

Procédé de synthèse de peptides

Domaine technique de l'invention

L'invention concerne le domaine de la chimie organique, et plus particulièrement de la synthèse de peptides ou protéines à partir d'acides aminés. L'invention porte sur un procédé de synthèse de peptides in vitro, en phase liquide, qui n'utilise pas de support solide ou de résine insoluble. Ce procédé est basé sur l'utilisation d'une nouvelle famille de molécules d'ancrage, à savoir des dérivés de polyoléfines ou oligomères de polyoléfines ou polycènes, qui, liée à un acide aminé ou un dérivé d'acide aminé, présentent une bonne solubilité dans des solvants apolaires, mais présentent une faible solubilité dans l'eau. Ce procédé permet d'obtenir des peptides plus purs et/ou plus faciles à purifier que les procédés connus sur support solide ou sur support liquide. Il est facile à automatiser.

15

Etat de la technique

La pharmacologie des peptides présente un énorme intérêt médical et économique, mais sur un plan scientifique elle reste à l'ombre de la biochimie des protéines et de la génétique. Malgré l'immense succès de l'insuline, une protéine naturelle formée de 51 acides aminés, le nombre de peptides qui ont été développés en tant que principes actifs pharmaceutiques est resté faible jusqu'à la fin du 20ème siècle. Cependant, une trentaine de nouveaux principes actifs constitués de peptides ont reçu une autorisation de mise sur le marché entre 2000 et 2016, et un nombre significatif de peptides fait l'objet d'essais cliniques et précliniques (voir la publication de A. Henninot et. al., « *The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future ?* » parue dans J. Med. Chem., 2018, 61, 4, 1382-1414). La plupart de ces candidats médicaments sont des peptides naturels connus pour leur fonction spécifique, d'autres sont dérivés de séquences naturelles, en encore d'autres sont totalement synthétiques.

20
25
30

Pour l'insuline, administrée à des millions de patients, la synthèse par des organismes génétiquement modifiés représente la voie royale pour obtenir

- des quantités industrielles suffisamment pures. Pour beaucoup d'autres peptides thérapeutiques, la synthèse *ab initio* (c'est-à-dire à partir des acides aminés individuels) est la principale méthode utilisée pour obtenir des quantités nécessaires. Dans ce contexte la pureté du peptide représente un enjeu technique et économique majeur pour la méthode de synthèse choisie. Dans le même temps, le facteur environnemental devient un enjeu sociétal de plus en plus fort. C'est pourquoi, les chimistes sont à la recherche de procédé en phase avec ce critère (voir la publication de A. Isidro-Llobet et al., « *Sustainability Challenges in Peptide Synthesis and Purification : From R&D to Production* », parue dans J. Org. Chem., 2019, 84, 4615-4628). La purification d'un peptide (qui se fait en général par chromatographie en phase liquide à haute performance, CLHP) peut représenter une fraction importante du coût de revient du produit fini mais également générer des déchets.
- Il existe deux grandes méthodologies de synthèse peptidique qui se distinguent par l'état physique de la phase où a lieu les réactions chimiques : la phase liquide (cette synthèse est aussi appelée « synthèse en solution ») et la phase solide (cette synthèse est aussi appelée « synthèse sur support solide »).
- Tous les acides aminés ont au moins deux fonctions chimiques réactives : la fonction amine (centre $N\alpha$) et la fonction acide carboxylique (C-terminal). Certains acides aminés ont en plus des chaînes latérales susceptibles de réagir avec les centres $N\alpha$ ou C-terminal. La clé d'une stratégie de synthèse de peptides réside dans le choix des groupements protecteurs (appelés aussi groupes de protection) par lesquels les centres réactifs sont protégés pendant certaines étapes du procédé. Ainsi, chaque addition d'un acide aminé nécessite un cycle d'étapes : protection – activation/couplage – déprotection. En fin de synthèse, les groupements protecteurs sont clivés pour générer le peptide cible. Ainsi, selon l'état physique de la phase où a lieu la synthèse peptidique, le cycle de base commun : protection – activation/couplage – déprotection est invariable mais seul diffère le

groupement protecteur utilisé. Plus précisément, un tel cycle comprend plusieurs étapes :

- La protection de la fonction amine ($N\alpha$) de l'acide aminé par un groupement protecteur clivable après la réaction de condensation de l'acide aminé ;
- Si nécessaire, la protection de la chaîne latérale par un groupement protecteur clivable en fin de synthèse du peptide ;
- L'activation de la fonction acide carboxylique de l'acide aminé protégé $N\alpha$, puis sa condensation avec un dérivé d'acide aminé ou un peptide dont la fonction amine $N\alpha$ est libre et dont la fonction acide carboxylique est protégée ;
- A la fin de l'itération (activation/couplage – déprotection) de tous les acides aminés de la séquence, le peptide cible est obtenu par déprotection totale des groupements protecteurs.

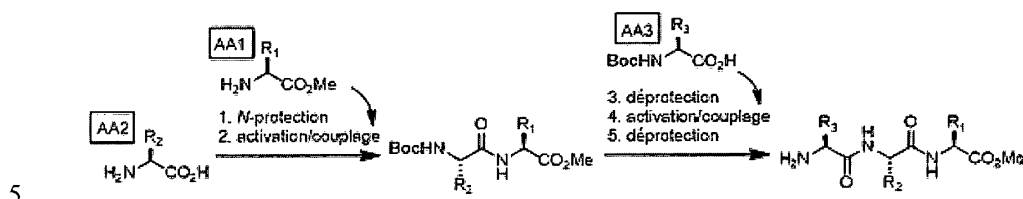
- 15 Le cycle de protection – activation/couplage – déprotection est expliqué ici pour l'exemple de la synthèse d'un tripeptide.

Selon la stratégie en solution dite « Boc » montrée sur le schéma réactionnel 1, on approvisionne un premier, un deuxième et un troisième acide aminé (appelés ici AA1, AA2 et AA3). On protège la fonction amine ($N\alpha$) de l'acide aminé AA2 temporairement par un groupement *tert*-butoxycarbonyle (appelé couramment « Boc »). Puis on active la fonction acide carboxylique (C-terminal) dudit acide aminé protégé que l'on condense avec la fonction amine ($N\alpha$) libre (i.e. non protégée) d'un ester méthylique de l'acide aminé AA1, ce qui génère un dipeptide. Ensuite on déprotège la fonction amine ($N\alpha$) de l'acide aminé AA2 (i.e. on clive le groupement protecteur Boc avec un acide, tel que l'acide trifluoroacétique) du dipeptide formé. On protège la fonction amine ($N\alpha$) de l'acide aminé AA3. Puis on active la fonction acide carboxylique (C-terminal) de l'acide aminé AA3 que l'on couple avec la fonction amine ($N\alpha$) de l'acide aminé AA2 (du dipeptide déprotégé) pour générer le tripeptide protégé. Après la déprotection du groupement Boc porté par AA3, on obtient un tripeptide. Ce processus comprend un minimum de cinq étapes réactionnelles, dont deux étapes

(activation/couplage – déprotection) pour chaque acide aminé additionnel ajouté au peptide.

