

METHODE DE PRODUCTION DE PEPTIDES OU PROTEINES OU PEPTIDOMIMETIQUES

Domaine technique de l'invention

- 5 La présente invention concerne la chimie des peptides ou protéines ou peptidomimétiques, et plus particulièrement leurs synthèses par voie chimique à partir de molécules bifonctionnelles, et en particulier d'acides α , β ou γ -aminés et/ou acides α , β ou γ -hydroxylés et/ou α , β ou γ -mercapto acides.
- Plus précisément, l'invention concerne un procédé de production de peptides ou protéines
10 ou peptidomimétiques en solution. Ce procédé n'utilise pas de groupements protecteurs classiques tels que le *tert*-butoxycarbonyl (Boc) ou le fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc) sur la fonction amine de l'acide α , β , ou γ -aminé. De même, il n'est pas nécessaire d'utiliser des groupements protecteurs sur la fonction hydroxyle de l'acide α , β , ou γ -hydroxylé, ou sur la fonction thiol de l' α , β , ou γ -mercapto acide.
- 15 Ce procédé est basé sur l'utilisation d'acides α , β , ou γ -aminés ou acides α , β , ou γ -hydroxylés ou α , β , ou γ -mercapto acides activés sous la forme, respectivement, de 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazolidin-5-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazinan-6-one, ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazépan-7-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxolan-4-one, ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxan-4-one, ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxépan-4-one, ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathiolan-5-one, ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathian-6-one, ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathiépan-7-one ou leurs dérivés et d'une
20 famille de molécules d'ancrage, à savoir des dérivés de polyoléfines ou oligomères de polyoléfines ou polycènes. La molécule d'ancrage est liée à une molécule ayant au moins deux groupement fonctionnels électrophile et/ou nucléophile, et notamment à un
25 premier acide α , β , ou γ -aminé ou acide α , β , ou γ -hydroxylé ou α , β , ou γ -mercapto acide, qui fera ensuite l'objet d'étapes d'élongation/itération successives pour conduire aux peptides ou protéines ou peptidomimétiques.
- Ce procédé permet d'obtenir des peptides ou protéines ou peptidomimétiques de façon plus efficiente (c'est-à-dire avec un nombre d'étapes réduit), plus rapide, plus purs ou plus
30 faciles à purifier que les procédés sur support solide ou en solution actuels. Il est facile à automatiser.

Etat de la technique

- La croissance remarquable du développement des peptides ou protéines ou
35 peptidomimétiques thérapeutiques au cours de la dernière décennie a conduit à un grand nombre d'approbations de nouvelles molécules sur le marché (voir les publications de J. Med. Chem., 2018, 22, 1382-1414, Bioorg. Med. Chem., 2018, 26, 2700-2707) ; ainsi la thérapie à base de peptides ou protéines ou peptidomimétiques est devenue l'un des

segments les plus dynamiques dans l'industrie pharmaceutique. Les cancers, les maladies métaboliques et les maladies du système nerveux central sont les principales aires thérapeutiques accélérant la demande en nouveaux peptides ou protéines ou peptidomimétiques thérapeutiques.

- 5 Cependant, un certain nombre de verrous empêchent l'adoption généralisée des peptides, ou protéines ou peptidomimétiques en thérapie. On peut citer par exemple leur courte demi-vie métabolique et leur nature hydrophile. Un autre facteur clé, et de loin le plus important, retardant la croissance des applications thérapeutiques des peptides ou protéines ou peptidomimétiques est leur mode de production.
- 10 La toute première synthèse peptidique en phase liquide a été réalisée il y a plus d'un siècle par E. Fisher et E. Fourneau (Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1901, 34, 2868-2879). Dès lors, de nombreux chimistes ont apporté des améliorations ; c'est le cas de Bodansky et du Vigneaud (J. Am. Chem. Soc., 1959, 51, 5688-5691), de Beyerman et al. (Rec. Trav. Chim., Pays Bas 1973, 92, 481-492), de R. K. Sharma et R. Jain (Synlett 2007, 603-606),
- 15 de Nodal et al. (Nature Chemistry 2017, 9, 571-577), de Liu et al. (Org. Lett., 2018, 20, 612-615) et de Muramatsu et al. (ACS Catal., 2018, 8, 2181-2187).

Les voies de synthèse de peptides ou protéines ou peptidomimétiques les plus fréquemment utilisées font intervenir une protection temporaire de la fonction amine ($N\alpha$) des acides aminés. Aujourd'hui, les principaux groupements protecteurs utilisés sont le

20 groupement *tert*-butoxycarbonyl, cette approche est appelée couramment la stratégie « Boc », et le groupement fluorénylméthoxycarbonyl, cette approche est appelée couramment la stratégie « Fmoc ». Ces deux voies de synthèse de peptides sont connues de l'homme du métier (voir la Section 7-5 du manuel « *Biochimie* » de D. Voet et J.G. Voet, 2^{ème} édition, Bruxelles 2005). En pratique, les acides aminés sont

25 approvisionnés à l'état protégé sur la fonction amine ($N\alpha$) par le groupement Fmoc ou Boc, et sont engagés directement dans les réactions d'activation/couplage.

Les acides aminés peuvent être mis en œuvre en phase liquide ou sur support solide ; dans ce dernier cas l'acide aminé protégé sur la fonction amine ($N\alpha$) est fixé sur une résine insoluble dans les solvants organiques, c'est la synthèse de Merrifield (J. Am.

30 Chem. Soc., 1963, 85, 2149-2154). C'est un procédé bien maîtrisé, qui présente cependant quelques inconvénients tels que : le coût des réactifs utilisés en excès et le manque d'homogénéité des peptides synthétisés. On dit que le système est dégénéré, ce qui engendre des surcoûts de purifications par chromatographie en phase liquide à haute performance préparative.

- 35 Lors de la Synthèse Peptidique en Phase Liquide (SPPL), toutes les réactions ont lieu en solution homogène. Cette méthodologie a été décrite par Bodansky et du Vigneaud (J. Am. Chem. Soc., 1959, 51, 5688-5691). La fonction acide carboxylique (C-terminal) de

- l'acide aminé de départ est protégée sous forme d'un ester méthylique, et les acides aminés suivants sont condensés successivement après la protection de leur fonction amine ($N\alpha$) par un groupement carboxybenzyle (abrégé Cbz) puis l'activation de leur fonction acide carboxylique (C-terminal) par un ester nitrophénylique. Tous les
- 5 intermédiaires synthétiques sont purifiés par précipitation ou lavage à l'eau (extraction). Cette méthodologie de synthèse peptidique est longue, fastidieuse et génère des peptides avec de faibles rendements. A titre d'exemple, on peut citer la synthèse de l'ACTH avec un rendement global d'environ 7 %, décrite par Schwyzner et Sieber (Helv. Chim. Acta 1966, 49, 134-158).
- 10 Une modification de cette méthodologie a été rapportée par Beyerman et al. (Rec. Trav. Chim. Pays Bas 1973, 92, 481-492). Elle consiste à protéger la fonction acide carboxylique (C-terminal) d'un acide aminé ou d'un peptide sous la forme d'un ester benzylique et de réaliser la réaction de couplage (ou condensation) en présence d'un excès d'anhydride d'acide aminé $N\alpha$ -protégé, dans l'optique d'améliorer les rendements.
- 15 Finalement, bien que les rendements des réactions de couplage soient augmentés, on constate une perte de solubilité du peptide en phase organique lorsque celui-ci atteint environ cinq acides aminés.

D'autres stratégies permettant la solubilisation des acides aminés, afin de faciliter la

20 synthèse peptidique, ont été développées. On peut citer les travaux de Narita (Bull. Chem. Soc. Jap., 1978, 51, 1477-1480), les travaux de Bayer et Mutter (Nature 1972, 237, 512-513) sur le polyéthylèneglycol comme adjuvant de solubilisation, et les brevets EP 0 017 536 (Sanofi) et EP 2 612 845 A1 et US 2014/0296483 (Ajinomoto Co., Inc.) sur des molécules d'ancrage solubilisantes.

- 25 On connaît également des stratégies de synthèse de peptides faisant appel à des groupements bifonctionnels, c'est-à-dire des groupements qui sont capables simultanément d'activer la fonction acide carboxylique (C-terminal) et de protéger la fonction amine ($N\alpha$) de l'acide aminé, en formant des structures cycliques intermédiaires
- 30 hautement réactives. C'est le cas des N-carboxyanhydrides (abrégés NCAs) (voir Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1906, 39, 857-861; Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1907, 40, 3235-3249; Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1908, 41, 1721-172; J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 2153-2159; J. Am. Chem. Soc., 1947, 69, 1551-1552). Des intermédiaires réactifs ont été synthétisés à
- 35 partir d'acides aminés et de dérivés de dichlorodiméthylsilanes (voir S.H. van Leeuwen et al., Tetrahedron Letters 2002, 43, 9203-9207 et le brevet WO 00/37484 A1). Des dérivés d'acides aminés activés par le trifluorure de bore étherate ont été inventés pour la synthèse de peptides (voir S.H. van Leeuwen et al., Tetrahedron Letters 2005, 46, 653-

656). L'activation des acides aminés en présence d'hexafluoroacétone a aussi été décrite (voir Chem. Ztg., 1990, 114, 249-251 et J. Spengler et al., Chem. Rev., 2006, 106, 4728-4746).

- Toutes ces méthodes de synthèse de peptides ou protéines ou peptidomimétiques, en solution ou sur support solide, ont au moins un ou plusieurs désavantages parmi les suivants : l'utilisation de groupements protecteurs, l'utilisation de réactifs en excès, la possibilité de racémisation, la faible solubilité des peptides en cours de synthèse dans les solvants organiques, la limitation de la taille du peptide, des purifications onéreuses et polluantes, des protocoles expérimentaux complexes ou la possibilité de polymérisation.
- 5 D'une manière globale, l'examen de l'abondante littérature disponible dans le domaine de la synthèse peptidique montre que des difficultés persistent pour produire des peptides ou protéines ou peptidomimétiques de haute pureté, avec de bons rendements, à faible coût et avec une moindre empreinte écologique.

- 15 Le problème que la présente demande se propose de résoudre est la conception d'une nouvelle méthodologie de synthèse de peptides ou protéines ou peptidomimétiques permettant de lever les verrous liés à leur accès ou production laissés dans l'art antérieur.

