CH₃CN/H₂O/TFA (4/1:0,1% v/v/v).

RP-HPLC sur une colonne C18 Xbridge BEH (300 Å, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm) en utilisant un gradient linéaire 0-100% B en 30 min, débit 1 mL/min, détection UV (λ = 215 nm).

MS : Mode Ionisation Electrospray positif, voltage cône 30V, analyseur quadripolaire.

Les figures 5a et 5b représentent respectivement le chromatogramme et le spectre de masse du peptide **4** après purification.

25

Synthèse du peptide 5 : Ac-GFGQGFGG-SEA

La méthode de synthèse de ce peptide est décrite dans le document Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. *Organic letters* **2010**, *12*, 5238-41.

30

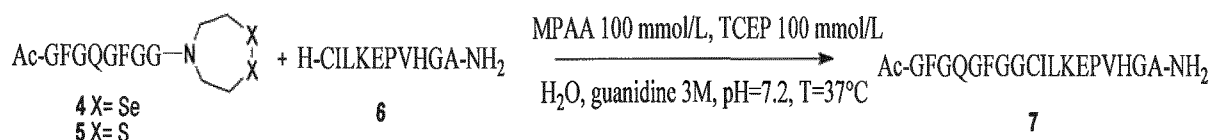
Synthèse du peptide 6, SEQ ID NO : 2 H-CILKEPVHGA-NH₂

La méthode de synthèse de ce peptide est décrite dans le document Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. *Organic letters* **2010**, *12*, 5238-41.

35

Synthèse du peptide 7, SEQ ID NO : 3 Ac-GFGQGFGGCILKEPVHGA-NH₂ par ligation SeEA. Comparaison de la réactivité du peptide 4 Ac-GFGQGFGG-SeEA et du peptide 5 Ac-GFGQGFGG-SEA

5



- 10 a- Cinétique et rendement de ligation du peptide 4 Ac-GFGQGFGG-SeEA avec le peptide 6 H-CILKEPVHGA-NH₂

La ligation SeEA du peptide 4 avec le peptide 6 est réalisée dans une boîte à gant (concentration en dioxygène inférieure à 50 ppm) sous atmosphère d'azote. Une solution de guanidine 3 M est préparée dans un tampon phosphate 0,2M à pH = 7,3.

15 De la tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP, 28,6 mg, 0,1 mmol) et de l'acide 3-mercaptophénylacétique (MPAA, 16,8 mg, 0,1 mmol) sont alors additionnés. Le pH de la solution TCEP/MPAA/Guanidine obtenue est ajusté à pH = 7,2.

Les peptides 4 (4,9 mg, 5 µmol) et 6 (10,6 mg, 7,6 µmol, 1,5 eq) sont dissous dans la solution précédente de TCEP/MPAA/Guanidine (1,5 mL). Le milieu réactionnel est agité 24 h à 37°C.

20

La réaction de ligation terminée, le milieu réactionnel est dilué par de l'eau V = 3 mL puis acidifié par une solution de TFA (10%) V = 1 mL puis le MPAA est extrait à l'éther par 3 fois 6,5 mL.

Le produit de ligation 7 en phase aqueuse est purifié directement par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC) (Colonne C18 Nucleosil (d = 1 cm, L = 20 cm, 120 Å, 5 µm), détection UV (λ = 215 nm), tampon A : H₂O/TFA (1:0,05% en v/v), tampon B : CH₃CN/H₂O/TFA (4:1:0,05% en v/v/v), gradient : tampon B (0 à 20% en 5 min puis 20 à 42% en 60 min, 6 mL/min). 5,6 mg de peptide 7 sont obtenus (Rendement 54 %).

25

30

Analyse LC-MS Chromatogramme RP-HPLC du peptide 7

LC-MS : Tampon A : H₂O/TFA (1/0,1% v/v), Tampon B : CH₃CN/H₂O/TFA (4/1:0,1% v/v/v).

RP-HPLC sur une colonne C18 Xbridge BEH (300 Å, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm) en utilisant un gradient linéaire 0-100% B en 30 min, débit 1 mL/min, détection UV (λ = 215 nm).

35

MS : Mode Ionisation Electrospray positif, voltage cône 30V, analyseur quadripolaire.

Les figures 6a et 6b représentent respectivement le chromatogramme et le spectre de masse du peptide **7** après purification.

5

b- Cinétique de ligation du peptide **5** Ac-GFGQGFGG-SEA avec le peptide **6** H-CILKEPVHGA-NH₂

La réaction de ligation SEA du peptide **5** avec le peptide **6** est réalisée strictement dans les mêmes conditions.