[Chem 1]

Schéma réactionnel 1 :



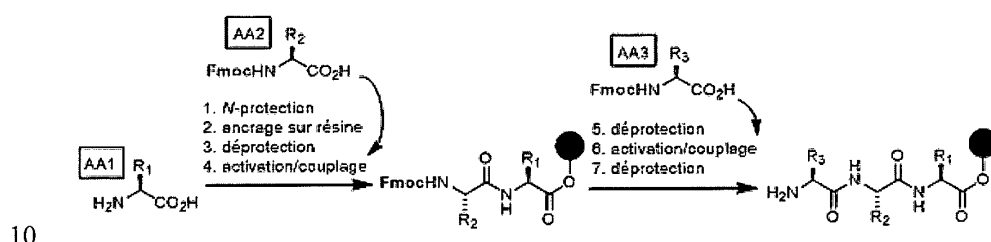
Ce procédé peut se dérouler avec ancrage de l'acide aminé AA1 sur un support solide ou sur une molécule organique solubilisante en phase liquide.

- 10 Le fluorénylméthoxycarbonyle peut être utilisé comme groupement protecteur de la fonction amine, selon la stratégie dite « Fmoc » montrée sur le schéma réactionnel 2. Cette stratégie convient particulièrement pour la synthèse sur support solide. On approvisionne un premier, un deuxième et un troisième acide aminé (AA1, AA2 et AA3). Tout commence par la
- 15 protection de la fonction amine (N α) de l'acide aminé AA1 par un groupement fluorénylméthoxycarbonyle (appelé couramment « Fmoc »), puis son ancrage sur une résine solide (symbolisée sur le schéma réactionnel 2 par le cercle noir) via sa fonction acide carboxylique (C-terminal), formant une liaison covalente de type ester ou amide avec une fonction chimique de
- 20 la résine fonctionnalisée (alcool ou amine). On déprotège la fonction amine (N α) de l'acide aminé ancré sur la résine. Ensuite, on protège la fonction amine (N α) de l'acide aminé AA2 par un groupement protecteur Fmoc. Le dérivé obtenu est couplé via l'activation de son acide carboxylique (C-terminal), à la fonction amine (N α) de l'acide aminé AA1 ancré sur la résine,
- 25 ce qui génère un dipeptide N-protégé et ancré sur la résine. On clive le groupement Fmoc du dipeptide (sur AA2). La protection de la fonction amine (N α) de l'acide aminé AA3 par un groupement Fmoc est suivie de l'activation

de son acide carboxylique (C-terminal) puis, on procède au couplage de l'espèce obtenue avec le dipeptide ancré et ayant la fonction amine libre, générant ainsi un tripeptide N-protégé, qui reste fixé sur le support solide par la fonction acide (C-terminal) de son acide aminé AA1. Ce procédé comprend un minimum de sept étapes réactionnelles, dont deux (activation/couplage – déprotection) pour chaque acide aminé additionnel ajouté au peptide.

[Chem 2]

Schéma réactionnel 2 :



Ces deux voies de synthèse sont bien 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). Elles peuvent être mises en œuvre en phase liquide ou sur support solide (dans ce cas l'acide aminé est fixé sur un support solide, i.e. synthèse de Merrifield). En pratique, les acides aminés sont approvisionnés à l'état protégé par le groupement Fmoc ou Boc, et engagés directement dans les réactions d'activations/couplages dans cet état protégé.

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 α) par un groupement benzyloxycarbonyle et l'activation de leur fonction acide carboxylique (C-terminal) par un ester nitrophénylique. Tous les

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 faible rendement. A titre d'exemple, on peut citer la synthèse de l'ACTH avec un rendement global d'environ 7%, décrite par Schwyzer et Sieber (Helv. Chim. Acta 1966, 49, 134-158).

Une modification de cette méthodologie a été rapportée par Beyermann 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-protégé ($N\alpha$), dans l'optique d'améliorer le rendement. Finalement, bien que les rendements des réactions de couplage soient augmentés, on constate une perte de solubilité en phase organique lorsque le peptide formé atteint environ cinq acides aminés.

Pour gagner en solubilité, l'acide aminé ou la protéine peut être lié à un groupement protecteur dit solubilisant, tel que la phénylazobenzyl sulfonylethoxy (OPSE), décrit dans EP 0 017 536 (CM Industries). En effet, ce groupement protecteur permet la solubilisation de l'acide aminé ou du peptide synthétisé dans le N,N-diméthylformamide. Après chaque itération (activation/couplage – déprotection), la purification se fait par précipitation et filtration des solides, ce qui engendre des difficultés opératoires.

Une approche faisant usage d'un polymère linéaire non réticulé, tel que le polyéthylène glycol (PEG), afin de maintenir l'acide aminé ou le peptide en solution, a été décrite par Mutter et Bayer (Nature 1972, 237, 512-513). Dans ce cas aussi, les sous-produits sont éliminés par précipitation ou ultracentrifugation.

Plus récemment, EP 2 612 845 A1 et US 2014/0296483 (Ajinmoto Co., Inc.) ont décrit de nouveaux groupements protecteurs (ou molécules d'ancrage) permettant la solubilisation de l'acide aminé et du peptide. Ainsi, selon la molécule d'ancrage utilisée, la purification se fait soit par simple lavage à l'eau, soit par précipitation et filtration. Grâce à ces groupements protecteurs

très lipophiles de la fonction acide carboxylique, la bivalirudine, un anticoagulant constitué de 20 résidus d'acides aminés a été préparée avec un rendement global de 73% et une pureté de 84% (voir D. Takahashi et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2017, 56, 7803-7807). Malgré les avantages de cette

5 technique, sa limite, à savoir le nombre de résidus d'acides aminés susceptibles d'être ancré, reste inconnu. De plus, le coût financier et le coût environnemental de ces molécules d'ancrage constituent un handicap.