Objet de l'invention

- 20 Selon l'invention, le problème est résolu par un procédé de synthèse de peptides ou protéines ou peptidomimétiques en phase liquide qui comporte la combinaison de deux caractéristiques essentielles qui sont détaillées ci-dessous.

- Le premier objet de la présente invention est un procédé de synthèse de peptides ou protéines ou peptidomimétiques par élongation successive de la deuxième extrémité d'une molécule de type $Q^a - E - Q^b$, où Q^a et Q^b peuvent être identiques ou différents et représentent une fonction électrophile et/ou nucléophile, et E représente un espaceur.
- 25 Ladite deuxième extrémité peut notamment être une amine primaire ou secondaire, un hydroxyle ou un thiol, d'un acide α, β, γ ou δ -aminé ou acide α, β, γ ou δ -hydroxylé ou α, β, γ ou δ -mercapto acide ou peptide ou protéine ou peptidomimétique, caractérisé en ce que lesdites unités sont sélectionnées dans le groupe formé par : les acides α, β, γ ou δ -aminés ou acides α, β, γ ou δ -hydroxylés ou α, β, γ ou δ -mercapto acides (naturels ou non naturels ou synthétiques). De plus, la première extrémité de ladite molécule de type $Q^a - E - Q^b$ (par exemple dudit acide α, β, γ ou δ -aminé ou acide α, β, γ ou δ -hydroxylé ou α, β, γ ou δ -mercapto acide) ou dudit peptide ou protéine ou peptidomimétique est fixée
- 30 sur une molécule d'ancrage soluble dans des solvants organiques tels que les solvants halogénés (chlorure de méthylène, chloroforme), l'acétate d'éthyle, le tétrahydrofurane, le 2-méthyletétrahydrofurane, l'isooctane, le cyclohexane, l'hexane(s), le

méthylcyclohexane, le méthyl tert-butyl éther ou des solvants aromatiques tels que le benzène ou le toluène ou tout autre solvant adéquat.

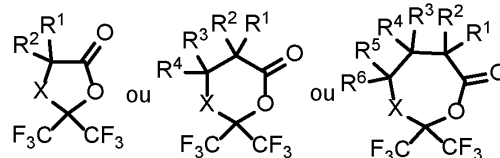
La première caractéristique essentielle est l'utilisation d'une famille de molécules d'ancrage spécifique. Selon l'invention les molécules d'ancrage sont des polyoléfines ou oligomères de polyoléfines ou polyalcènes. Le procédé selon l'invention permet d'accéder à des peptides ou protéines ou peptidomimétiques (naturels ou non naturels ou synthétiques) de haute pureté. Ce procédé engendre des économies d'étapes et d'atomes du fait de l'absence de l'usage de groupements protecteurs (sur les fonctions amines, hydroxyles ou thiols de la chaîne principale) et d'agents de couplage et de ce fait, des économies financières. Au final, le procédé est plus respectueux de l'environnement.

La deuxième caractéristique essentielle est l'utilisation de molécules bifonctionnelles de type $Q^a - E - Q^b$ dans lesquelles les groupes Q^a et Q^b peuvent être identiques ou différents, et sont sélectionnés parmi les groupes électrophiles et/ou les groupes nucléophiles, et E représente un espaceur. De manière avantageuse, Q^a et Q^b sont sélectionnés dans le groupe formé par les fonctions chimiques telles que : alcools, aldéhydes, amines primaires, amines secondaires, azides, éthylnes, halogènes, thiols, vinylnes, et/ou l'espaceur E est sélectionné dans le groupe formé par les motifs structuraux tels que : aromatiques, hétéroaromatiques, chaînes alkyles saturées (ramifiées ou non), chaînes alkyles insaturées (ramifiées ou non), les glycols (et de préférence le polyéthylène glycol).

Dans le cas avantageux où l'on utilise comme molécule bifonctionnelle de type $Q^a - E - Q^b$, un acide α, β ou γ -aminé ou un acide α, β ou γ -hydroxylé ou un α, β ou γ -mercapto acide, ces composés sont utilisés sous leurs formes activées, à savoir, de 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazolidin-5-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazinan-6-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazépan-7-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxolan-4-ones ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxépan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathiolan-5-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathian-6-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathiépan-7-one ou leurs dérivés.

Le schéma n° 1 montre la structure de ces formes activées. Ces derniers sont préparés à partir des acides α, β ou γ -aminés (cette expression signifiant ici : acides α -aminés, acides β -aminés ou acides γ -aminés), ou acides α, β ou γ -hydroxylés (cette expression signifiant ici : acides α -hydroxylés, acides β -hydroxylés ou acides γ -hydroxylés), ou α, β ou γ -mercapto acides (cette expression signifiant ici : α -mercapto acides, β -mercapto acides ou γ -mercapto acides) correspondants.

[Chem 1]



X= NH, N-alkyle, N-aryle, O, S
 R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶=Alkyle ou Aryle

Schéma n° 1 : Structures des formes activées

5

A ce jour, il n'a jamais été démontré la possibilité de préparer aisément en solution, des peptides constitués de plus de quatre acides aminés différents ou non, en utilisant des dérivés d'acides aminés activés sous la forme de 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazolidin-5-one.

- 10 C'est justement l'objet de l'invention qui propose l'utilisation des acides activés sous la forme de 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazolidin-5-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazinan-6-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazépan-7-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxolan-4-ones ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxépan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathiolan-5-one ou
- 15 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathian-6-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathiépan-7-one ou leurs dérivés en présence d'une molécule d'ancrage permettant la production de peptides ou protéines ou peptidomimétiques de haute pureté, en phase liquide (ou solution).

- Le procédé de synthèse de peptides ou protéines ou peptidomimétiques selon l'invention
- 20 procède par élongation successive de la deuxième extrémité (amine primaire ou secondaire, hydroxyle ou thiol) d'une chaîne peptidique ou protéique ou peptidomimétique dont la première extrémité est fixée sur une molécule d'ancrage soluble dans un solvant organique. Ladite molécule d'ancrage comporte une chaîne polyoléfine ou oligomères de polyoléfines ou polycalcènes ayant au moins 10 unités de monomères, et de préférence
- 25 entre 15 et 350 unités de monomères.

- Dans un mode de réalisation avantageux, ladite chaîne polyoléfine est une chaîne de polyisobutène (PIB). En particulier, ladite molécule d'ancrage peut être une polyoléfine. La chaîne de polyoléfine peut être fonctionnalisée à, au moins, l'une de ses extrémités. Dans
- 30 une variante, la chaîne de polyoléfine ou oligomère de polyoléfine ou polycalcène peut comprendre un nombre de liaisons carbone-carbone insaturées ne dépassant pas 5 %, et de préférence ne dépassant pas 3 %, et/ou la molécule d'ancrage peut présenter une

masse moléculaire moyenne en masse comprise entre 600 et 20 000, et de préférence entre 700 et 15 000.

Dans un mode de réalisation particulier, ladite molécule d'ancrage comporte une chaîne polyoléfine (ou est une chaîne polyoléfine) terminée par au moins un groupement sélectionné dans le groupe formé par :

- une fonction $-X^a$, où X^a est sélectionné dans le groupe formé par : $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}^a$ ($R^a =$ alkyle ou aryle), $-\text{SH}$;
- une fonction $-\text{Y}-\text{C}_6\text{H}_4\text{X}^b$, où
 - Y est O, S, CH_2 ou absent,
 - X^b est sélectionné dans le groupe formé par : $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}^a$, $-\text{SH}$, $-\text{CX}^a\text{R}^a\text{R}^b$, $-\text{C}_6\text{H}_3\text{R}^c(\text{CR}^a\text{X}^a)$,
 où : R^b est sélectionnée dans le groupe formé par $-\text{H}$, $-\text{Aryle}$, $-\text{Hétéroaryle}$, $-\text{Alkyle}$, et
 15 R^c est sélectionné dans le groupe formé par $-\text{H}$, $-\text{Alkyle}$, $-\text{O-Alkyle}$, $-\text{Aryle}$, $-\text{O-Aryle}$, $-\text{Hétéroaryle}$, $-\text{O-Hétéroaryle}$;
- une fonction $-\text{CR}^d=\text{CH}-\text{CHX}^a$ ou une fonction $-\text{CR}^d\text{H}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHX}^a$, où X^a a la signification définie ci-dessus, et R^d est méthyle ou éthyle.

En particulier, X^a peut être une fonction amine primaire ou secondaire, un alcool, un thiol ou un phénol.

Dans un mode de réalisation avantageux, la masse moléculaire moyenne en masse des molécules d'ancrage, hormis la fonctionnalisation terminale (par exemple $-X^a$, $-\text{Z}-\text{C}_6\text{H}_4\text{X}^b$ ou $-\text{CR}^d=\text{CH}-\text{CHX}^a$ comme définis ci-dessus), est comprise entre 600 et 20 000, et de préférence entre 700 et 15 000. Au-delà d'une masse moléculaire moyenne en masse d'environ 20 000, ces molécules peuvent présenter une viscosité trop grande, ce qui risquerait de limiter leur solubilité dans les solvants organiques utilisés pour l'étape de couplage/élongation ou itération.

Certains dérivés de PIB utilisés dans le cadre de la présente invention sont disponibles dans le commerce, en tant que ligands pour la catalyse homogène. A titre d'exemple, on peut utiliser le 2-méthyl-3-[polyisobutyl (12)]propanol (masse moléculaire moyenne en masse 757, y compris la fonctionnalisation terminale) ou le 4-[polyisobutyl(18)]phénol (masse moléculaire moyenne en masse 1104, y compris la fonctionnalisation terminale) qui sont distribués, respectivement, sous les références 06-1037 et 06-1048 par la société Strem Chemicals. Ces deux molécules sont des dérivés de polyisobutènes dont la chaîne

est terminée, respectivement, par un groupement $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{H})-\text{CH}_2-\text{OH}$ (i.e. isopropanol) et par un groupement $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ (i.e. phénol).

Selon une caractéristique de l'invention, l'utilisation d'une molécule d'ancrage soluble
5 dans un solvant organique comme décrit ci-dessus (et plus particulièrement l'utilisation de polyoléfines), est susceptible d'agir aussi comme support liquide ou groupement protecteur de la fonction acide carboxylique (C-terminal) ou de toute autre fonction chimique (chaîne(s) latérale(s)) d'un acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide, ou de toute autre molécule ayant au moins deux groupements
10 fonctionnels. Elle permet également la solubilisation des peptides ou protéines ou peptidomimétiques ancrés et leurs synthèses en solution organique (solvants halogénés et/ou non halogénés).