10 *Comparaison des cinétiques*

La figure 7 représente une comparaison des cinétiques de réaction de la ligation pour la formation du peptide **7**, avec un composé à base de sélénium (peptide **4**) selon l'invention, courbe représentée par le symbole ● ou avec un composé à base de soufre (peptide **5**) selon l'état de la technique, courbe représentée par le symbole ▲.

15

La figure 7 montre une vitesse de réaction plus grande pour la réaction de ligation selon l'invention, courbe représentée par le symbole ●.

Exemple 4 : Comparaison des cinétiques de ligation pour les méthodes SeEA, SEA et NCL (chimie des thioesters)

20

*Synthèse du peptide **15a** : H-ILKEPVHGV-SEA*

La méthode de synthèse de ce peptide est décrite dans le document Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. *Organic letters* **2010**, 12, 5238-41.

25 *Synthèse du peptide **15b** : H-ILKEPVHGV-SeEA*

A partir du peptide **15a**, la méthode de synthèse du peptide **15b** est strictement identique à celle utilisée pour la synthèse du peptide **9**.

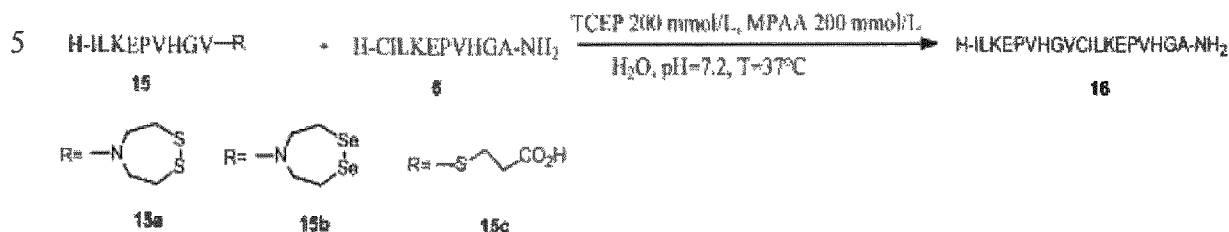
30

*Synthèse du peptide **15c** : H-ILKEPVHGV-MPA (MPA = acide 3-mercaptopropionique)*

La méthode de synthèse de ce peptide est décrite dans le document Dheur, J.; Ollivier, N.; Vallin, A.; Melnyk, O. *Journal of Organic Chemistry* **2010**, 76, 3194-3202.

35

Comparaison des cinétiques de ligation du peptide 15a/15b/15c H-ILKEPVHGV-R avec le peptide 6 H-CILKEPVHGA-NH₂ pour les méthodes de ligations SeEA, SEA et NCL



10 Les différentes ligations du peptide **15a** ou **15b** ou **15c** avec le peptide **6** sont réalisées séparément dans une boîte à gant ([O₂] < 50 ppm) sous atmosphère d'azote. Une solution de TCEP à 200 mmol/L est préparée dans un tampon phosphate 0,1M à pH=7,2. L'acide 3-mercaptopénylacétique (MPAA 33 mg, 0,2 mmol) est alors additionné. Le pH de la solution TCEP/MPAA obtenue est ajusté à pH= 7,2.

15 Les peptides **15a** ou **15b** ou **15c** et **6** (1,5 eq) sont dissous séparément dans la solution précédente de TCEP/MPAA à une concentration de 3 mmol/L. Le milieu réactionnel est agité 24 h à 37°C. La cinétique de formation du produit de ligation **16** est suivie en HPLC.

20 La figure 12 permet la comparaison de la cinétique de réaction de formation du peptide **16** selon la méthode de ligation SeEA, SEA ou NCL (chimie des thioesters).

Dans la figure 12, la courbe symbolisée par ● correspond à la formation du peptide **16** à partir du peptide **15b**, la courbe symbolisée par ■ correspond à la formation du peptide **16** à partir du peptide **15a** et la courbe symbolisée par ♦ correspond à la formation du peptide **16** à partir du peptide **15c**.

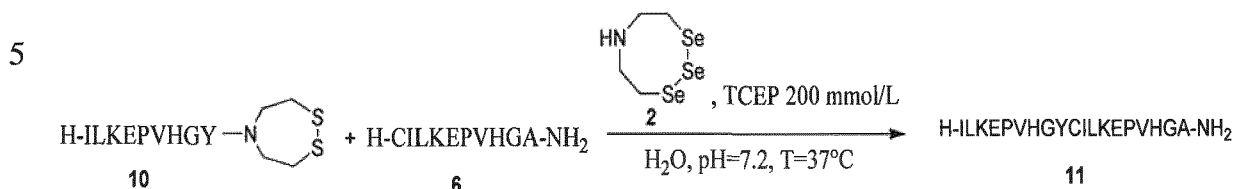
La figure 12 montre une vitesse de réaction de ligation SeEA (courbe symbolisée par ●) supérieure à celle de la méthode NCL (courbe symbolisée par ■), elle-même bien supérieure à celle de la méthode SEA (courbe symbolisée par ♦).