D'autres stratégies de couplage d'acides aminés sont connues. A titre d'exemple, on peut utiliser des groupements bi-fonctionnels qui à la fois,

10 activent la fonction acide carboxylique (C-terminal) et protège la fonction amine ($N\alpha$) de l'acide aminé, en formant des structures cycliques intermédiaires hautement réactives. Généralement, celles-ci réagissent facilement avec la fonction amine ($N\alpha$) d'un second dérivé d'acide aminé pour former un dipeptide. Malheureusement, les espèces obtenues sont très

15 réactives et souvent une réaction indésirable de polymérisation à lieu. Parmi les groupements bi-fonctionnels qui ont été décrits, on peut citer le phosgène (voir R. B. Woodward et C. H. Schramm, J. Am. Chem. Soc., 1947, 69, 1551-1552), le dichlorodiméthylsilane (voir S.H. van Leeuwen et al., Tetrahedron Letters 2002, 43, 9203-9207), l'hexafluoroacétone (voir J. Spengler et al.,

20 Chem. Rev., 2006, 106, 4728-4746) et le formaldéhyde (voir J. M. Scholtz, P. A. Bartlett, Synthesis 1989, 542-544).

La synthèse peptidique en phase solide a été décrite par Merrifield (J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 2149-2154). Elle consiste à fixer la fonction acide carboxylique (C-terminal) du premier acide aminé ou du peptide sur une

25 résine (support) insoluble. En conséquence, les réactifs sont utilisés en excès afin de s'assurer de la conversion totale des étapes d'activations/couplages. Les purifications se font par simple filtration et lavage de la résine. Bien que cette technique soit automatisable et plus simple, de nombreux inconvénients existent tels que le coût et la perte des

30 réactifs utilisés en excès, et le manque d'homogénéité des peptides synthétisés car il est quasiment impossible d'obtenir des peptides homogènes : on dit que le système est dégénéré. De plus, la purification en

chromatographie en phase liquide à haute performance préparative de ces peptides hétérogènes est onéreuse car très consommatrice en solvants et écologiquement peu acceptable.

Sachant que chaque étape réactionnelle est rarement quantitative et donc engendre des pertes qui se cumulent tout le long de la synthèse, et sachant que chaque étape implique des réactifs en solution (agents de couplage et produits secondaires) dont l'élimination est problématique, il serait intéressant de disposer d'un procédé plus simple, engendrant à la fois des peptides de haute pureté, un coût de production moindre et plus écologiquement compatible. Ce procédé devrait convenir pour tous types d'acides aminés naturels et pour un large spectre d'acides aminés non naturels. Tel est l'objectif de la présente invention.

Il convient de souligner que dans le cas d'un peptide thérapeutique, un rendement inférieur à 100 % implique non seulement la perte de réactifs, mais également la formation de produits secondaires qui peuvent être difficiles à séparer du peptide cible ; dans la mesure où l'on souhaite avoir des peptides aussi purs que possible pour caractériser clairement leurs effets biologiques, cela veut dire que soit on accepte le surcoût que présente la purification, soit on accepte la présence d'impuretés susceptibles d'engendrer un risque d'erreur d'appréciation des effets biologiques observés.

Le problème que la présente invention cherche à résoudre est de présenter une méthode de synthèse de peptides ou protéines plus purs, à plus fort rendement, plus écologique, moins coûteuse et qui soit automatisable. Ce procédé doit convenir au moins pour tous les acides aminés naturels et de préférence pour un large spectre d'acides aminés non naturels. Cette méthode ne devrait pas faire intervenir des molécules d'ancrage ou supports coûteux ou difficiles à synthétiser.

Objet de l'invention

La présente invention propose de résoudre les difficultés laissées dans l'art antérieur par l'utilisation de polyoléfines ou oligomères de polyoléfines ou

polyalcènes pour la production de peptides ou protéines de haute pureté en phase liquide. En effet, les inventeurs ont trouvé que l'utilisation de polyoléfines, et en particulier de dérivés de polyisobutènes (PIB), comme molécules d'ancrage ou support liquide, permet la solubilisation des acides aminés et la synthèse de peptides en solution organique (solvants halogénés et non halogénés), tout en facilitant leur purification par simple extraction ou lavage, en l'occurrence avec de l'eau ou un mélange eau/éthanol ou eau/acétonitrile, ou par simple filtration. En outre, certaines de ces molécules d'ancrage (notamment certains dérivés de polyisobutènes (PIB)) sont des produits disponibles dans le commerce ou alors leur synthèse est simple, directe et peu coûteuse.

L'objet de l'invention est dès lors un procédé de synthèse de peptides ou protéines par élongation successive de la deuxième extrémité ($N\alpha$) d'une chaîne peptidique dont la première extrémité est fixée, par l'intermédiaire de sa fonction acide carboxylique (C-terminal) ou de sa fonction amine ($N\alpha$), sur une molécule d'ancrage soluble dans un solvant apolaire, caractérisé en ce que ladite molécule d'ancrage comporte une chaîne polyoléfine avec au moins 10 unités de monomères, et de préférence entre 15 et 50 unités. Avantageusement elle est fonctionnalisée à l'une de ses extrémités, pour permettre l'ancrage du premier acide aminé.

Avantageusement ladite molécule d'ancrage est une polyoléfine.

Avantageusement ladite molécule d'ancrage ne comporte qu'une seule chaîne polyoléfine ; cette chaîne polyoléfine peut ainsi être obtenue par une simple réaction de polymérisation (de l'isobutène).

Ladite molécule d'ancrage peut comprendre dans chacune de ses unités des groupements alkyles identiques ou non, qui sont de préférence sélectionnés dans le groupe formé par le méthyle et l'éthyle. Ladite chaîne polyoléfine présente avantageusement une masse moléculaire moyenne en masse comprise entre 600 et 20 000, et de préférence entre 700 et 15 000. Ladite chaîne polyoléfine peut comprendre un nombre de liaisons carbone-carbone

insaturées ne dépassant pas 5 %, et de préférence ne dépassant pas 3 %. De préférence il s'agit d'une chaîne de polyisobutène.

Dans un mode de réalisation avantageux du procédé selon l'invention, ladite
5 molécule d'ancrage comporte une chaîne polyoléfine (ou est une chaîne polyoléfine) qui est terminée par un groupement sélectionné dans le groupe formé par :

- une fonction $-X$, où X est sélectionnée dans le groupe formé par : $-OH$, $-NH_2$, $-SH$;
- 10 ○ une fonction $-Z-C_6H_4X^1$, où
 - Z est O ou absent,
 - X^1 est sélectionnée dans le groupe formé par : $-OH$, $-NH_2$, $-SH$, $-NH-NH_2$, $-CXRR^1$, $-C_6H_3R'(CRX)$ où X est sélectionné dans le groupe formé par $-OH$, $-NH_2$, $-SH$, et R est sélectionné dans le groupe formé par $-H$, Aryl, Hétéroaryl, et R' est sélectionné dans le groupe formé par $-H$, Alkyl, $-O$ -Alkyl, Aryl, $-O$ -Aryl, Hétéroaryl, $-O$ -Hétéroaryl,
- 15 ○ une fonction $-CR''=CH-CHX$ ou une fonction $-CR''H-CH=CH-CHX$, où X est sélectionné dans le groupe formé par $-OH$, $-NH_2$, $-SH$, et R'' est méthyle ou éthyle.
- 20

Ce groupement représente alors la fonctionnalisation de la chaîne polyoléfine.