Selon une autre caractéristique de l'invention, l'utilisation d'une molécule d'ancrage
15 soluble dans un solvant organique comme décrit ci-dessus (et plus particulièrement l'utilisation de polyoléfines), et insoluble dans certains solvants polaires (tels que l'eau et/ou l'éthanol et/ou l'acétonitrile), facilite la purification des acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides ou peptides ou protéines ou peptidomimétiques ancrés par simple extraction (lavage) ou simple filtration sur silice.
20 Ainsi, une simple extraction ou une simple filtration permet d'obtenir les peptides ou protéines ou peptidomimétiques ancrés avec une haute pureté chimique.

Selon encore une autre caractéristique de l'invention, on utilise des molécules d'ancrage disponibles dans le commerce, ou encore des molécules d'ancrage synthétisables de
25 façon simple et directe à partir de précurseurs disponibles dans le commerce, notamment certains dérivés de polyisobutènes (PIB).

Selon encore une autre caractéristique de l'invention, on fait réagir les acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides sous leurs formes
30 activées, respectivement de, 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazolidin-5-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxolan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathiolan-5-one ou (2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazinan-6-one, 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxan-4-one, 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathian-6-one, 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazépan-7-one, 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxépan-4-one, 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathiépan-7-one et
35 leurs dérivés, en présence de la molécule d'ancrage dans un solvant approprié (ou un mélange de solvants), à une température comprise entre -20°C et 150°C . Dans un mode de réalisation, la réaction s'effectue dans tout solvant (ou mélange) liquide inerte capable

de dissoudre les réactifs. Les solvants applicables comprennent, sans s'y limiter, les hydrocarbures halogénés ou non. Les solvants préférés sont le tétrahydrofurane, l'acétate d'éthyle, le 2-méthyltétrahydrofurane, le carbonate de propylène, ou tout autre solvant ou mélange de solvants capable de solubiliser ces deux espèces chimiques.

5

Selon encore une autre caractéristique de l'invention, les réactions entre les dérivés de PIB et les acides α , β ou γ -aminés activés ou acides α , β ou γ -hydroxylés activés ou α , β ou γ -mercapto acides activés se font en chimie de lot (notamment en ballon ou citerne), mais de préférence, elles sont réalisées en chimie de flux (appelée aussi chimie

10

en flux continu).

Selon encore une autre caractéristique de l'invention, les acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides ayant des chaînes latérales incompatibles avec les conditions de la réaction d'ancrage/élongation ou itération,

15

peuvent être temporairement masquées par un groupement protecteur approprié. Il peut notamment être choisi dans le groupe formé par :

- le *tert*-butoxycarbonyle (abrégé Boc),
- le fluorénylméthoxycarbonyle (abrégé Fmoc),
- le benzyle (abrégé Bzl),
- le trityle (abrégé Trt),
- le carboxybenzyle (abrégé Cbz),
- le 2,2,4,6,7-pentaméthylidihydrobenzofuran-5-sulfonyl (abrégé Pbf),
- le 4-méthoxy-2,3,6-triméthylbenzènesulphonyl (abrégé Mtr).

20

On peut aussi utiliser tout autre groupement protecteur compatible avec le présent procédé.

25

Selon encore une autre caractéristique de l'invention, ladite molécule d'ancrage réagit avec un premier acide α , β , ou γ -aminé ou acide α , β , ou γ -hydroxylé ou α , β , ou γ -mercapto acide activé (abrégé ici AAA1), conduisant à une liaison covalente entre l'acide

30

α , β , ou γ -aminé ou acide α , β , ou γ -hydroxylé ou α , β , ou γ -mercapto acide et la molécule d'ancrage.

Selon encore une autre caractéristique de l'invention, ladite chaîne peptidique ou protéique ou peptidomimétique est formée de n unités d'acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides; sa deuxième extrémité est une autre unité d'acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide, abrégé ici AAAn. Lors du déroulement du procédé, la chaîne peptidique ou protéique ou peptidomimétique s'allonge par élongation ou itération successive, et

35

pendant chacune de ces étapes on ajoute une autre unité d'acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide activé, abrégé ici AAA(n+1), à ladite deuxième extrémité (amine primaire ou secondaire, alcool ou thiol libre). Cette séquence réactionnelle est représentée sur le Schéma réactionnel n° 2 ci-dessous.

5 [Chem 2]

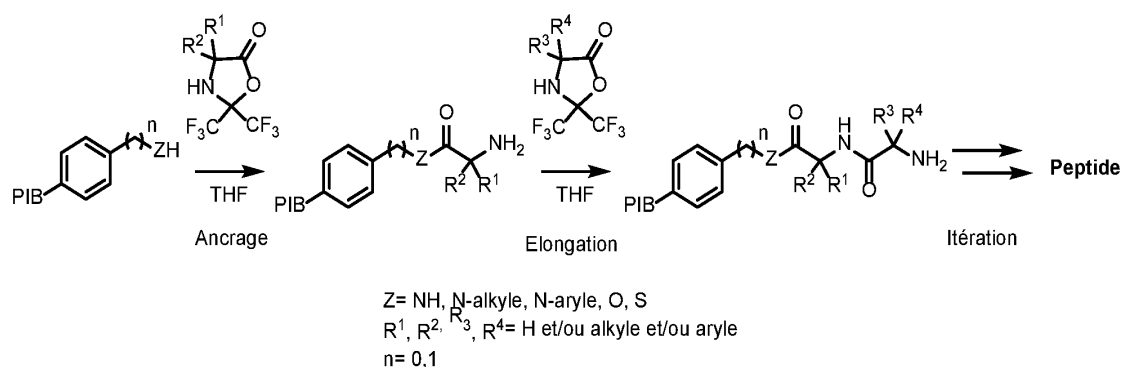


Schéma réactionnel n° 2 : Procédé général d'obtention d'un peptide

10 Selon encore une autre caractéristique de l'invention, on peut utiliser dans ladite chaîne peptidique ou protéique ou peptidomimétique, des acides α , β ou γ -aminés et/ou acides α , β ou γ -hydroxylés et/ou α , β ou γ -mercapto acides naturels et/ou non naturels et/ou synthétiques.

15 Selon encore une autre caractéristique de l'invention, on peut utiliser dans la ladite chaîne peptidomimétique une ou plusieurs unités des molécules de type $Q^a - E - Q^b$, ayant au moins deux groupements fonctionnels, qui sont identiques ou différents, et qui sont sélectionnés parmi les groupes électrophiles et/ou les groupes nucléophiles, et qui sont séparés par une unité espaceur E. Les groupes Q^a et/ou Q^b peuvent être des groupes terminaux ou non. L'espaceur E peut être une entité sélectionnée dans le groupe formé par :

- les chaînes aliphatiques (ramifiées ou non et insaturées ou non) ;
- les aryles ou hétéroaryles (substitués ou non).

Avantageusement, les molécules de type $Q^a - E - Q^b$, portent une fonction terminale sélectionnée dans le groupe formé par la fonction amine primaire, la fonction amine secondaire, la fonction hydroxyle ou la fonction thiol.

On voit aisément que lesdits acides α , β ou γ -aminés, lesdits acides α , β ou γ -hydroxylés et lesdits α , β ou γ -mercapto acides représentent des cas particuliers de molécules bifonctionnelles de type $Q^a - E - Q^b$. Il en est de même desdits acides δ -aminés, desdits

acides δ -hydroxylés et desdits δ -mercapto acides, qui cependant ne sont pas obligatoirement engagés dans la réaction sous leur forme activée, à l'instar des autres molécules bifonctionnelles qui ne sont pas des acides α , β ou γ -aminés, des acides α , β ou γ -hydroxylés ou des α , β ou γ -mercapto acides.

5

La molécule bifonctionnelle $Q^a - E - Q^b$ peut avoir une structure moléculaire, sélectionnée notamment parmi les époxydes, les aziridines, les thiiranes. Ainsi on peut préparer selon l'invention des peptidomimétiques comportant un groupe époxy-succinate, à l'instar du peptide E-64, ou encore des azirido peptides, à l'instar du Miraziridine.

10 On donne ici quelques exemples pour des molécules bifonctionnelles de type $Q^a - E - Q^b$ qui peuvent être utilisées dans le cadre de la présente invention : la sarcosine, l'acide 2-(1-aminoéthyl)-1,3-oxazole-4-carboxylique et l'acide (2R,3R,4R)-3-hydroxy-2,4,6-triméthyl-heptanoïque.

15 Ladite molécule bifonctionnelle $Q^a - E - Q^b$ peut en particulier être un acide aminé selon la définition qui en est donnée ci-dessous. Elle peut aussi être un peptide, par exemple un dipeptide, un tripeptide, un tétrapeptide, un pentapeptide, un hexapeptide, un heptapeptide, un octapeptide, un nonapeptide, un décapeptide, ou un peptide encore plus long.

20

Ces molécules bifonctionnelles peuvent être introduites dans la chaîne peptidique ou protéique ou peptidomimétique par des réactions chimiques connues. Elles ne portent pas de groupe protecteur sur une fonction terminale sélectionnée dans le groupe formé par la fonction amine primaire, la fonction amine secondaire, la fonction hydroxyle ou la fonction
25 thiol. A titre d'exemple, si ladite molécule bifonctionnelle est un acide aminé ou un peptide, elle ne porte pas de protection N-terminale ; il est possible de protéger ses chaînes latérales ou ses fonctions latérales, qui ne sont pas modifiées lors de l'élongation du peptide.

30 Comme décrit ci-dessus, lesdits acides α , β ou γ -aminés, lesdits acides α , β ou γ -hydroxylés et lesdits α , β ou γ -mercapto acides sont engagés préférentiellement sous leurs formes activés.

Les unités issues de molécules bifonctionnelles qui ne sont pas sélectionnées parmi les
35 acides α , β ou γ -aminés, les acides α , β ou γ -hydroxylés et les α , β ou γ -mercapto acides, peuvent avantageusement être fixées sur l'extrémité C-terminale dudit peptidomimétique, ou sur l'extrémité terminale (notamment par fonctionnalisation de la fonction amine primaire ou secondaire, hydroxyle ou thiol), ou encore sur la chaîne latérale (d'au moins

un acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide), ou encore entre deux unités sélectionnées parmi les acides α , β ou γ -aminés, les acides α , β ou γ -hydroxylés et les α , β ou γ -mercapto acides.

