



(51) Classification internationale des brevets :
C07K 1/00 (2006.01) C07K 1/107 (2006.01)
C07K 1/02 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2012/052548

(22) Date de dépôt international :
15 février 2012 (15.02.2012)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1151279 16 février 2011 (16.02.2011) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MELNYK, Oleg [FR/—]; 13, impasse Delecourt, F-59112 Annoeullin (FR). OLLIVIER, Nathalie [FR/—]; 2, allée des Cèdres, Parc de Beaumont, F-59100 Roubaix (FR). MHIDIA, Reda [MA/—]; 3, rue du Poitou, F-59370 Mons en Baroeul (FR). DHEUR, Julien [FR/—]; 21, rue de Lens, F-59480 La Bassée (FR).

(74) Mandataire : HIRSCH & ASSOCIES; 58, avenue Marceau, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : METHOD FOR PREPARING PEPTIDES BY ASSEMBLING MULTIPLE PEPTIDE FRAGMENTS

(54) Titre : PROCÉDE DE PREPARATION DE PEPTIDES PAR ASSEMBLAGE DE MULTIPLES FRAGMENTS PEPTIDIQUES

(57) Abstract : The invention relates to a method for preparing a peptide assembly of n fragments and of n-1 amino acids having a thiol function, which is represented by formula (I): $A_1-C_1-A_2-A_3-...-C_{i-1}-A_i-...-C_{n-1}-A_n$, where $A_1, A_2, A_3... A_i... A_n$ are peptide fragments, $C_1, C_2, C_3... C_{i-1} C_{n-1}$ are amino acid residues having a thiol function, n is between 3 and 50, and i is 2 to n, said method comprising preparing a peptide thioester of the formula A_1SEa (II), where A_1 is a peptide fragment and SR is the residue of an alkylated thioester, R being optionally substituted alkyl from a bis(2-sulfanylethyl)amino peptide: $A_1-SEAoff$, where SEAoff is a cyclic bis(2-sulfanylethyl)amino group, by means of a thiol R-SH, in the presence of a cyclic disulfide reducer, followed by condensing on a peptide fragment having the structure: $H-C_1(SR')-A_2-SEAoff$ (III), where (SR') is a disulfide residue, on the thiol of the C_1 amino acid, in the presence of an aromatic thiol ArSH, then converting the resultant novel peptide, having the structure $A_1-C_1-A_2-SEAoff$ (IV), into a peptide-thioester of formula $A_1-C_1-A_2-SR$ (III') by means of a thiol R-SH, in the presence of a cyclic disulfide reducing agent, and condensing on a peptide fragment having the structure $H-C_2(SR')-A_3-SEAoff$ (III') in the presence of an aromatic thiol ArSH, which yields a peptide fragment having the structure $A_1-C_1-A_2-C_2-A_3-SEAoff$ (IV), and repeating both of said steps up to n-2 times, so as to obtain a peptide fragment having the structure $A_1-C_1-A_2-C_2-A_3-...-C_{i-1}-A_i-...-C_{n-2}-A_{n-1}-SEAoff$ (IV^m), then using a native ligation reaction of said resulting peptide fragment (IV^m) with a peptide of formula $H-C_{n-1}-A_n$ (Vⁿ) by reducing in the presence of a cyclic disulfide reducing agent, which yields the multiple peptide assembly of general formula (I).

(57) Abrégé : Procédé de préparation d'un assemblage peptidique de n fragments et de n-1 acides aminés portant une fonction thiol, représenté par la formule (I) : $A_1-C_1-A_2-A_3-...-C_{i-1}-A_i-...-C_{n-1}-A_n$ dans laquelle $A_1, A_2, A_3... A_i... A_n$ sont des fragments peptidiques, $C_1, C_2, C_3... C_{i-1}... C_{n-1}$ sont des restes d'acides aminés portant une fonction

[Suite sur la page suivante]



WO 2012/110536 A1



thiol, n est compris entre 3 et 50, et i est 2 à n , dans lequel on prépare un peptide-thioester de formule : A_1SR (I I) dans laquelle A_1 est un fragment peptidique et SR est le reste d'un thioester alkylé, R étant alkyle éventuellement substitué, à partir d'un bis(2-sulfanyléthyl)amino peptide : $A_1-SEAoff$ dans laquelle $SEAoff$ est groupement bis(2-sulfanyléthyl)amino cyclique, par action d'un thiol $R-SH$, en présence d'un réducteur de disulfures cycliques, suivie de la condensation sur un fragment peptidique de structure : $H-C_1(SR')-A_2-SEAoff$ (III) dans laquelle (SR') représente un reste disulfure sur le thiol de l'acide-amino C_1 , en présence d'un thiol aromatique $ArSH$, puis transforme le nouveau peptide obtenu, de structure : $A_1-C_1-A_2-SEAoff$ (IV), en un peptide-thioester de formule : $A_1-C_1-A_2-SR$ (II'), par action d'un thiol $R-SH$, en présence d'un agent réducteur de disulfures cycliques, et condense sur un fragment peptidique de structure $H-C_2(SR')-A_3-SEAoff$ (III') en présence d'un thiol aromatique $ArSH$, pour donner un fragment peptidique, de structure $A_1-C_1-A_2-C_2-A_3-SEAoff$ (IV') et réitère ces 2 opérations jusqu'à $n-2$ fois, pour obtenir un fragment peptidique de structure $A_1-C_1-A_2-C_2-A_3-...-C_{i-1}-A_i-...-C_{n-2}-A_{n-1}-SEAoff$ (IV^m), puis met en œuvre une réaction de ligation native de ce fragment peptidique (IV^m) obtenu, avec un peptide de formule : $H-C_{n-1}-A_n$ (Vⁿ) par réduction en présence d'un agent réducteur de disulfures cycliques, pour donner l'assemblage peptidique multiple de formule générale (I).