Ladite première extrémité de ladite chaîne peptidique est une première unité
25 d'acide aminé $AA1$; c'est sur ce premier acide aminé $AA1$ qu'est lié la molécule d'ancrage, soit sur sa fonction acide carboxylique (C-terminal), soit sur sa fonction amine ($N\alpha$). Ladite chaîne peptidique est formée de n unités d'acide aminé; sa deuxième extrémité est une autre unité d'acide aminé AA_n . Lors du déroulement du procédé la chaîne peptidique s'allonge par
30 élongation successive, et pendant chacune de ces étapes d'élongation on ajoute une autre unité d'acide aminé $AA(n+1)$ à ladite deuxième extrémité.

La fonction amine ($N\alpha$) des acides aminés engagée dans le procédé selon l'invention peut être protégée par un groupement Boc ou Fmoc, ou par tout autres groupements protecteurs appropriés.

On peut utiliser dans ladite chaîne peptidique des acides aminés naturels
5 et/ou non naturels et/ou synthétiques.

Le procédé selon l'invention comprend au moins une étape dans laquelle ladite chaîne peptidique est fixée sur ladite molécule d'ancrage et est séparée du milieu réactionnel par extraction dans un solvant apolaire.

Le procédé selon l'invention permet d'obtenir des peptides ou protéines très
10 purs, qui sont clivés de leur molécule d'ancrage après la dernière étape d'élongation de la chaîne peptidique, pour être utilisés selon leur destination, par exemple en tant que principe actif pour des essais précliniques ou cliniques.

15 Description détaillée

Définitions

Dans le cadre de la présente invention, nous entendons par « acide aminé » : les acides aminés naturels et les acides aminés non naturels. Les acides aminés « naturels » comprennent la forme L des acides aminés qui peuvent
20 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
25 (Tyr) et valine (Val).

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

Abu = acide 2-aminobutyrique $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{COOH})(\text{NH}_2)$

iPr = Isopropyl-lysine $(\text{CH}_3)_2\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{COOH})(\text{NH}_2)$

Aib = acide 2-aminoisobutyrique

F-trp = N-formyl-tryptophane

Orn = ornithine

5 Nal2 = 2-naphthylalanine

Les acides aminés « non naturels » comprennent aussi tous les acides aminés synthétiques.

Le terme « acide aminé protégé » est utilisé ici aussi pour désigner des
10 acides aminés temporairement protégés, comme cela est décrit ci-dessus, notamment ; par exemple la fonction amine ($\text{N}\alpha$) peut être protégée par un groupement Fmoc, Boc, benzyle ou tous autres groupements protecteurs appropriés.

15 Le procédé de préparation de peptides selon l'invention utilise des polyoléfines, ou plus précisément des oligomères de polyoléfines (les polyoléfines étant appelés aussi polyalcènes), et leurs dérivés comme molécules d'ancrage ou groupement protecteur que ce soit de la fonction acide carboxylique (C-terminal) de l'acide aminé ou du peptide, ou de la
20 fonction amine ($\text{N}\alpha$) de l'acide aminé ou du peptide, ou de la chaîne latérale dudit acide aminé ou peptide (sous forme de liaisons ester, amide, éther, thioéther ou toutes autres fonctions) en phase liquide. Les molécules de polyoléfines comprennent une chaîne d'atomes de carbone reliés par des liaisons simples. Elles peuvent comprendre des ramifications constituées de
25 groupements alkyles identiques ou différents, mais de préférence identiques. De préférence on utilise des polymères avec un nombre d'unités de monomères d'au moins 10 et de préférence compris entre 15 et 50. On préfère des homopolymères, mais on peut également utiliser des copolymères, et dans ce dernier cas le nombre de liaisons insaturées dans la
30 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 dérivés de polypropylènes.

Ces molécules d'ancrage sont de préférence employées dans le procédé
5 selon l'invention sous la forme de dérivés fonctionnalisés, comme cela sera expliqué en plus grand détail par la suite.

Selon l'invention, ces molécules d'ancrage sont liées à la fonction acide carboxylique d'un acide aminé (C-terminal) ou à la fonction amine ($N\alpha$) par
10 une liaison covalente de type amide, ester, benzyle, allyle ou toutes autres fonctions. Cela suppose que les molécules d'ancrage soient engagés sous une forme convenablement fonctionnalisée, qui est appelé dans la présente description « dérivés de PIB », sachant que ce terme englobe ici aussi les dérivés de molécules d'ancrage qui ne sont pas des dérivés du
15 polyisobutène, mais qui sont des dérivés d'autres polyoléfines selon la définition qui est donnée ci-dessus. Cette fonctionnalisation de la 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 sera décrite ci-dessous.

20 Les oligomères de polyoléfines utilisés comme molécule d'ancrage sont typiquement caractérisés par une masse moléculaire moyenne en masse, mais on peut aussi également utiliser des oligomères « purs » qui comportent des molécules identiques d'une longueur de chaîne donnée.

Cette réaction entre le dérivé de PIB et l'acide aminé conduit à un produit
25 caractérisé par le fait que lorsque le dérivé de PIB est lié à un acide aminé ou un dérivé d'acide aminé, ayant éventuellement une chaîne latérale protégée, on obtient une molécule dont la solubilité dans l'eau est faible (< 30 mg/ml).

30 Plus précisément, le procédé de synthèse de peptides, éventuellement protégés, en phase liquide (solution) selon l'invention est caractérisé par le fait que l'on solubilise un acide aminé ou un peptide en milieu organique par

un dérivé de PIB lié à la fonction acide carboxylique (C-terminal) ou à la fonction amine ($N\alpha$) de l'acide aminé ou du peptide. Le dérivé de PIB agit comme molécule d'ancrage ou support liquide de l'acide aminé ou du peptide qui est synthétisé par accrochage successif d'acides aminés sur le dernier
5 acide aminé fixé sur cette molécule ancrée. Ainsi, la molécule d'ancrage sert également comme groupement protecteur pendant la synthèse du peptide au cours d'itérations successives.