- Selon un mode de réalisation avantageux, le nombre d'unité issue de molécules
- 5 bifonctionnelles qui ne sont pas sélectionnées parmi les acides α , β ou γ -aminés, les acides α , β ou γ -hydroxylés et les α , β ou γ -mercapto acides ne dépasse pas 50 % en nombre, et de préférence ne dépasse pas 25 % en nombre.

- Selon encore une autre caractéristique de l'invention, au moins une étape dans laquelle
- 10 ladite chaîne peptidique ou protéique ou peptidomimétique est fixée sur ladite molécule d'ancrage et est purifiée du milieu réactionnel par extraction dans un solvant organique (tel que le cyclohexane, l'heptane(s) ou tout autre solvant adéquat) non miscible à l'eau (ou un mélange eau/éthanol ou un mélange eau/acétonitrile) ou par filtration sur silice.

- 15 Selon encore une autre caractéristique de l'invention, elle permet d'obtenir des peptides ou protéines ou peptidomimétiques de haute pureté, après déprotection des chaînes latérales (si nécessaires), puis décrochage de leur molécule d'ancrage après la dernière étape d'itération, pour être utilisés selon leur destination, par exemple en tant que principe actif pour des essais précliniques, des soins cliniques ou toutes autres applications.

- 20 Selon encore une autre caractéristique de l'invention, les molécules d'ancrage peuvent être réutilisées (recyclées) dans le procédé selon l'invention.

- Un deuxième objet de la présente invention est une molécule susceptible d'être obtenue
- 25 par le procédé selon l'invention. Ladite molécule comprend un acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide ou peptide ou protéine ou peptidomimétique accroché sur une molécule d'ancrage.

Description

30

1. Définitions

- Dans le cadre de la présente invention, nous entendons par « acide aminé » : les acides aminés naturels et les acides aminés non naturels ou synthétiques. Les acides aminés «
- 35 naturels » comprennent la forme L des acides aminés protéinogènes dit standards qui peuvent être trouvés dans des protéines d'origine naturelle, c'est-à-dire : alanine (Ala), arginine (Arg), asparagine (Asn), acide aspartique (Asp), cystéine (Cys), glutamine (Gln), acide glutamique (Glu), glycine (Gly), histidine (His), isoleucine (Ile), leucine (Leu), lysine

(Lys), méthionine (Met), phénylalanine (Phe), proline (Pro), sérine (Ser), thréonine (Thr), tryptophane (Trp), tyrosine (Tyr) et valine (Val). Ils comprennent également les autres acides aminés protéinogènes, et notamment la pyrrolysine et la sélénocystéine.

Les acides aminés « non naturels » comprennent la forme D des acides aminés naturels
 5 définis ci-dessus, les formes homo de certains acides aminés naturels (tels que : arginine, lysine, phénylalanine et sérine), et les formes nor de la leucine et de la valine.

Les acides aminés « non naturels » comprennent aussi tous les acides aminés synthétiques. Ils comprennent aussi des acides aminés non naturels, tels que :

10 Abu = acide 2-aminobutyrique $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{COOH})(\text{NH}_2)$;
 iPr = isopropyl-lysine $(\text{CH}_3)_2\text{C-NH}-(\text{CH}_2)_4\text{-CH}(\text{COOH})(\text{NH}_2)$;
 Aib = acide 2-aminoisobutyrique ;
 F-trp = N-formyl-tryptophane ;
 Orn = ornithine ;
 Nal(2') = 2-naphthylalanine.

15

Cette énumération n'est bien évidemment pas exhaustive.

On peut également utiliser des acides aminés α et β insaturés, naturels ou non.

Dans le cadre de la présente invention, le terme « acide aminé activé » est utilisé ici pour désigner des acides α , β , ou γ -aminés activés respectivement sous la forme de 2,2-
 20 bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazolidin-5-one ou (2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazinan-6-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazépan-7-one, et leurs dérivés, avec la possibilité ou non d'un groupement protecteur sur la chaîne latérale.

La présente invention s'applique également à la synthèse de peptidomimétiques. Les
 25 précurseurs utilisés pour cette synthèse sont définis comme suit :

Le terme « acide α , β ou γ -hydroxylé » est utilisé ici selon les règles de terminologie de l'IUPAC, connues de l'homme du métier. Des exemples sont des composés tels que l'acide lactique, l'acide malique, l'acide tartrique, l'acide salicylique ou encore l'acide γ -hydroxybutyrique, qui se trouvent dans la nature. Dans le cadre de la présente invention
 30 on peut aussi utiliser tous les acides α , β ou γ -hydroxylés « non naturels » qui comprennent aussi tous les acides α , β ou γ -hydroxylés synthétiques.

Le terme « acide α , β ou γ -hydroxylé activé » désigne tous les acides α , β ou γ -hydroxylés naturels et/ou non naturels et/ou synthétiques, qui ont été activés respectivement sous la forme de 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxolan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-
 35 dioxan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxépan-4-one, et leurs dérivés, avec la possibilité ou non d'un groupement protecteur sur la chaîne latérale.

Le terme « α , β ou γ -mercapto acide » est utilisé ici selon les règles de terminologie de l'IUPAC, connues de l'homme du métier. Des exemples sont des composés tels que l'acide thioglycolique, l'acide 3-mercaptopropionique, l'acide mercaptobutanoïque. Dans le cadre de la présente invention on peut utiliser aussi tous les α , β ou γ -mercapto acides
5 « non naturels » qui comprennent aussi tous les α , β ou γ -mercapto acides synthétiques. Le terme « α , β ou γ -mercapto acide activé » désigne tous les composés provenant de l'activation des α , β ou γ -mercapto acides (naturels, non naturels ou synthétiques) sous la forme respectivement de 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathiolan-5-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathian-6-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathiépan-7-one, et
10 leurs dérivés, avec la possibilité ou non d'un groupement protecteur sur la chaîne latérale.

L'homme du métier sait que dans ce contexte, la désignation α , β , γ et δ se réfère à la position du carbone substitué par la fonction amine (primaire ou secondaire) ou hydroxyle ou thiol par rapport au carbone de la fonction acide carboxylique (C-terminal).

15

Le terme « peptidomimétique » est utilisé selon l'état de la technique en tant que terme fonctionnel pour une molécule capable de mimer ou bloquer un peptide quant à son interaction avec un récepteur spécifique. En particulier, un peptidomimétique peut comprendre des unités qui ne sont pas des acides aminés.

20 Les abréviations « DMF », « DMSO », et « THF », bien connu des chimistes, désignent, respectivement, le diméthylformamide, le diméthylsulfoxyde et le tétrahydrofurane.

2. Description détaillée

Une première caractéristique essentielle du procédé selon l'invention est l'utilisation d'acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides
25 activés sous la forme respectivement de 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazolidin-5-one ou (2,2-bis(trifluoro-méthyl)-1,3-oxazinan-6-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazépan-7-one ou 2,2-bis(tri-fluorométhyl)-1,3-dioxolan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxan-4-one ou 2,2-bis(tri-fluorométhyl)-1,3-dioxépan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathiolan-5-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathian-6-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathiépan-7-one et leurs dérivés, en présence d'une molécule d'ancrage soluble dans un solvant organique. On entend ici par « solvant organique » tout solvant (ou mélange) liquide inerte capable de dissoudre (à chaud et/ou à froid) les réactifs. Les solvants applicables comprennent, sans s'y limiter, les hydrocarbures halogénés ou non.

35

Les acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides activés sous la forme respectivement de 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazolidin-5-one ou (2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazinan-6-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazépan-7-

one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxolan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxépan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathiolan-5-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathian-6-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxa-thiépan-7-one et leurs dérivés, sont préparés selon des méthodes connues, à partir d'acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides, naturels ou non naturels (ayant une chaîne latérale (protégée ou non)) et d'hexafluoroacétone. Le schéma réactionnel n° 3 représente l'activation des différents acides, c'est une réaction connue en tant que telle :

[Chem 3]

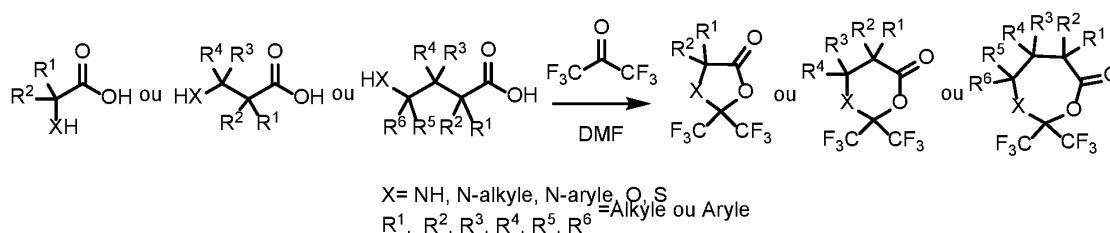


Schéma réactionnel n° 3 : Activation des acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides.

- 15 Selon une caractéristique de l'invention, qui sera décrite en plus grand détail ci-dessous, les molécules d'ancrage (ou groupements protecteurs ou molécules solubilisantes) sont des polyoléfines ou plus précisément des oligomères de polyoléfines (les polyoléfines étant appelées aussi polyalcènes) et leurs dérivés, c'est-à-dire qu'elles sont fonctionnalisées.
- 20 Selon une autre caractéristique de l'invention, ce procédé de synthèse de peptides ou protéines ou peptidomimétiques (protégés ou non sur leurs chaînes latérales), en phase liquide, est caractérisé en ce que l'on part d'une molécule d'ancrage et d'un acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide activé respectivement sous la forme de 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazolidin-5-one ou (2,2-
- 25 bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazinan-6-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazépan-7-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxolan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxépan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathiolan-5-one ou 2,2-bis(trifluoro-méthyl)-1,3-oxathian-6-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathiépan-7-one ou leurs dérivés. Une liaison covalente est alors formée entre ces deux
- 30 espèces moléculaires. L'étape d'élongation/itération consiste en ce que l'on additionne ou condense les acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides activés suivants, qui sont éventuellement protégés sur leur chaîne latérale (sous forme d'ester, d'éther, de thioester, de thioéther ou toutes autres fonctions

chimiques compatibles avec le présent procédé). Ainsi, la molécule d'ancrage joue un rôle de groupement protecteur de la fonction acide carboxylique (C-terminal) du premier acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide.