30 Exemple 5 : Formation de segments SeEA in situ par échange et ligation simultanée - Catalyse de la réaction de ligation

11-Synthèse du peptide 10 : H-ILKEPVHGY-SEA

La méthode de synthèse de ce peptide est décrite dans le document Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. *Organic letters* **2010**, *12*, 5238-41.

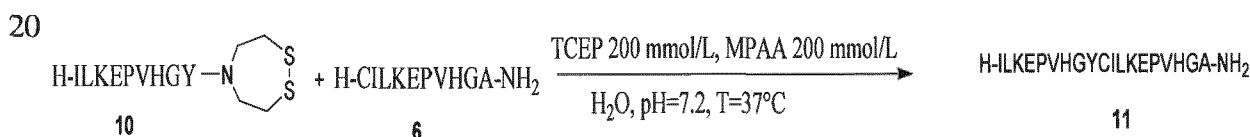
a- Cinétique de ligation du peptide **10** H-ILKEPVHGY-SEA avec le peptide **6** H-CILKEPVHGA-NH₂ en présence du linker **2** Se₃EA pour conduire au peptide **11**, SEQ ID NO : 4 H-ILKEPVHGYCILKEPVHGA-NH₂



10 La ligation SEA du peptide **10** avec le peptide **6** est réalisée dans une boîte à gant (concentration en dioxygène inférieure à 50 ppm) sous atmosphère d'azote. Une solution de TCEP à 200 mmol/L est préparée dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,2.

15 Les peptides **10** (1 mg, 0,6 μmol) et **6** (1,4 mg, 1 μmol, 1,5 eq) ainsi que le linker **2** Se₃EA (5,8 mg, 0,02 mmol, 28 eq) sont dissous dans la solution précédente de TCEP (94 μL). Le milieu réactionnel est agité 24 h à 37°C. La cinétique de formation du produit de ligation **11** est suivie en HPLC.

b- Comparaison de la cinétique de ligation du peptide **10** H-ILKEPVHGY-SEA avec le peptide **6** H-CILKEPVHGA-NH₂ en présence de MPAA



25 La ligation SEA du peptide **10** avec le peptide **6** est réalisée dans une boîte à gant (concentration en dioxygène inférieure à 50 ppm) sous atmosphère d'azote. Une solution de TCEP à 200 mmol/L est préparée dans un tampon phosphate 0,1M à pH 7,2. L'acide 3-mercaptopénylacétique (MPAA 33 mg, 0,2 mmol) est alors additionné. Le pH de la solution TCEP/MPAA obtenue est ajusté à pH= 7,2.

30 Les peptides **10** (1 mg, 5 μmol) et **6** (10,6 mg, 7,6 μmol, 1,5 eq) sont dissous dans la solution précédente de TCEP/MPAA (94 μL). Le milieu réactionnel est agité 24 h à 37°C. La cinétique de formation du produit de ligation **11** est suivie en HPLC.

La figure 8 permet la comparaison de la cinétique de réaction de formation du peptide **11** en présence ou non du composé **2** selon l'invention.

35 Dans la figure 8, la courbe symbolisée par ● correspond à la ligation selon l'invention du peptide **10** en présence du composé sélénié **2** et la courbe symbolisée par ▲ correspond à la ligation selon l'art antérieur du peptide **10** sans composé sélénié mais en présence de MPAA.