L'acide aminé ou le peptide éventuellement protégé, ancré sur une molécule
10 de PIB est caractérisé en ce que la fonction acide carboxylique (C-terminal) ou la fonction amine ($N\alpha$) dudit acide aminé ou peptide est lié par une liaison covalente de type ester, amide, benzyle, allyle ou toutes autres fonctions chimiques à un dérivé de PIB lipophile, donnant une solubilité dans l'eau très faible (< 30 mg/ml). C'est en ce sens que dans le procédé selon l'invention,
15 ladite molécule d'ancrage, qui est de préférence un dérivé de PIB, agit comme un support liquide pour la synthèse de peptides ou protéines.

Cette dérivation de l'acide aminé ($N\alpha$ -protégé ou non) ou du peptide ($N\alpha$ -protégé ou non) avec le dérivé de PIB augmente de manière significative la
20 solubilité dudit acide aminé ou dudit peptide en phase liquide organique apolaire. Plus précisément, ces acides aminés et ces peptides deviennent solubles dans des solvants organiques, tels que les solvants halogénés (chlorure de méthylène, chloroforme), l'acétate d'éthyle, le tétrahydrofurane, le cyclohexane, l'hexane(s) ou des solvants aromatiques tels que le benzène
25 ou le toluène. En conséquence, les acides aminés et les peptides accrochés à un dérivé de PIB ont un haut coefficient de partage pour la phase organique lors d'une extraction/décantation en présence d'eau ou d'un mélange eau/éthanol ou encore eau/acétonitrile, permettant ainsi leur purification simple et rapide.

30

La présente invention propose aussi un procédé de synthèse de peptides (protégés ou non), en phase liquide, caractérisé en ce que l'on part d'un

acide aminé ou d'un peptide en solution (ou d'un dérivé d'acide aminé ou de peptide en solution), qui sera lié à l'une des molécules d'ancrage tel que défini précédemment, par l'intermédiaire de la fonction acide carboxylique (C-terminal) ou de la fonction amine ($N\alpha$) du dérivé de l'acide aminé ou du peptide de départ, et que l'on additionne ou condense les acides aminés ou les peptides suivants, qui sont protégés sur leur fonction amine ($N\alpha$) et éventuellement sur leur chaîne latérale, après l'activation de leur fonction acide carboxylique (C-terminal).

10 L'activation de la fonction acide carboxylique (C-terminal) de l'acide aminé $N\alpha$ -protégé ou du peptide peut être réalisée par toutes les techniques connues de synthèse via la formation d'un anhydride au moyen de divers réactifs tels que : carbodiimide, chlorure d'acide, chloroformiate d'alkyle, ou toute autre technique d'activation d'un acide aminé $N\alpha$ -protégé.

15

Le procédé de synthèse de peptides selon l'invention est également caractérisé par le fait que l'on additionne ensuite les acides aminés ou les peptides à condenser. Ces acides aminés ou peptides étant activés sur leur fonction acide et protégés sur leur fonction amine ($N\alpha$), et protégés si nécessaire aussi sur leur chaîne latérale.

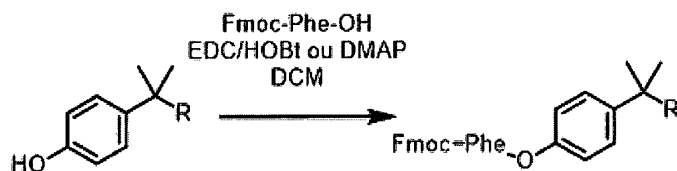
20

Nous présentons ici le procédé selon l'invention étape par étape, en utilisant un exemple dans lequel on vise un tripeptide H-Tyr-Gly-Phe-OH, en utilisant soit les groupements protecteurs Boc ou Fmoc.

25 Le schéma réactionnel 3 montre la première étape du couplage de la fonction acide du premier acide aminé (AA1), en l'occurrence la phénylalanine (Phe), sur un dérivé de PIB fonctionnalisé par un phénol. L'acide aminé AA1 est engagé à l'état protégé par un groupement Fmoc.

30 [Chem 3]

Schéma réactionnel 3 :

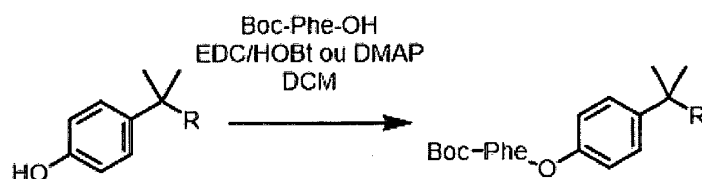


Dans ce schéma réactionnel DCM signifie dichlorométhane, EDC signifie 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide, HOBt signifie hydroxy-benzotriazole et DMAP signifie 4-diméthyl-aminopyridine.

- 5 Le schéma réactionnel 4 montre la variante dans laquelle AA1 est engagé à l'état protégé par un groupement Boc.

Chem 4]

Schéma réactionnel 4 :



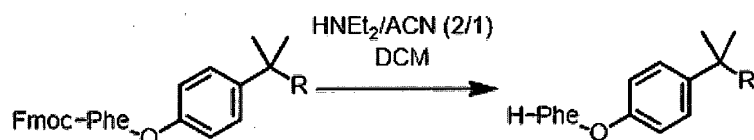
10

Dans une deuxième étape le groupe de protection (Fmoc ou Boc) est clivé pour libérer la fonction amine ($N\alpha$) de AA1. Cette étape dite de déprotection est illustrée sur les schémas réactionnel 5 pour le cas du Fmoc et 6 pour le cas du Boc. Elle conduit à une molécule que nous appelons ici

15 PIB-AA1.

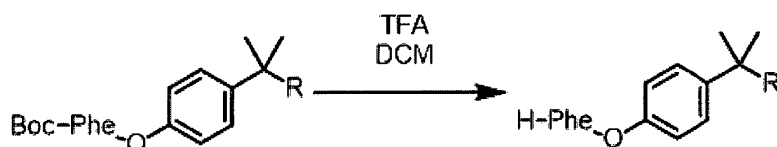
[Chem 5]

Schéma réactionnel 5 :



[Chem 6]

Schéma réactionnel 6 :



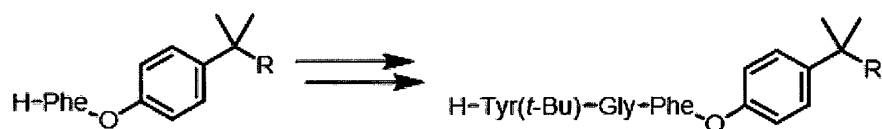
ACN signifie acétonitrile, HNEt₂ signifie diéthylamine et TFA signifie acide trifluoroacétique.