- 5 Selon une autre caractéristique de l'invention, ce procédé de synthèse peptidique ou protéique ou peptidomimétique peut être réalisé en utilisant un fragment de peptide ou protéine ou peptidomimétique convenablement protégé et un acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide ou peptide ou protéine ou peptidomimétique, ancrée sur une molécule de PIB, permettant après couplage d'obtenir
10 un peptide ou protéine ou peptidomimétique plus long.

- Selon une autre caractéristique de l'invention, ce procédé de synthèse peptidique ou protéique ou peptidomimétique peut être réalisé en utilisant des molécules $Q^a - E - Q^b$ ayant au moins deux groupements fonctionnels Q^a et Q^b , qui sont identiques ou différents,
15 et qui sont sélectionnés parmi les fonctions chimiques électrophile et/ou nucléophiles. Des exemples de ces structures sont l'oxyde de styrène, les aminothiophénols ou le 1-azido-4-(bromométhyl)benzène. Ces molécules peuvent directement être fixées sur la molécule d'ancrage ou introduites en cours de synthèse sur la fonction amine (primaire ou secondaire) ou hydroxyle ou thiol, des acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides ou peptides ou protéines ou peptidomimétiques
20 ancrés.

- Le procédé selon l'invention peut être réalisé dans tout solvant (ou mélange) liquide inerte capable de dissoudre les réactifs (halogéné ou non), à une température typiquement
25 comprise entre environ -20°C et environ 150°C , dans un réacteur (en lot ou en flux).

- Selon une autre caractéristique de l'invention l'acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide ou peptide ou protéine ou peptidomimétique ancré sur une molécule de PIB est caractérisé en ce que la fonction terminale dudit acide
30 α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide ou peptide ou protéine ou peptidomimétique ou toute autre molécule ayant au moins deux groupements fonctionnels est lié par une liaison covalente (ester, éther, amide, thioester ou toutes autres fonctions chimiques), donnant ainsi une solubilité dans l'eau très faible ($< 30 \text{ mg/ml}$). C'est en ce sens que le dérivé de PIB agit comme un support liquide ou une
35 molécule solubilisante pour la synthèse de peptides ou protéines ou peptidomimétiques.

A titre d'illustration, le schéma réactionnel n° 4 montre la réaction d'un acide aminé activé sous la forme de 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazolidin-5-one avec un dérivé de

polyisobutène (abrégé PIB) qui est terminé par une fonction phénol. En l'occurrence, l'acide α -aminé est la L-phénylalanine (Phe).

[Chem 4]

5

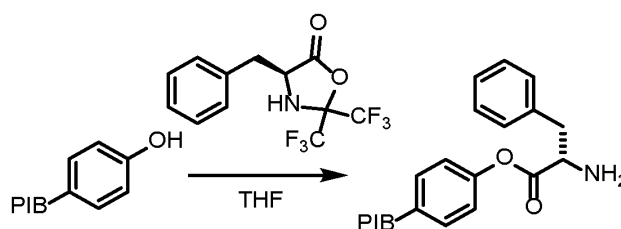


Schéma réactionnel n° 4 : Ancre au support liquide

Ainsi, le premier acide α -aminé du futur peptide est fixé sur la molécule d'ancrage par l'intermédiaire d'une liaison covalente de type ester.

Le schéma réactionnel n° 5 montre l'étape d'élongation ou d'itération, i.e. l'accrochage d'une deuxième unité d'acide aminé, au premier acide aminé fixé sur la molécule d'ancrage. En l'occurrence, ce deuxième acide α -aminé est le L-tryptophane (Trp).

15

[Chem 5]

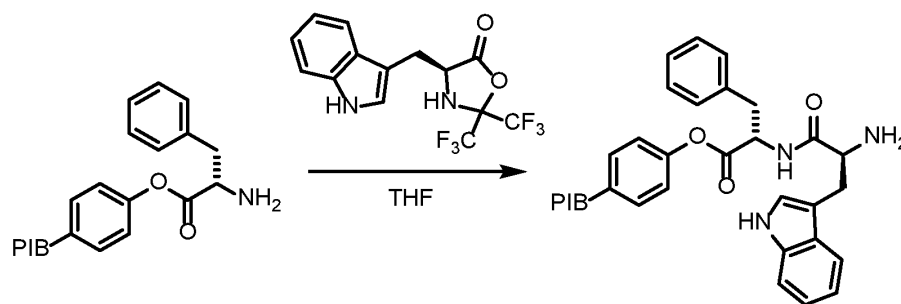


Schéma réactionnel n° 5 : Elongation

20

On voit aisément que ce procédé permet, par des itérations successives, d'ajouter des unités d'acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides sur le dernier acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide ou peptide ou protéine ou peptidomimétique fixé sur le dérivé de PIB, en cours de synthèse, pour obtenir un peptide ou protéine ou peptidomimétique ayant la séquence souhaitée. Le peptide ou protéine ou peptidomimétique étant chimiquement lié à la molécule d'ancrage, il peut être séparé à tout moment, et notamment après la

25

dernière étape d'itération, de tous produits polaires par extraction dans un solvant organique tel que l'hexane(s) ou le cyclohexane et de l'eau ou dans un mélange eau/éthanol ou eau/acétonitrile. A la fin de cette séquence d'itération, et après éventuellement la déprotection des chaînes latérales, on peut décrocher le peptide ou
5 protéine ou peptidomimétique de la molécule d'ancrage ; ainsi le peptide ou la protéine ou le peptidomimétique perd sa solubilité dans un solvant apolaire, et on peut le séparer de la molécule d'ancrage, pour l'utiliser conformément à sa destination.

Selon une autre caractéristique de l'invention, la dérivation (ou ancrage) d'un acide
10 α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide ou peptide ou protéine ou peptidomimétique (protégé(s) ou non sur sa/ses chaîne(s) latérale(s)) avec un dérivé de PIB entraîne de fait une augmentation de manière significative de la solubilité dudit acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide ou peptide ou protéine ou peptidomimétique ancré en phase liquide organique. Plus
15 précisément, ces acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides ou peptides ou protéines ou peptidomimétiques ancrés sur un dérivé de PIB deviennent solubles dans des solvants organiques, tels que les solvants halogénés (chlorure de méthylène, chloroforme), l'acétate d'éthyle, le tétrahydrofurane, le 2-méthyletétrahydrofurane, l'isooctane, le cyclohexane, l'hexane(s), le méthylcyclohexane,
20 le méthyl tert-butyl éther le carbonate de propylène ou des solvants aromatiques tels que le benzène ou le toluène ou tout autre solvant adéquat. Ainsi, les acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides ou peptides ou protéines ou peptidomimétiques ancrés sur un dérivé de PIB ont un haut coefficient de partage pour la phase organique lors d'une extraction/décantation, permettant ainsi une purification
25 simple et rapide. En même temps, leur solubilité dans des solvants tels que l'eau ou un mélange eau/éthanol ou eau/acétonitrile est très faible.

Selon une autre caractéristique de l'invention, la réaction entre un dérivé de PIB et le premier acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide
30 activé, ayant éventuellement une chaîne latérale protégée ou non (ester, amide, thioester ou toutes autres fonctions chimiques), conduit à un produit dont la solubilité dans l'eau est faible (< 30 mg/ml).

Ainsi, lorsqu'un acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide ou peptide ou protéine ou peptidomimétique est fixé sur un dérivé de PIB, ce
35 dernier agit comme un support liquide (ou molécule d'ancrage ou molécule solubilisante) car le produit de cette réaction devient soluble dans des solvants organiques mais reste insoluble dans des solvants tels que l'eau ou un mélange eau/éthanol ou eau/acétonitrile ; cela permet sa séparation du mélange réactionnel par séparation des phases.

Le schéma réactionnel n° 6 montre un exemple d'étape de décrochage d'un octapeptide ayant la séquence Phe-Trp-Cys(Bzl)-Trp-Cys(Bzl)-Trp-Trp-Cys(Bzl)-NH₂, de la molécule d'ancrage (dérivé de PIB terminé par une fonction phénol), sur laquelle le peptide est ancré par la fonction acide carboxylique (C-terminal) de la L-phénylalanine. Les chaînes latérales des résidus L-cystéines sont protégées par un groupement benzyle (Bzl). Le peptide libre est insoluble dans les solvants apolaires (i.e. cyclohexane, hexane(s)), ce qui permet de le séparer facilement de la molécule d'ancrage. On peut récupérer la molécule d'ancrage en vue de sa réutilisation dans le procédé.

[Chem 6]

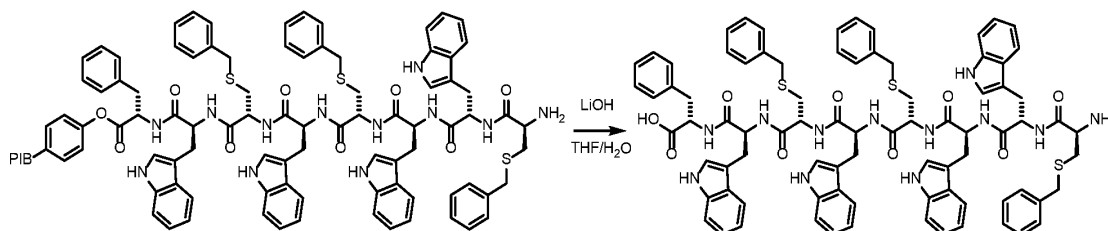


Schéma réactionnel n° 6 : Décrochage d'un octapeptide de la molécule d'ancrage

Le peptide précipite dans des solvants tels que : l'éther éthylique, le cyclohexane ou tout autre solvant approprié. Il peut ensuite être utilisé conformément à sa destination.

Nous décrivons maintenant une deuxième caractéristique essentielle du procédé de préparation de peptides ou protéines ou peptidomimétiques selon l'invention, à savoir l'utilisation de molécules d'ancrage solubles dans certains solvants organiques tels que :

l'acétate d'éthyle, le tétrahydrofurane, le 2-méthyltetrahydrofurane, l'isooctane, le cyclohexane, l'hexane(s), le méthylcyclohexane, le méthyl tert-butyl éther ou les solvants halogénés.