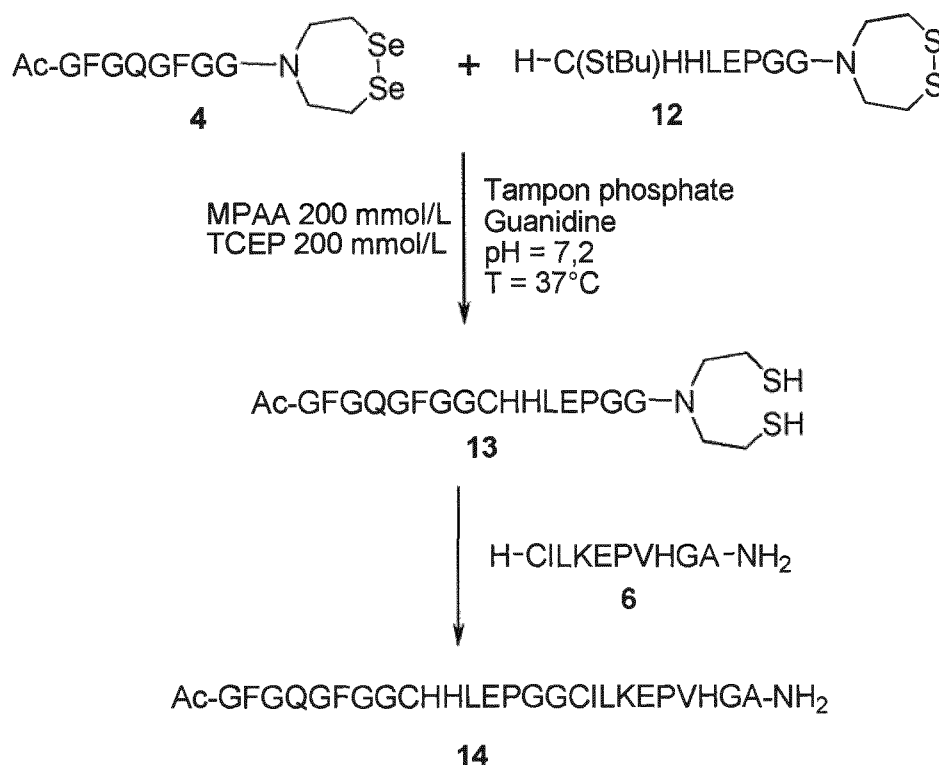
La figure 8 montre une vitesse de réaction plus élevée lorsque le composé **2** est présent.

Exemple 6 : Ligation séquentielle en one-pot de trois segments à l'aide des ligations SeEA et SEA

*Synthèse du peptide **12** : H-C(StBu)HHLEPGG-SEA*

La méthode de synthèse de ce peptide est décrite dans le document Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. *Organic letters* **2010**, *12*, 5238-41.

*Synthèse du peptide **14**, SEQ ID NO : 5 Ac-GFGQGFGG-CHHLEPGG-CILKEPVHGA-NH₂ par ligation des segments **4** Ac-GFGQGFGG-SeEA , **12** H-C(StBu)HHLEPGG-SEA et **6** H-CILKEPVHGA-NH₂*



- Etape 1

Le chlorhydrate de guanidine (Gdn,HCl, 573,18 mg, 6 mmol) est dissous dans du tampon phosphate 0,1 M pH=7,3 (1 mL final, 6M).

L'acide 4-mercaptophénylacétique (MPAA, 33,83 mg, 0,2 mmol) et le chlorhydrate de *tris*(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP,HCl, 57,37 mg, 0,2 mmol) sont

dissous dans cette solution (1 mL). 6M NaOH est ajouté pour ajuster le pH de la solution à 7,37.

Les peptides **4** Ac-GFGQGFGG-SeEA (5,33 mg, 5,4 μ mol) et **12** H-C(StBu)HHLEPGG-SEA (7,59 mg, 5,4 μ mol) sont dissous ensemble dans la solution
5 précédente (780 μ L). Le milieu réactionnel est placé dans un bain thermostaté à 37°C sous atmosphère inerte.

La ligation est suivie par RP-HPLC sur une colonne C18 Xbridge BEH (4,6 x 250 mm, 300 Å, 5 μ m) (215 nm, 1 mL/min, 30°C, tampon A eau contenant 0,1% TFA, tampon B CH₃CN/eau 4/1 contenant 0,1% TFA, 0-100% B en 30 min). Pour
10 cela, un aliquot (2 μ L) de milieu réactionnel est acidifié avec 10% TFA aqueux, extrait avec Et₂O pour éliminer MPAA avant l'analyse.

On obtient de cette façon le peptide **13** Ac-GFGQGFGG-CHHLEPGG-SEA en solution.

Les figures 9a et 9b représentent respectivement le chromatogramme et le
15 spectre de masse du peptide **13**.

- Etape 2

Après 4 h 35 de réaction, le peptide **6** H-CILKEPVHGA-NH₂ (11,06 mg, 8,1 μ mol) est ajouté solide au milieu réactionnel. La réaction est placée à 37°C sous atmosphère
20 inerte.

La ligation est suivie par RP-HPLC sur une colonne C18 Xbridge BEH (4,6 x 250 mm, 300 Å, 5 μ m) (215 nm, 1 mL/min, 30°C, tampon A eau contenant 0,1% TFA, tampon B CH₃CN/eau 4/1 contenant 0,1% TFA, 0-100% B en 30 min). Pour cela, un
25 aliquot (2 μ L) de milieu réactionnel est acidifié avec 10% TFA aqueux, extrait avec Et₂O pour éliminer MPAA avant l'analyse.