Dans une troisième étape on répète la première étape en ajoutant à la molécule PIB-AA1, le deuxième acide aminé (appelé ici AA2), en l'occurrence la glycine (Gly) à l'état protégé (Boc ou Fmoc) ; la fonction acide (C-terminal) de AA2 (dont la fonction N α est protégée) se lie à la fonction N-terminale de PIB-AA1. Dans une quatrième étape la fonction N α de PIB-AA1-AA2 est déprotégée, générant le dipeptide PIB-AA1-AA2 ancré sur son support.

Dans une cinquième étape on répète la première étape en ajoutant à la molécule PIB-AA1-AA2, le troisième acide aminé (appelé ici AA3), en l'occurrence la tyrosine protégée sur sa chaîne latérale par un groupement *tert*-butyle, à l'état protégé (Boc ou Fmoc) ; la fonction acide (C-terminal) de AA3 (dont la fonction N α est protégée) se lie à la fonction N α de PIB-AA1-AA2. Dans une sixième étape, la fonction N α de PIB-AA1-AA2-AA3 est déprotégée, et on obtient le tripeptide ancré montré sur le schéma réactionnel 7.

[Chem 7]

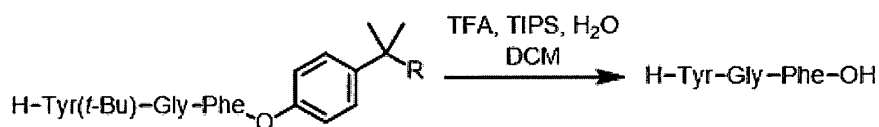
Schéma réactionnel 7 :



- On voit aisément que ce procédé permet, par des itérations successives, d'ajouter à l'acide aminé puis au peptide accroché sur le dérivé de PIB, des acides aminés successifs, pour obtenir ainsi un peptide ayant la séquence voulue. Le peptide étant accroché sur le support liquide, il peut être séparé à tout moment, et notamment après la dernière itération, de tous produits polaires par extraction dans un solvant apolaire. A la fin de cette séquence d'élongation on peut détacher le peptide du polymère support ; ainsi le peptide perd sa solubilité dans une phase apolaire, et on peut le séparer du polymère support, pour l'utiliser conformément à sa destination.
- 10 Cette réaction de décrochage du peptide de son support liquide est illustrée sur le schéma réactionnel 8 pour le cas du tripeptide du schéma réactionnel 7. On peut utiliser un mélange d'acide trifluoroacétique (TFA), de triisopropylsilane (TIPS) et d'eau.

15 [Chem 8]

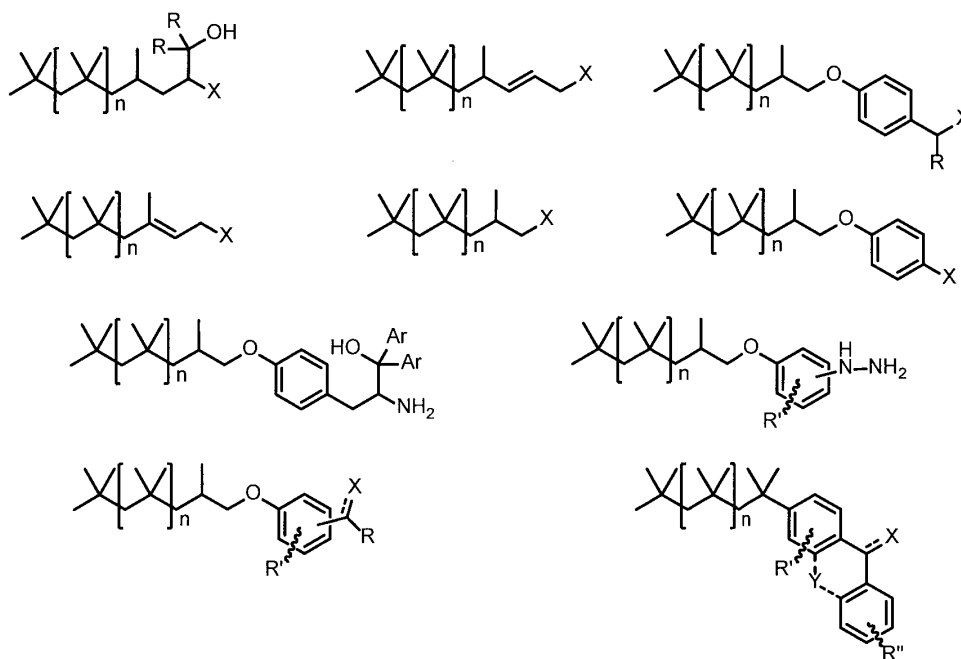
Schéma réactionnel 8 :



Le schéma 9 montre un certain nombre de dérivés de PIB avec leur fonctionnalisation qui conviennent en tant que support liquide pour exécuter la présente invention.

20

[Chem 9]



Dans ces formules :

- X est un groupement sélectionné dans le groupe formé par : OH, NH₂, NH-NH₂ , SH ;
- R est un groupement sélectionné dans le groupe formé par : H, aryl, hétéro-aryl ;
- R' est un groupement sélectionné dans le groupe formé par : H, alkyl, O-alkyl, hétéro-aryl, O-(hétéro-aryl) ;
- R'' est un groupement sélectionné dans le groupe formé par : H, alkyl, O-alkyl, hétéro-aryl, O-(hétéro-aryl),
- Y est un groupement sélectionné dans le groupe formé par : O, CH₂CH₂.
- le nombre n est un nombre entier qui est typiquement supérieur à 10, et avantageusement compris entre 15 et 50.

15

En particulier, X peut être une amine libre, une hydrazine, 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 $-X$, $-Z-C_6H_4X^1$ ou $-CR''=CH-CHX$ 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 d'environ 20 000 ces molécules présentent une viscosité trop grande, ce qui risquerait de limiter leur solubilité dans les solvants (halogénés ou non) utilisés pour l'étape d'activation/couplage.

Certains dérivés de PIB utilisables 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 $-CH_2-C(CH_3)(H)-CH_2-OH$ (i.e. isopropanol) et par un groupement $-CH_2-C(CH_3)_2-C_6H_5-OH$ (i.e. phénol).