Avantageusement, le procédé selon l'invention utilise des polyoléfines ou plus précisément des oligomères de polyoléfines (les polyoléfines étant appelées aussi polyalcènes), et leurs dérivés comme molécules d'ancrage ou support liquide ou groupement protecteur que ce soit de la fonction acide carboxylique (C-terminal) de l'acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide ou peptide ou protéine ou peptidomimétique, ou de la chaîne latérale dudit acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide ou peptide ou protéine ou peptidomimétique (sous forme de liaison ester, amide, éther, thioester, thioéther ou toutes autres fonctions chimiques adéquates) en phase liquide. Les molécules de polyoléfines comprennent une chaîne d'atomes de carbone reliés entre eux par des liaisons simples. Elles peuvent comprendre des ramifications constituées de groupements alkyles

identiques ou différents, mais de préférence identiques. De préférence, les polymères sont constitués d'un nombre d'unités de monomères d'au moins 10 et de préférence compris entre 15 et 350. Les homopolymères sont préférés mais, des copolymères (saturés ou non) peuvent être utilisés. Dans le cas de polymères ou copolymères

5 insaturés le nombre de liaisons insaturées dans la chaîne d'atomes de carbone ne dépasse avantageusement pas 5 %, et préférentiellement ne dépasse pas 3 %.

De préférence, il s'agit de dérivés de polyisobutènes (PIB), une classe de polymères connue depuis les années 30 du siècle dernier, mais on peut également utiliser des

10 dérivés de polypropylènes.

Ces molécules d'ancrage sont de préférence employées dans le procédé selon l'invention sous la forme de dérivés fonctionnalisés, comme cela sera expliqué en plus grand détail par la suite. Le schéma n° 7 montre un certain nombre de dérivés de PIB avec leurs

15 fonctionnalisations qui conviennent en tant que support liquide pour exécuter la présente invention.

[Chem 7]

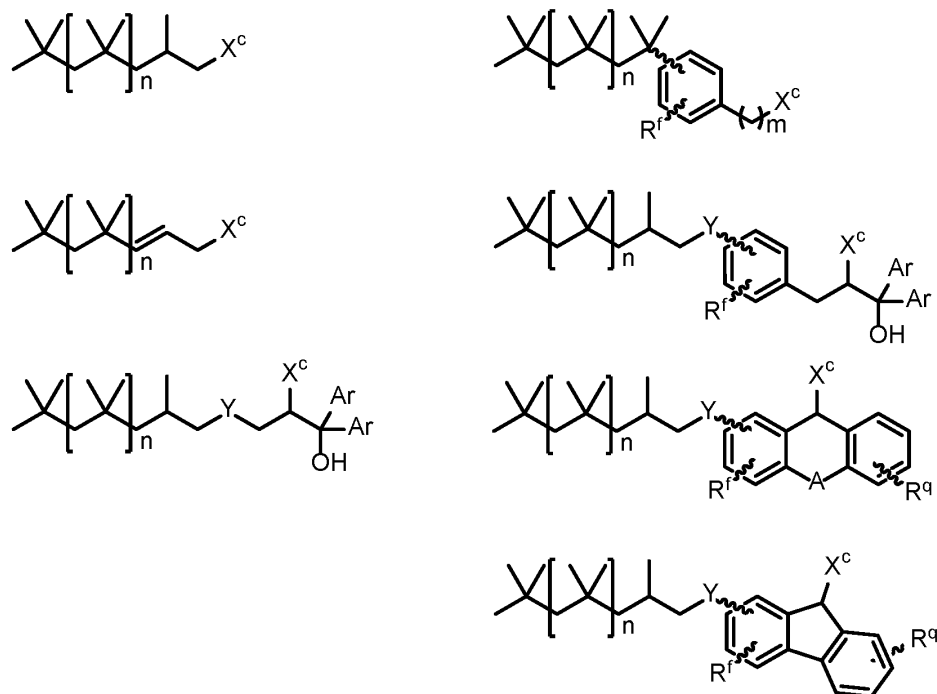


Schéma n° 7 : Structures générales des molécules d'ancrage

Dans ces formules :

- X^c est un groupement sélectionné dans le groupe formé par -OH, -NH₂, -NHR^a (R^a= alkyle ou aryle), -SH ;
- 5 • Ar est un groupement aromatique ou hétéro-aromatique, substitué ou non ;
- A est soit absent, soit un groupement sélectionné dans le groupe formé par : CH₂, CH₂-CH₂, S ;
- R^f est un groupement sélectionné dans le groupe formé par H, aryle, hétéro-aryle, alkyle, O-alkyle, O-aryle, O-hétéro-aryle ;
- 10 • R^q est un groupement sélectionné dans le groupe formé par H, alkyle, O-alkyle, aryle, hétéro-aryle, O-aryle, O-hétéro-aryle ;
- le nombre n est un nombre entier qui est typiquement supérieur à 10, et avantageusement compris entre 15 et 350.

Le nombre m est soit 0 soit 1. En particulier, le groupement X^c peut être une fonction dans
15 une amine primaire ou secondaire, un alcool, un thiol ou un phénol.

Selon l'invention, ces molécules d'ancrage sont liées à la fonction acide carboxylique d'un acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide (C-terminal) ou toutes fonctions chimiques d'une molécule ayant au moins deux groupements fonctionnels par une liaison covalente. Cela suppose que les molécules
20 d'ancrage soient engagées sous une forme convenablement fonctionnalisée, qui est appelée dans la présente description « dérivés de PIB ». Ce terme englobe ici aussi les dérivés de molécules d'ancrage qui ne sont pas des dérivés du polyisobutène, mais qui sont des dérivés d'autres polyoléfines selon la définition qui est donnée ci-dessus ; il englobe notamment les dérivés d'oligomères de polyoléfine. Cette fonctionnalisation de la
25 molécule d'ancrage est en règle générale une fonctionnalisation terminale, de préférence à l'une des extrémités de la chaîne d'atomes de carbone ; elle est décrite ci-dessous.

Selon l'invention, les acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides ou peptides ou protéines ou peptidomimétiques peuvent être fonctionnalisés sur leurs chaînes latérales avec des dérivés de PIB, sous la forme d'ester,
30 d'éther, de thioéther, de thioester ou toutes autres fonctions chimiques compatibles avec le présent procédé. Cela revient à conférer aux dérivés de PIB un rôle de groupement protecteur de(s) la(les) chaîne(s) latérale(s) desdits acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides ou peptides ou protéines ou peptidomimétiques.

Les chaînes de polyoléfines ou oligomères de polyoléfines ou polyalcènes utilisés comme molécules d'ancrage sont typiquement caractérisés par une masse moléculaire moyenne en masse, mais on peut aussi également utiliser des chaînes de polyoléfines ou oligomères de polyoléfines ou polyalcènes dits « homogènes » qui comportent des

5 molécules identiques d'une longueur de chaîne donnée.

Plus précisément, le procédé de synthèse de peptides ou protéines ou peptidomimétiques, éventuellement protégés sur leurs chaînes latérales, en phase liquide (solution) selon l'invention, est caractérisé par le fait que l'on solubilise un acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide ou peptide ou protéine ou peptidomimétique en milieu organique par un dérivé de PIB lié à la fonction acide carboxylique de l'acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide ou peptide ou protéine ou peptidomimétique ou toute autre molécule ayant au moins deux groupements fonctionnels. Le dérivé de PIB agit comme une molécule

10 d'ancrage (appelé ici aussi « support liquide » ou « molécule solubilisante ») de l'acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide ou peptide ou protéine ou peptidomimétique ou toute autre molécule ayant au moins deux groupements fonctionnels. Ledit peptide ou protéine ou peptidomimétique fixé sur cette molécule d'ancrage est synthétisé par accrochage successif d'acides α , β ou γ -aminés ou acides

20 α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides ou toutes autres molécules ayant au moins deux groupements fonctionnels sur le dernier acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide ou toute autre molécule ayant au moins deux groupements fonctionnels. Ainsi, la molécule d'ancrage sert également de groupement protecteur de la fonction acide carboxylique (C-terminal) pendant la synthèse

25 du peptide ou protéine ou peptidomimétique au cours d'itérations successives.

La fonction acide carboxylique (C-terminal) dudit acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide ou peptide ou protéine ou peptidomimétique, éventuellement protégé sur sa/ses chaîne(s) latérale(s), est liée par une liaison covalente

30 de type ester, amide, thioester, ou toutes autres liaisons chimiques covalentes, à un dérivé de PIB lipophile, donnant une solubilité dans l'eau très faible (< 30 mg/ml). C'est en ce sens que le dérivé de PIB agit comme un support liquide ou une molécule solubilisante pour la synthèse de peptides ou protéines ou peptidomimétiques.

35 Cette dérivation de l'acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide ou peptide ou protéine ou peptidomimétique (protégé ou non sur ses chaînes latérales) avec un dérivé de PIB augmente de manière significative la solubilité dudit acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide ou

peptide ou protéine ou peptidomimétique ancré, en phase liquide organique. Plus précisément, ces acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides ou peptides ou protéines ou peptidomimétiques ancrés sur le dérivé de PIB deviennent solubles dans des solvants organiques tels que : les solvants halogénés (chlorure de méthylène, chloroforme), l'acétate d'éthyle, le tétrahydrofurane, le 2-méthyltetrahydrofurane, l'isooctane, le cyclohexane, l'hexane(s), le méthylcyclohexane, le méthyl tert-butyl éther ou des solvants aromatiques tels que le benzène ou le toluène ou tout autre solvant adéquat. En conséquence, les acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides ou peptides ou protéines ou peptidomimétiques accrochés à un dérivé de PIB ont un haut coefficient de partage pour la phase organique lors d'une extraction/décantation en présence de cyclohexane ou d'hexane(s) et d'eau ou d'un mélange eau/éthanol ou encore eau/acétonitrile, permettant ainsi leur purification simple et rapide.

Dans un mode de réalisation du procédé de synthèse de peptides ou protéines ou peptidomimétiques (protégés ou non sur leurs chaînes latérales), en phase liquide selon l'invention, on part d'une molécule ayant au moins deux groupements fonctionnels ou d'un acide α , β , ou γ -aminé ou acide α , β , ou γ -hydroxylé ou α , β , ou γ -mercapto acide activé respectivement sous la forme de 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazolidin-5-one ou (2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazinan-6-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazépan-7-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxolan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxépan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathiolan-5-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathian-6-one ou 2,2-bis(trifluoro-méthyl)-1,3-oxathiépan-7-one ou leurs dérivés, qui seront liés à l'une des molécules d'ancrage tel que défini précédemment, par l'intermédiaire d'une liaison covalente, et que l'on additionne ou condense, par des itérations successives, les molécules ayant au moins deux groupements fonctionnels ou les acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides activés et éventuellement protégés sur leurs chaînes latérales.