Lorsque la réaction est complète, le milieu réactionnel est dilué avec de l'eau (4 mL) et du TFA 10% aqueux (1 mL) est additionné. Après 4 extractions avec Et₂O (4 x 4 mL), la phase aqueuse est dégazée pendant 2 minutes par bullage d'argon. Après purification par RP-HPLC sur une colonne C18 nucléosil 120 Å, 5 μ m (215 nm, 6
30 mL/min, tampon A eau contenant 0,05% TFA, tampon B CH₃CN/water 4/1 contenant 0,05% TFA, 0-10% B en 5 min, puis 10-100% B en 150 min), on obtient 6 mg (36%) de peptide **14** Ac-GFGQGFGG-CHHLEPGG-CILKEPVHGA-NH₂.

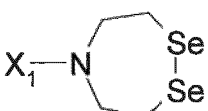
Les figures 10a et 10b représentent respectivement le chromatogramme et le spectre de masse du composé **14** avant purification.

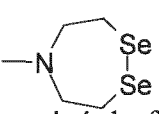
35 Les figures 11a et 11b représentent respectivement le chromatogramme et le spectre de masse du composé **14** après purification.

REVENDICATIONS

1. Peptide fonctionnalisé choisi parmi :

5 a) le peptide de formule (I) : $X_1-N(CH_2CH_2SeH)_2$; ou

b) le peptide de formule (I') : X_1-N  ;

10 dans lesquels X_1 représente un fragment peptidique et le groupement $-N(CH_2CH_2SeH)_2$ ou  forme une liaison amide avec la terminaison $C=O$ du résidu d'acide aminé du fragment peptidique X_1 qui est en position C-terminale.

15 2. Peptide fonctionnalisé selon la revendication 1, dans lequel X_1 comprend de 2 à 300 résidus d'acides aminés, de préférence de 5 à 100 résidus d'acides aminés, de manière plus particulièrement préférée de 8 à 50 résidus d'acides aminés.

20 3. Procédé d'obtention d'un peptide fonctionnalisé selon la revendication 1 ou selon la revendication 2, comprenant les étapes a1 et b1 suivantes :

a1) synthèse peptidique pour fournir un polypeptide de formule (II) :

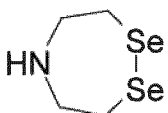
(II) X_1-OH

25 comportant de préférence des groupements protecteurs sur ses fonctions amines et acides carboxyliques, à l'exception de sa fonction acide carboxylique C-terminale,

b1) fonctionnalisation du polypeptide obtenu à l'étape a) comprenant :

— la réaction du polypeptide de formule (II) avec un composé amine choisi parmi :

(IIIa) $NH(CH_2-CH_2-Se-G_1)_2$

30 (III') 

dans laquelle G_1 représente un groupement protecteur du sélénium ou un atome d'hydrogène,

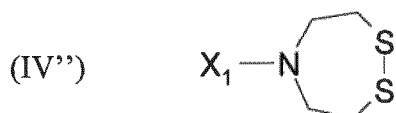
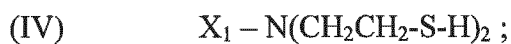
35 en phase liquide, pour former le polypeptide de formule (Ia) $X_1-N(CH_2CH_2-Se-G_1)_2$, ou (I') ;

- éventuellement la déprotection du polypeptide de formule (Ia) pour conduire au composé de formule (I),

ou les étapes a2 et b2 suivantes

a2) l'utilisation

- 5 - du composé de formule (IV) ou (IV'') :

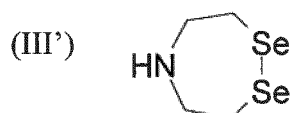


ou

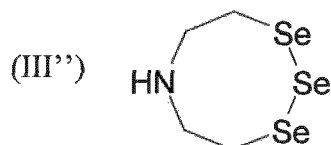
- 10 - d'un peptide fonctionnalisé par un groupement porteur d'une fonction thioester (IV') = $X_1 - SR$ et R représente un groupement alkyle ou aryle éventuellement substitué,

b2) la réaction entre le composé de formule (IV) ou (IV'') ou le composé de formule (IV') avec le composé amine de formule (III') ou (III'') :

15

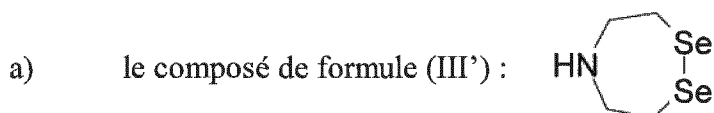


20

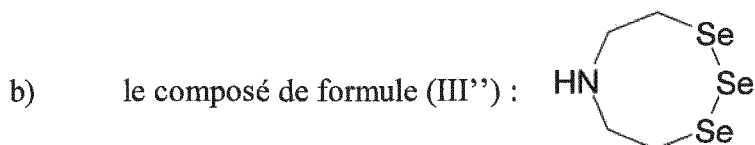


en phase liquide, pour former le peptide de formule (I) ou (I').