Les molécules d'ancrage préférées, à savoir les dérivés de polyisobutène, peuvent être préparés à partir de l'isobutène biosourcé. Le concept de la teneur biosourcée est défini dans la norme ISO 16620-1 :2015 « *Plastiques – Teneur biosourcée – partie 1 : Principes généraux* », notamment par une définition des termes « polymère synthétique biosourcé », « teneur en polymère synthétique biosourcé », « teneur en carbone biosourcé » et « teneur en masse biosourcée », ainsi que dans les normes ISO 16620-2 :2015 « *Plastiques – Teneur biosourcée – partie 2 : Détermination de la teneur en carbone biosourcé* » et ISO 16620-3 :2015 « *Plastiques – Teneur biosourcée – partie 3 : Détermination de la teneur en polymère synthétique biosourcée* », pour les méthodes de détermination et quantification du caractère biosourcé.

Avantageusement, les molécules d'ancrage présentent une teneur en carbone biosourcé supérieure à 90%, de préférence supérieure à 93%, et encore plus préférentiellement supérieure à 95%.

exemple $-X$, $-Z-C_6H_4X^1$ ou $-CR''=CH-CHX$ 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 d'environ 20 000 ces molécules présentent une viscosité trop grande, ce qui risquerait de limiter leur solubilité dans les solvants (halogénés ou non) utilisés pour l'étape d'activation/couplage.

Certains dérivés de PIB utilisables 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 $-CH_2-C(CH_3)(H)-CH_2-OH$ (i.e. isopropanol) et par un groupement $-CH_2-C(CH_3)_2-C_6H_5-OH$ (i.e. phénol).

Les molécules d'ancrage préférées, à savoir les dérivés de polyisobutène, peuvent être préparés à partir de l'isobutène biosourcé. Le concept de la teneur biosourcée est défini dans la norme ISO 16620-1 :2015 « *Plastiques – Teneur biosourcée – partie 1 : Principes généraux* », notamment par une définition des termes « polymère synthétique biosourcé », « teneur en polymère synthétique biosourcé », « teneur en carbone biosourcé » et « teneur en masse biosourcée », ainsi que dans les normes ISO 16620-2 :2015 « *Plastiques – Teneur biosourcée – partie 2 : Détermination de la teneur en carbone biosourcé* » et ISO 16620-3 :2015 « *Plastiques – Teneur biosourcée – partie 3 : Détermination de la teneur en polymère synthétique biosourcée* », pour les méthodes de détermination et quantification du caractère biosourcé.

Avantageusement, les molécules d'ancrage présentent une teneur en carbone biosourcé supérieure à 90%, de préférence supérieure à 93%, et encore plus préférentiellement supérieure à 95%.

Le procédé selon l'invention présente de nombreux avantages.

Un premier avantage est qu'il permet une production de peptide en phase liquide, où le peptide ($N\alpha$ -protégé ou non) lié à la molécule d'ancrage, définie
5 précédemment, reste en solution organique.

Un second avantage est qu'il permet d'obtenir des peptides de haute pureté par un simple lavage 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 survenant par
10 exemple pendant la déprotection de la fonction amine) qui ne sont pas liés au dérivé de polyoléfines ou oligomères de polyoléfines ou polycènes et des réactifs en excès de la phase organique. Des solvants organiques tels que le cyclohexane, l'heptane(s), l'hexane(s) qui ont des points éclair $< 15^{\circ}\text{C}$, sont appropriés pour solubiliser les dérivés de polyoléfines ou
15 d'oligomères de polyoléfines ou polycènes pendant l'extraction ou le lavage. Le procédé selon l'invention permet donc d'éviter toutes les étapes de purification 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 voire des protéines, en
20 ajustant la longueur du dérivé de polyoléfines ou oligomères de polyoléfines ou polycènes, en les rendant plus lipophiles.

Un autre avantage est la possibilité de contrôler la pureté du peptide 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
25 que la spectrométrie de masse, la chromatographie en phase liquide à haute performance, la résonance magnétique nucléaire du proton ou du carbone-13).

Encore un autre avantage est que les molécules d'ancrage préférées, à savoir les dérivés de polyisobutène, peuvent être préparés à partir de
30 l'isobutène biosourcé, comme cela a été expliqué ci-dessus.

D'autres avantages sont la possibilité d'automatiser le procédé selon l'invention, et la possibilité de recycler les molécules d'ancrage (polyoléfines

ou oligomères de polyoléfines ou polyalcènes). En effet, lorsque la série d'itérations pour obtenir la séquence du peptide cible est achevée, le peptide est déprotégé de ses groupements protecteurs et finalement de la molécule d'ancrage par une des réactions habituellement utilisées en synthèse peptidique (telles que l'hydrolyse, la saponification, l'hydrogénolyse), ce qui libère la molécule d'ancrage. Ainsi, la molécule d'ancrage peut être recyclée. Grâce à leur haute pureté, les peptides ou protéines produits par ce procédé peuvent être utilisés en tant que produits pharmaceutiques (médicaments et vaccins), produits cosmétiques, produits phytosanitaires ou produits agroalimentaires, ou pour accéder à l'un quelconque de ces produits.

Exemples

Ces exemples illustrent des modes de réalisation de l'invention, mais ne limitent pas sa portée. Les exemples 1 et 2 illustrent deux variantes de la réaction de couplage du premier acide amine (AA1) du peptide cible (engagé dans la réaction sous la forme N α -protégé par le Fmoc ou le Boc) avec un support liquide (en l'occurrence un dérivé de PIB). Les exemples 3 et 4 illustrent deux variantes de la déprotection de l'acide aminé suivant (AA2), engagé dans la réaction sous la forme N α -protégé par le Fmoc ou le Boc (appelé ici, respectivement, « dérivé de Fmoc » ou « dérivé de Boc »). L'exemple 5 illustre le décrochage du peptide de la molécule d'ancrage, conformément au schéma réactionnel 8 ci-dessus.

Ces exemples utilisent des solvants chlorés, à savoir le DCM. Des résultats similaires ont été obtenus avec des solvants de nocivité moindre, tels que : tétrahydrofurane, 2-méthyltétrahydrofurane, carbonate d'éthylène, purs ou en mélange.

Exemple 1 : Réaction de couplage utilisant EDC/HOBt

L'acide aminé N α -protégé (Fmoc-AA-OH ou Boc-AA-OH) (1,3 mmol) a été dissous dans le DCM (5 mL) sous agitation magnétique et sous atmosphère d'azote, puis refroidi à 0°C dans un bain de glace. Ont été ajoutés successivement le 4-[Polyisobutyl(18)]phénol à titre de dérivé de PIB (1

mmol) dissout dans le DCM (5 mL) et l'hydroxybenzotriazole (1,4 mmol). Après 10 minutes, le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) (1,5 mmol) a été ajouté et le milieu réactionnel a été laissé remonter lentement à température ambiante (3 h ou 16 h). Le milieu réactionnel a été
5 concentré sous pression réduite. Le cyclohexane a été ajouté au résidu puis lavé trois fois avec de l'eau ou avec un mélange eau/éthanol ou eau/acétonitrile, puis avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄, filtrée, et le solvant a été évaporé sous pression réduite.