Le procédé de synthèse de peptide ou protéine ou peptidomimétique selon l'invention peut être réalisé en utilisant un fragment de peptide ou protéine ou peptidomimétique convenablement protégé sur ses chaînes latérales et une séquence peptidique ou protéique ou peptidomimétique ancrée sur une molécule de PIB permettant, après couplage, d'obtenir un peptide ou protéine ou peptidomimétique plus long.

Le procédé de synthèse de peptide ou protéine ou peptidomimétique selon l'invention peut être réalisé en utilisant des molécules ayant au moins deux groupements

fonctionnels, à savoir un groupement Q^a et un groupement Q^b , qui peuvent être identiques ou différents, et qui sont sélectionnés parmi les groupements électrophiles et/ou les groupements nucléophiles. A titre d'exemple, dans un premier mode de réalisation Q^a peut être un groupement électrophile, et Q^b peut être un groupement nucléophile, ou encore, dans un deuxième mode de réalisation, Q^a peut être un premier groupement électrophile et Q^b un deuxième groupe électrophile, ou encore, dans un troisième mode de réalisation, Q^a peut être un premier groupe nucléophile et Q^b un deuxième groupe nucléophile ; dans des variantes, Q^a et Q^b peuvent également désigner le même groupement électrophile, ou encore le même groupement nucléophile. Ces molécules ayant au moins deux groupements fonctionnels peuvent directement être ancrées sur la molécule d'ancrage ou introduites en cours de synthèse sur la fonction amine (primaire ou secondaire) ou hydroxyle ou thiol, des acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides ou peptides ou protéines ou peptidomimétiques ancrés.

Avantageusement, on utilise un léger excès stœchiométrique de l'acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide activé, au cours de chaque étape d'ancrage, d'élongation et/ou d'itération.

Ces molécules bifonctionnelles peuvent être introduites dans la chaîne peptidique ou protéique ou peptidomimétique par des réactions chimiques connues. En cas de besoin elles peuvent être protégées ou masquées (sur sa fonction nucléophile ou toutes autres fonctions chimiques le nécessitant, grâce à des réactions connues) et activées par des techniques connues.

Les unités issues de molécules bifonctionnelles qui ne sont pas sélectionnées parmi les acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides peuvent avantageusement être fixées sur l'extrémité C-terminale dudit peptide ou protéine ou peptidomimétique, ou sur l'extrémité N, O ou S-terminale (notamment par fonctionnalisation de la fonction amine, hydroxyle ou thiol), ou encore sur la chaîne latérale, ou encore entre deux unités sélectionnées parmi les acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides.

Selon un mode de réalisation avantageux, le nombre d'unités issues de molécules bifonctionnelles qui ne sont pas sélectionnées parmi les acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides ne dépasse pas 50 % en nombre d'unité, et de préférence ne dépasse pas 25 % en nombre d'unité, et encore plus préférentiellement ne dépasse pas 10 % en nombre d'unité.

A titre d'exemple, le semaglutide, un peptidomimétique comportant sur une chaîne latérale une unité acide α -aminobutyrique, peut être préparé en utilisant le procédé selon l'invention.

- 5 On donne ici une liste de molécules de type acide α , β , γ ou δ -aminé qui peuvent être utilisées comme unités dans le cadre du procédé selon l'invention, en plus des acides aminés déjà mentionnés ci-dessus : l'acide δ -amino lévulinique, l'acide γ -aminobutyrique, l'acide β -aminobutyrique (aussi connue sous le sigle BABA), le β -alanine, la β -lysine, l'acide β -aminoisobutyrique, le β -N-Méthylamino-L-alanine, l'acide (2S,3S,8S,9S)-3-
10 amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-diénoïque (aussi connu sous le signe ADDA), l'acide (2R)-2-(méthylamino)butanedioïque (aussi connu sous le sigle NMDA) et l'acide 4-amino-3-hydroxybutanoïque.

- On donne ici une liste de molécules de type acide α , β , γ ou δ -hydroxylé qui peuvent être utilisées comme unités dans le cadre du procédé selon l'invention : l'acide 4-
15 hydroxybutanoïque, l'acide 2-(hydroxyméthyl)-3-méthylbutanoïque et l'acide (2R,3R,4R)-3-hydroxy-2,4,6-triméthylheptanoïque.

- On donne ici une liste de molécules de type α , β , γ ou δ -mercapto acide qui peuvent être utilisées comme unités dans le cadre du procédé selon l'invention : l'acide 4-sulfanylbutanoïque, l'acide 2-cyclopropyl-3-sulfanylpropanoïque, l'acide 2-cyclobutyl-3-
20 sulfanylpropanoïque et l'acide 2-(2-sulfanylphényl)butanoïque

Le procédé selon l'invention présente de nombreux avantages.

Un premier avantage est qu'il permet une production de peptides ou protéines ou peptidomimétiques (protégés ou non sur leurs chaînes latérales) lié à la molécule d'ancrage en phase liquide organique.

- 25 Un second avantage est qu'il permet d'obtenir des peptides ou protéines ou peptidomimétiques (protégés ou non sur leurs chaînes latérales) ancrés de haute pureté par un simple lavage (extraction) dans un solvant organique apolaire et à l'eau ou d'un mélange eau/éthanol ou encore eau/acétonitrile ou par filtration, engendrant ainsi l'élimination des sous-produits (sels, acides ou toutes autres espèces moléculaires) qui ne
30 sont pas liés au dérivé de polyoléfines ou oligomères de polyoléfines ou polyalcènes tels que les réactifs en excès. Des solvants organiques tels que le cyclohexane, l'heptane, l'hexane(s) qui ont des points éclair $< 15^{\circ}\text{C}$, sont appropriés pour solubiliser les dérivés de polyoléfines ou d'oligomères de polyoléfines ou polyalcènes pendant l'extraction ou le lavage. Le procédé selon l'invention permet donc de limiter les étapes de purification qui
35 sont nécessaires dans les procédés de l'état de la technique.

Un troisième avantage, particulièrement important, est que le procédé selon l'invention permet de synthétiser des peptides ou protéines ou peptidomimétiques, en ajustant la longueur du dérivé de polyoléfines ou oligomères de polyoléfines ou polyalcènes, c'est-à-dire en les rendant plus lipophiles.

- 5 Un quatrième avantage est la possibilité de contrôler la pureté du peptide ou protéine ou peptidomimétique en cours de synthèse, à tout instant, par le prélèvement d'un aliquote suivi d'une analyse par les différentes techniques connues de l'homme du métier (telles que la spectrométrie de masse, la chromatographie en phase liquide à haute performance, la résonance magnétique nucléaire du proton ou du carbone-13).

10

- Un cinquième avantage réside dans le fait qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser de groupement protecteur de la fonction amine (primaire ou secondaire) ou hydroxyle ou thiol, respectivement, des acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides qui, généralement, coûte deux étapes (protection et
15 déprotection). D'une manière plus générale, le procédé selon l'invention permet une économie optimale d'atomes car il ne fait intervenir, ni groupements protecteurs de la fonction amine (primaire ou secondaire) ou hydroxyle ou thiol des acides correspondants, ni agents de couplage. Cette économie d'atomes et d'étapes du procédé selon l'invention engendre, dans la réalité industrielle, des économies financières tout en diminuant la
20 génération de déchets, soit un facteur environnemental favorable contrairement aux méthodes actuelles.

- Un sixième avantage de l'invention réside dans le fait que l'activation de la fonction acide carboxylique (C-terminal) est concomitante à la protection de la fonction amine (primaire
25 ou secondaire) ou hydroxyle ou thiol, diminuant donc le nombre d'étapes.

- Un septième avantage particulièrement intéressant de l'invention réside dans l'obtention de peptides ou protéines ou peptidomimétiques de haute pureté après le clivage des groupements protecteurs des chaînes latérales, puis de la molécule d'ancrage. Ceci évite
30 de purifier le peptide ou protéine ou peptidomimétique synthétisé. En conséquence, des économies supplémentaires sont engendrées par rapport aux procédés connus. Ceci limite encore plus l'impact environnemental de la production des peptides ou protéines ou peptidomimétiques.

- 35 Un huitième avantage de l'invention réside dans la possibilité d'accéder à des peptides ou protéines ou peptidomimétiques de plus grandes tailles, soit en modulant la taille du

support liquide ou en l'introduisant sur une ou plusieurs chaînes latérales d'acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides activés.

D'autres avantages sont la possibilité d'automatiser le procédé selon l'invention et la
5 possibilité de recycler les solvants d'extraction et les molécules d'ancrage (polyoléfines ou oligomères de polyoléfines ou polycalcènes). En effet, lorsque la série d'itérations pour obtenir la séquence du peptide ou protéine ou peptidomimétique cible est achevée, ce dernier est déprotégé de ses groupements protecteurs des chaînes latérales et finalement, de la molécule d'ancrage par une des réactions habituellement utilisées en
10 synthèse peptidique, telles que l'hydrolyse, la saponification, l'hydrogénolyse ou toute autre réaction compatible avec le présent procédé.

Grâce à leur haute pureté, les peptides ou protéines ou peptidomimétiques produits par ce procédé peuvent être utilisés en tant que produits pharmaceutiques (médicaments et vaccins), produits cosmétiques, produits phytosanitaires, produits agroalimentaires ou
15 comme intermédiaires pour synthétiser de tels produits.

Exemple

Un octapeptide a été préparé en utilisant le procédé selon l'invention.

20 Dans une première étape les acides aminés suivants ont été activés : L-phénylalanine activée (désignée ici comme AAA1), L-tryptophane activé (désigné ici comme AAA2) et L-cystéine activée (protégée par un groupe protecteur benzyle (Bzl)) (désignée ici comme AAA3). Cette réaction correspond au schéma réactionnel n° 3 ci-dessus.