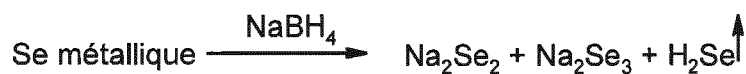
- 25 4. Composé susceptible d'être utilisé dans le procédé selon la revendication 3 choisi parmi :



30

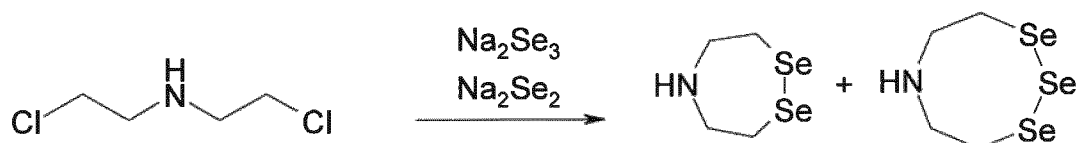


- 35 5. Procédé de fabrication des composés de formules (III') et (III'') selon la revendication 4, comprenant la réaction suivante de traitement par un hydrure métallique $NaBH_4$, $LiBH_4$, ou $LiAlH_4$:



suivie de la réaction :

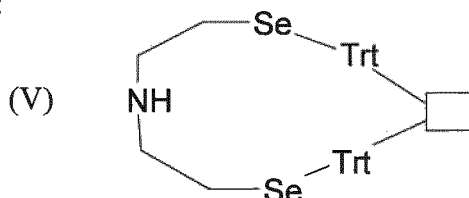
5



10 6. Procédé d'obtention d'un peptide selon la revendication 1 ou 2, comprenant les étapes suivantes :

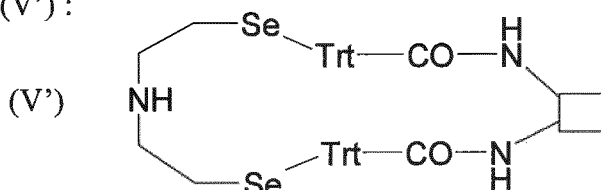
a) Fourniture d'une résine polymère fonctionnalisée présentant la structure (V) :

15



Ou la structure (V') :

20



dans lesquelles,

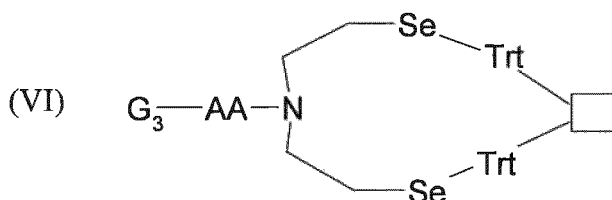
□ représente un support solide,

Trt représente un groupement triphénylméthyle éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants, notamment choisi parmi les substituants chlore, méthoxy, méthyle, fluor et cyano.

25

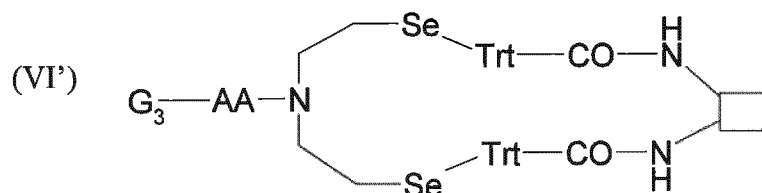
b) Greffage d'un acide aminé sur la résine polymère fonctionnalisée obtenue à l'étape a) pour conduire au composé de structure (VI) :

30



Ou de structure (VI') :

35



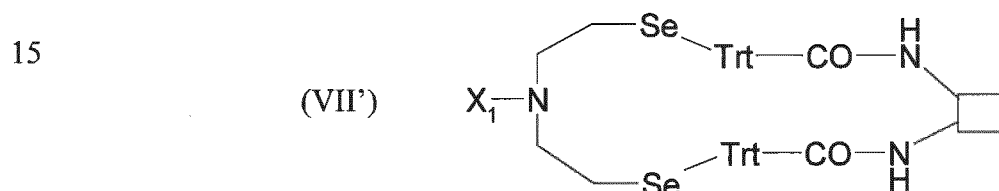
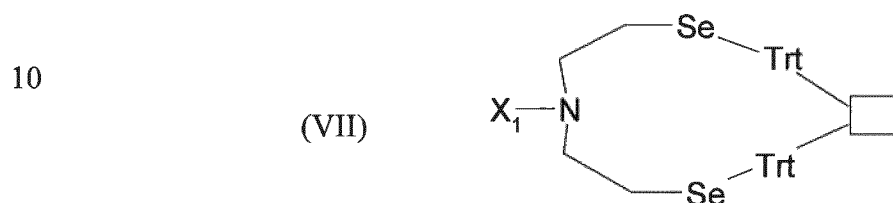
dans lesquelles,