10

Exemple 2 : Réaction de couplage utilisant EDC/DMAP

L'acide aminé N-protégé (Fmoc-AA-OH ou Boc-AA-OH) (1,3 mmol) a été dissous dans le DCM (5 mL) sous agitation magnétique et sous atmosphère d'azote, puis refroidi à 0°C dans un bain de glace. Ont été ajoutés
15 successivement, le dérivé de PIB (amine libre, alcool, thiol ou phénol) (1 mmol) dissout dans le DCM (5 mL), la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) (0,3 mmol). Après 10 minutes, l'EDC (2 mmol) a été ajouté et le milieu réactionnel a été laissé remonter lentement à température ambiante (3 h ou 16 h). Le milieu réactionnel a été concentré sous pression réduite. Le cyclohexane a
20 été ajouté au résidu puis lavé trois fois avec de l'eau ou avec un mélange eau/éthanol ou eau/acétonitrile, puis avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄, filtrée, et le solvant a été évaporé sous pression réduite.

25 Exemple 3 : Déprotection du fluorénylmethylcarbamate (Fmoc)

Le dérivé du fluorénylmethylcarbamate (1 mmol) a été dissous dans le DCM (5 mL) sous agitation magnétique, et a été refroidi à 0°C dans un bain de glace. Une solution d'ACN/HNEt₂ (2/1) (5 mL) a été ajoutée, puis le milieu réactionnel a été agité à température ambiante pendant 4 h. Les solvants ont
30 été évaporés sous pression réduite. Le cyclohexane a été ajouté au résidu qui a ensuite été lavé trois fois avec de l'eau ou avec un mélange eau/éthanol ou eau/acétonitrile, puis avec une solution aqueuse saturée en

hydrogénocarbonate de sodium et avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄, filtrée, et le solvant a été évaporé sous pression réduite.

5 Exemple 4 : Déprotection du *tert*-butoxycarbonyle (Boc)

Le dérivé du *tert*-butylcarbamate (1 mmol) a été dissout dans le dans le DCM (5 mL) sous agitation magnétique, et a été refroidi à 0°C dans un bain de glace. Un mélange DCM/TFA (1/1) (35 mL) a été ajouté, puis le milieu réactionnel a été agité à température ambiante pendant 1h. Les solvants ont
10 été évaporés sous pression réduite. Le cyclohexane a été ajouté au résidu qui a été ensuite lavé trois fois avec de l'eau ou avec un mélange eau/éthanol ou eau/acétonitrile, puis avec une solution aqueuse saturée en hydrogénocarbonate de sodium, et avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄, filtrée, et
15 le solvant a été évaporé sous pression réduite.

Exemple 5 : Décrochage du peptide de la molécule d'ancrage

Le tripeptide ancré sur son support solide (1 mmol) dissout dans le DCM (5 mL) a été ajouté à un mélange d'acide trifluoroacétique/triisopropylsilane/eau
20 (v/v/v, 95/2,5/2,5) (5 mL) préalablement refroidi à 0°C dans un bain de glace. Le milieu réactionnel a été agité pendant 3 h à température ambiante. De l'éther éthylique a été ajouté au milieu réactionnel et le précipité a été collecté par filtration et a été séché sous vide.

REVENDICATIONS

1. Procédé de synthèse de peptides ou protéines par élongation successive de la deuxième extrémité ($N\alpha$) d'une chaîne peptidique dont la première extrémité, par l'intermédiaire de sa fonction acide carboxylique (C-terminal) ou de sa fonction amine ($N\alpha$), est fixée sur une molécule d'ancrage soluble dans un solvant apolaire, caractérisé en ce que ladite molécule d'ancrage comporte une chaîne polyoléfine avec au moins 10 unités de monomères, et de préférence entre 15 et 50 unités.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite molécule d'ancrage ne comporte qu'une seule chaîne polyoléfine.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite chaîne polyoléfine est une chaîne de polyisobutène.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ladite molécule d'ancrage est une polyoléfine.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ladite chaîne polyoléfine est fonctionnalisée à l'une de ses extrémités.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ladite chaîne polyoléfine comprend un nombre de liaisons carbone-carbone insaturées ne dépassant pas 5 %, et de préférence ne dépassant pas 3 %.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que ladite chaîne polyoléfine présente une masse moléculaire moyenne en masse comprise entre 600 et 20 000, et de préférence entre 700 et 15 000.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ladite molécule d'ancrage comporte une chaîne polyoléfine (ou est une chaîne polyoléfine) terminée par un groupement sélectionné dans le groupe formé par :
 - une fonction $-X$, où X est sélectionnée dans le groupe formé par : $-OH$, $-NH_2$, $-SH$;
 - une fonction $-Z-C_6H_4X^1$, où
 - Z est O ou absent,

- X' est sélectionnée dans le groupe formé par : -OH, -NH₂, -SH, -NH-NH₂, -CXRR¹, -C₆H₃R'(CRX)
 (où X est sélectionné dans le groupe formé par -OH, -NH₂, -SH, et R est sélectionné dans le groupe formé par -H, Aryl, Hétéroaryl, et R' est sélectionné dans le groupe formé par -H, -Alkyl, -O-Alkyl, -Aryl, -O-Aryl, Hétéroaryl, -O-Hétéroaryl,
 ○ Une fonction -CR''=CH-CHX ou une fonction -CR''H-CH=CH-CHX, où X est sélectionné dans le groupe formé par -OH, -NH₂, -SH, et R'' est méthyle ou éthyle.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que :
- ladite première extrémité de ladite chaîne peptidique est une première unité d'acide aminé AA₁, et
 - ladite chaîne peptidique est formée de n unités d'acide aminé, et
 - la deuxième extrémité de ladite chaîne peptidique est une autre unité d'acide aminé AAn.
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que lors de ladite élongation on ajoute une autre unité d'acide aminé AA(n+1) à ladite deuxième extrémité.
11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, comprenant au moins une étape dans laquelle ladite chaîne peptidique fixée sur ladite molécule d'ancrage est séparée du milieu réactionnel par extraction dans un liquide apolaire.
12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la solubilité de ladite chaîne peptidique fixée sur ladite molécule d'ancrage dans l'eau est inférieure à 30 mg/mL.
13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 12, caractérisé en ce que ladite molécule d'ancrage présente une teneur en carbone biosourcé supérieure à 90%, de préférence supérieure à 93%, et encore plus préférentiellement supérieure à 95%.