A une solution de l'acide aminé (10 mmol) dans le N-N-diméthylformamide (5 mL), à
25 température ambiante, équipé d'un condenseur de gaz à glace carbonique et d'un bulleur, a été condensé de l'hexafluoroacétone en excès (> 2 équivalents). Après seize heures d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel a été concentré à sec, et le résidu a été lyophilisé. Le brut obtenu a été dissout dans le dichlorométhane, filtré puis le solvant a été éliminé sous pression réduite et lyophilisé (trois fois). Les 2,2-
30 bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazolidin-5-ones ou acides aminés activés ont été obtenus sous forme d'huile ou de solide avec des rendements compris entre 80-95 %. Leurs formules sont données ci-dessous sur le schéma n° 8.

[Chem 8]

28

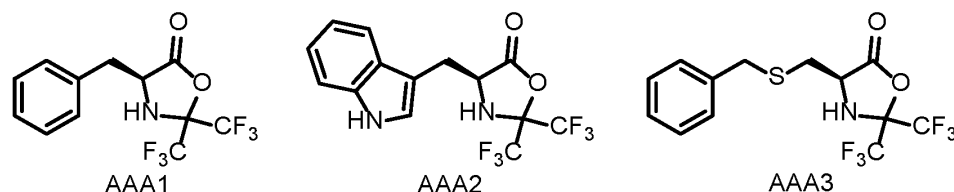


Schéma n°8 : Structures des acides aminés activés

Dans une deuxième étape, on couple un acide aminé activé (la L-phénylalanine activée désignée ici comme AAA1) sur la molécule d'ancrage, en l'occurrence un dérivé de PIB. Cette réaction correspond au schéma réactionnel n° 4 ci-dessus.

Une solution de dérivé de PIB (31,1 mg, 0,028 mmol) et de l'acide aminé activé (ici AAA1) (9,8 mg, 0,031 mmol) dans un mélange tétrahydrofurane/hexafluoroisopropanol (2 mL) a été chauffée à 50°C pendant 2 heures puis refroidie à température ambiante. Une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (2 ml) a été ajoutée au milieu réactionnel et le mélange a été agité à température ambiante pendant trente minutes. Le milieu réactionnel a été extrait trois fois au cyclohexane, lavé à la saumure, séché sur sulfate de sodium, filtré et concentré sous pression réduite pour conduire au dérivé de H₂N-Phe-PIB.

15

Dans une troisième étape on procède à l'élongation du peptide par accrochage d'un autre acide aminé activé (ici AAA2). Cette réaction correspond au schéma réactionnel n° 5 ci-dessus.

Une solution du dérivé de H₂N-Phe-PIB (1 équivalent) et l'acide aminé activé suivant (AAA2) (1,1 équivalent) dans le tétrahydrofurane/hexafluoroisopropanol (2 mL, 9/1) a été chauffée à 50°C pendant 2 heures puis refroidie à température ambiante. Le mélange réactionnel a été traité comme précédemment, pour conduire au dipeptide ancré correspondant (H₂N-Trp-Phe-PIB), et ainsi de suite. En l'occurrence, l'itération a été répétée avec l'acide aminé activé AAA3 dans les mêmes conditions pour obtenir le tripeptide ancré correspondant (H₂N-Cys(Bzl)-Trp-Phe-PIB).

25

On a ensuite procédé à d'autres itérations jusqu'à obtenir un octapeptide ancré de séquence H₂N-Cys(Bzl)-Trp-Trp-Cys(Bzl)-Trp-Cys(Bzl)-Trp-Phe-PIB.

Dans une dernière étape, le peptide est décroché de la molécule d'ancrage. Cette réaction correspond au schéma réactionnel n° 6 ci-dessus.

A une solution de l'octapeptide ancré (H₂N-Cys(Bzl)-Trp-Trp-Cys(Bzl)-Trp-Cys(Bzl)-Trp-Phe-PIB) (8 mg) dans un mélange tétrahydrofurane/eau (8:2) (2 mL), à température

30

ambiante, a été additionnée une solution d'hydroxyde de lithium (1 M, 2 mL). Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 16 heures. Le milieu réactionnel a été dilué avec une solution de dioxane/HCl et le précipité a été lavé avec du cyclohexane.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de synthèse de peptides ou protéines ou peptidomimétiques par élongation successive de la deuxième extrémité, qui présente une fonction amine primaire ou secondaire, une fonction hydroxyle ou une fonction thiol, d'une chaîne peptidique ou protéique ou peptidomimétique par des unités, caractérisé en ce que :
 - 5 - lesdites unités sont sélectionnées dans le groupe formé par les molécules de type $Q^a - E - Q^b$, où Q^a et Q^b peuvent être identiques ou différents, et sont sélectionnés parmi les groupes électrophiles et les groupes nucléophiles, et E représente un espaceur ;
 - 10 - la première extrémité dudit peptide ou protéine ou peptidomimétique est fixée par une liaison covalente à une molécule d'ancrage soluble dans des solvants organiques tels que les solvants halogénés (de préférence le chlorure de méthylène ou le chloroforme), l'acétate d'éthyle, le tétrahydrofurane, le 2-méthyltetrahydrofurane, l'isooctane, le cyclohexane, l'hexane(s), le méthylcyclohexane, le méthyl tert-butyl éther ou des solvants aromatiques tels que le benzène ou le toluène ;
 - 15 - ledit procédé ne fait pas intervenir de groupements protecteurs de la fonction amine primaire ou amine secondaire ou hydroxyle ou thiol.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les groupes Q^a et Q^b sont
 - 20 sélectionnés dans le groupe formé par : les alcools, les aldéhydes, les amines primaires, les amines secondaires, les azides, les éthylnes, les halogènes, les thiols, les vinyles, et/ou en ce que l'espaceur E est sélectionné dans le groupe formé par les aromatiques, les hétéroaromatiques, les chaînes alkyles saturées (ramifiées ou non), les chaînes alkyles insaturées ramifiées ou non), les glycols (et de préférence le polyéthylène glycol).
 - 25
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que lesdites unités $Q^a - E - Q^b$ sont sélectionnées dans le groupe formé par : les acides α , β , γ ou δ -aminés naturels ou non naturels ou synthétiques, les acides α , β , γ ou δ -hydroxylés naturels ou non naturels ou synthétiques, les α , β , γ ou δ -mercapto acides naturels ou
 - 30 non naturels ou synthétiques.
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que lesdites unités d'acides α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides sont mises en œuvre sous une forme activée.
5. Procédé selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce que lesdites unités d'acides
 - 35 α , β ou γ -aminés ou acides α , β ou γ -hydroxylés ou α , β ou γ -mercapto acides sont mises en œuvre respectivement sous la forme de 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazolidin-5-one ou (2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazinan-6-one ou 2,2-

- bis(trifluorométhyl)-1,3-oxazépan-7-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxolan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-dioxépan-4-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathiolan-5-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathian-6-one ou 2,2-bis(trifluorométhyl)-1,3-oxathiépan-7-one ou leurs dérivés.
- 5 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ladite molécule d'ancrage comporte une chaîne polyoléfine ou est une chaîne polyoléfine ou un oligomère de polyoléfine ou polyalcène, avec au moins 10 unités de monomères, et de préférence entre 15 et 350 unités de monomères et est de préférence une chaîne de polyisobutène.
- 10 7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ladite chaîne polyoléfine ou oligomère de polyoléfine ou polyalcène est fonctionnalisée à au moins l'une de ses extrémités.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que ladite chaîne polyoléfine ou oligomère de polyoléfine ou polyalcène comprend un
- 15 nombre de liaisons carbone-carbone insaturées ne dépassant pas 5 %, et de préférence ne dépassant pas 3 %.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisé en ce que ladite molécule d'ancrage présente une masse moléculaire moyenne en masse comprise entre 600 et 20 000, et de préférence entre 700 et 15 000.
- 20 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que ladite molécule d'ancrage comporte une chaîne polyoléfine (ou est une chaîne polyoléfine) ou oligomère de polyoléfine ou polyalcène terminée par au moins un groupement sélectionné dans le groupe formé par :
- une fonction $-X^a$, où X^a est sélectionné dans le groupe formé par : -OH, -NH₂, -NHR^a (R^a = alkyle ou aryle), -SH;
 - une fonction $-Y-C_6H_4X^b$, où
 - Y est O, S, CH₂ ou absent,
 - X^b est sélectionné dans le groupe formé par : -OH, -NH₂, -NHR^a, -SH, -CX^aR^aR^b, -C₆H₃R^c(CR^aX^a),
- 25 où R^b est sélectionné dans le groupe formé par -H, -Aryle, -Hétéroaryle, -Alkyle, et R^c est sélectionné dans le groupe formé par -H, -Alkyle, -O-Alkyle, -Aryle, -O-Aryle, -Hétéroaryle, -O-Hétéroaryle,
- une fonction $-CR^d=CH-CHX^a$ ou une fonction $-CR^dH-CH=CH-CHX^a$, où X^a est défini comme ci-dessus, et R^d est méthyle ou éthyle.
- 30
- 35 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que :
- ladite première extrémité de ladite chaîne peptidique ou protéique ou peptidomimétique est une première unité d'acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide,

- ladite chaîne peptidique ou protéique ou peptidomimétique est formée de n unités d'acide α , β ou γ -aminé et/ou acide α , β ou γ -hydroxylé et/ou α , β ou γ -mercapto acide, et
 - la deuxième extrémité de ladite chaîne peptidique est une autre unité d'acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide.
- 5
12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que lors de ladite élongation on ajoute une autre unité d'acide α , β ou γ -aminé ou acide α , β ou γ -hydroxylé ou α , β ou γ -mercapto acide à ladite deuxième extrémité à partir de leurs formes activées respectives.
- 10
13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que ledit peptide ou ladite protéine ou ledit peptidomimétique est obtenu par condensation d'un peptide ou protéine ou peptidomimétique ancré sur une molécule d'ancrage et d'un fragment de peptide ou protéine ou peptidomimétique convenablement protégé sur ses chaînes latérales.
- 15
14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, comprenant au moins une étape dans laquelle ladite chaîne peptidique ou protéique ou peptidomimétique fixée sur ladite molécule d'ancrage est séparée du milieu réactionnel par extraction dans un solvant organique (tels que : le cyclohexane, l'heptane, l'hexane(s)) par extraction ou lavage à l'eau ou un mélange eau/éthanol ou eau/acétonitrile ou par
- 20
- simple filtration.
15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, comprenant une étape dans lequel ledit peptide ou ladite protéine ou ledit peptidomimétique est décroché de ladite molécule d'ancrage.
16. Molécule susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des
- 25
- revendications 1 à 14.