$\square$ et Trt ont la même signification que dans le composé (V) ou (V'),

AA représente un résidu d'acide aminé comportant éventuellement un ou plusieurs groupements protecteurs ;

5 G_3 représente un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur de la fonction amine N-terminale de AA,

c) Synthèse peptidique à partir de l'acide aminé AA pour conduire au composé (VII) ou (VII') :



dans lesquelles,

20 $\square$ représente un support solide,

Trt représente un groupement triphénylméthyle éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants, notamment choisi parmi les substituants chlore, méthoxy, méthyle, fluor et cyano,

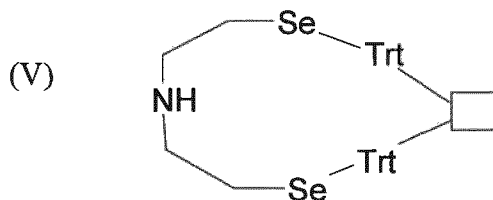
X_1 représente un fragment peptidique,

25 d) Coupure de la liaison entre Trt et Se pour conduire au composé (I) ou (I').

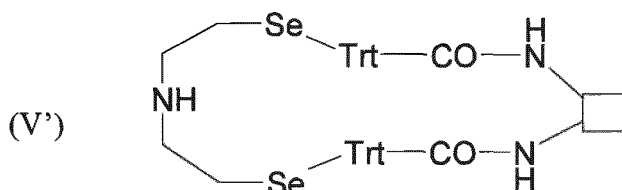
7. Procédé selon la revendication 6, dans lequel le greffage d'un acide aminé sur la résine polymère comprend la mise en présence de la résine fonctionnalisée (V) ou (V') avec un halogénure d'acide aminé ou avec un acide aminé et un agent d'activation, choisi de préférence parmi l'HATU, le PyBOP, le BOP, le PyBROP, de manière plus particulièrement préférée l'HATU.

8. Résine polymère fonctionnalisée susceptible d'être utilisée dans le procédé selon la revendication 6 ou 7, présentant la structure (V) :

46



Ou la structure (V') :

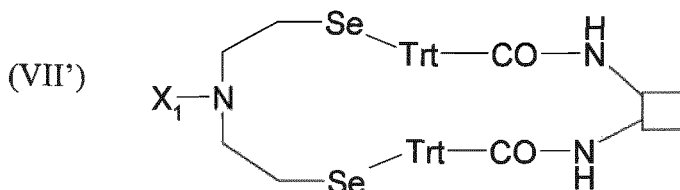
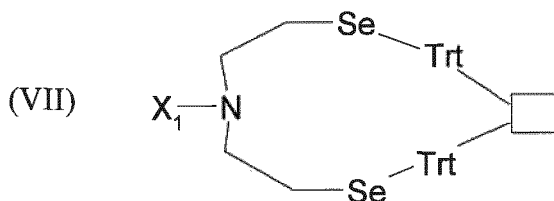


dans lesquelles,

□ représente un support solide,

Trt représente un groupement triphénylméthyle éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants, notamment choisi parmi les substituants chlore, méthoxy, méthyle, fluor et cyano.

9. Résine polymère comprenant un fragment peptidique répondant à la formule (VII) ou (VII') :



dans lesquelles,

□ représente un support solide,

Trt représente un groupement triphénylméthyle éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants, notamment choisi parmi les substituants chlore, méthoxy, méthyle, fluor et cyano,

X₁ représente un fragment peptidique.

10. Résine polymère selon la revendication 8 ou 9, dans laquelle le support solide □ est choisi parmi un polystyrène, un polyacrylamide, un polyéthylèneglycol, une cellulose, un polyéthylène, un polyester, un latex, un polyamide, un polydiméthylacrylamide, un copolymère polyéthylèneglycol-polystyrène, un copolymère polyéthylèneglycol-polyacrylamide et leurs dérivés.

11. Procédé de fabrication de la résine polymère selon l'une des revendications 8 à 10, comprenant :

- 5 a) la fourniture d'un support solide fonctionnalisé par des groupements -Trt ou -NH-CO-Trt ;
 b) réaction de la fonction Trt du support solide avec le composé amine de formule (III) : $\text{NH}(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Se-H})_2$
 Trt ayant la même définition que dans les revendications 8 à 10.

10 12. Procédé de fabrication d'un polypeptide de formule (VIII) :



dans lequel,

$\text{X}_1, \text{X}_2, \dots, \text{X}_i, \dots, \text{X}_n$ sont des fragments peptidiques,

15 $\text{C}_1, \text{C}_2, \dots, \text{C}_{i-1}, \dots, \text{C}_{n-1}$ sont des résidus d'acides aminés portant une fonction thiol ou sélénol,

n est un entier supérieur ou égal à 2,

i est un nombre entier quelconque allant de 1 à n ,

ce procédé comprenant une ou plusieurs étapes de réaction entre un composé de formule (IX_i) :



dans laquelle,

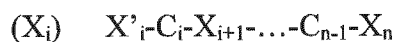
X'_1 représente X_1

X'_i représente $\text{C}_{i-1}\text{-X}_i$ pour $i > 1$

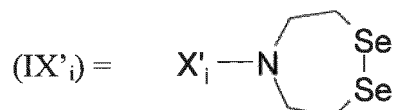
et un composé de formule (X_{i+1}) :



pour former un composé de formule (X_i) :



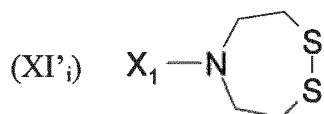
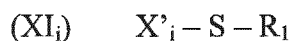
30 13. Procédé selon la revendication 12, dans lequel le composé (IX_i) est formé à partir du composé (IX'_i) :



par la mise en présence d'au moins un composé réducteur des liaisons disélénium.

35

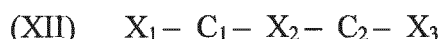
14. Procédé selon la revendication 13, dans lequel le composé (IX'_i) est obtenu par réaction entre un composé de formule (XI_i) , (XI'_i) ou (XI''_i) :



dans lesquelles X'_i est un fragment peptidique de la forme $C_{i-1}-X_i$ pour $i > 1$ et X'_1 représente X_1 , R_1 représente un groupement alkyle ou un groupement aryle éventuellement substitué,

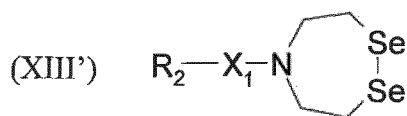
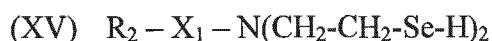
et un composé de formule (III') ou de formule (III'') selon la revendication 4.

15. Procédé selon la revendication 13 ou 14, pour la fabrication d'un polypeptide représenté par la formule (XII) :

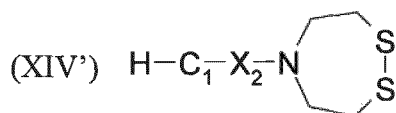
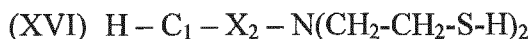


comprenant les étapes suivantes :

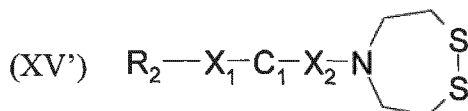
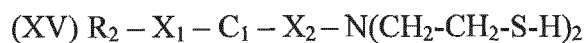
a) réaction entre un composé de formule (XIII) ou (XIII') :



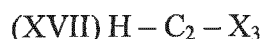
et un composé de formule (XIV) ou (XIV') :



pour former le composé de formule (XV) ou (XV') :



b) réaction entre un composé de formule (XV) ou (XV') et un polypeptide de formule (XVI) :



pour former le composé de formule (XII),

dans lesquelles, R_2 représente H ou un groupement protecteur de la fonction N-terminale de X_1 ; X_1 , X_2 , X_3 représentent, indépendamment les uns des autres,

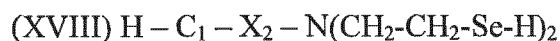
des fragments peptidiques ; C_1 et C_2 représentent, indépendamment l'un de l'autre, des résidus d'acides aminés porteurs d'une fonction thiol ou sélénol.

16. Procédé de fabrication d'un polypeptide cyclique de formule (XVII) :



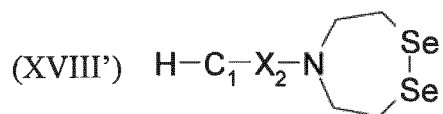
X_2 représentant un fragment peptidique, et C_1 représentant un résidu d'acide aminé comportant une fonction thiol ou sélénol,

ledit procédé comprenant au moins une étape de réaction de ligation d'un
10 polypeptide de formule (XVIII) :



avec lui-même.

17. Procédé selon la revendication 16, dans lequel la réaction de ligation est effectuée
15 en mettant en contact un polypeptide de formule (XVIII') :



avec au moins un composé réducteur des liaisons disélénium.

20

18. Kit de synthèse de polypeptides comprenant un ou plusieurs peptides de formules (IX_i) ou (IX'_i) susceptibles d'être utilisés dans le procédé selon la revendication 12 ou 13, ou au moins un composé selon la revendication 4.