



- (51) Classification internationale des brevets :
C07K 1/04 (2006.01) **C07K 1/02** (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR20 12/053074
- (22) Date de dépôt international :
21 décembre 2012 (21.12.2012)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
12 50060 3 janvier 2012 (03.01.2012) FR
- (71) Déposant : CENTRE NATIONAL DE LA RE-
CHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS [FR/FR]; 3, rue
Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).
- (72) Inventeurs : AUCAGNE, Vincent; 60 rue Lamartine, F-
45400 Fleury-les-Aubrais (FR). DELMAS, Agnès; 8 rue
Brise Pain, F-45000 Orléans (FR). ADIHOUE, Hélène; 3
rue Molière, F-45000 Orléans (FR).
- (74) Mandataires : TOUATI, Catherine et al; Cabinet Plasse-
raud, 52 rue de la Victoire, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : PEPTIDE C ALPHA-AMIDES, METHODS FOR PREPARING SAME AND USES THEREOF AS PRECURSORS OF PEPTIDE C ALPHA-THIOESTERS FOR PROTEIN SYNTHESIS

(54) Titre : PEPTIDES C ALPHA-AMIDES, LEURS PROCÉDÉS DE PRÉPARATION ET LEURS UTILISATIONS COMME PRÉCURSEURS DE PEPTIDES C ALPHA-THIOESTERS POUR LA SYNTHÈSE DE PROTÉINES

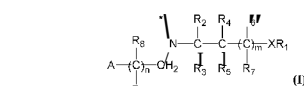


Figure 3 :

Ligation chimique native (« NCL »)

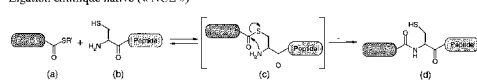


Fig. 4-1 : détail du transfert d'acyle N/S

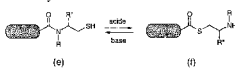
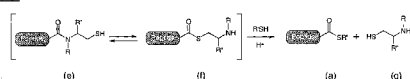
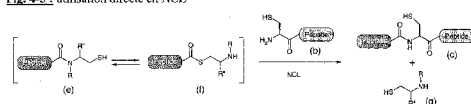


Fig. 4-2 : réaction de trans-thioestérification en milieu acide



EE
Fig. 4-3 : utilisation directe en NCL



BB Use of peptide C α -alkyl-N-(β -mercaptoalkyl)-amides (e) or of peptide C α -aryl-N-(β -mercaptoalkyl)-amides (f) for:
- the synthesis of peptide C α -thioesters (a) by transfer of acyl from N to S) (Fig. 4-1 and 4-2),
- direct use in NCL (Fig. 4-3).

CC Fig. 4-1: detail of the N/S acyl transfer
acidic acid

DD Fig. 4-2: trans-thioesterification reaction in acidic medium

EE Fig. 4-3: direct use in NCL

(57) Abstract : The subject matter of the present invention is peptide C α -amides which are precursors of peptide C α -thioesters, characterized in that they comprise the radical of general formula (I) in which X, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, n and A are as defined in Claim 1. The subject matter of the present invention is also the use of these peptide C α -amides for obtaining peptide C α -thioesters. The subject matter of the present invention is also the use of these peptide C α -amides for obtaining peptides or proteins, in particular of therapeutic interest, by direct use as a crypto-thioester partner in NCL reactions.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet des peptides C α -amides précurseurs de peptides C α -thioesters caractérisés en ce qu'ils comprennent le radical de formule générale (I) dans laquelle X, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, n et A sont tels que définis à la revendication 1. La présente invention a encore pour objet l'utilisation de ces peptides C α -amides pour obtenir des peptides C α -thioesters. La présente invention a encore pour objet l'utilisation de ces peptides C α -amides pour obtenir des peptides ou des protéines, en particulier d'intérêt thérapeutique, par utilisation directe comme partenaire crypto-thioester dans des réactions de type NCL.

MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues (règle 48.2.K)

Publiée :

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

Peptides C^α-amides, leurs procédés de préparation et leurs utilisations comme précurseurs de peptides C^α-thioesters pour la synthèse de protéines.

5 La présente invention concerne de nouveaux peptides C^α-amides dont l'intérêt repose sur le fait que ce sont des précurseurs directs de peptides C^α-thioesters, les procédés de préparation desdits peptides et leurs utilisations pour la synthèse de protéines, notamment de protéines d'intérêts thérapeutiques.

10 Les protéines sont des macromolécules biologiques ubiquitaires dans le vivant et présentant pour certaines un fort potentiel thérapeutique. Il s'agit d'oligomères linéaires d'acides α-aminés (notés H-Xaa-OH) liés par des liaisons amides. Les petites protéines (moins d'une cinquantaine de résidus Xaa) sont appelées peptides. Afin de pouvoir étudier leurs possibles applications thérapeutiques il est capital de pouvoir les produire aisément en quantité suffisante. Les protéines nécessaires à ces études peuvent être obtenues par deux voies. La méthode biotechnologique, qui fait
15 intervenir la technique dite de l'ADN recombinant, est souvent utilisée mais présente de nombreuses limitations. La synthèse par voie chimique est une technique complémentaire très intéressante pour la production de protéines comportant jusqu'à plus de deux cent résidus d'acides α-aminés. Elle permet d'accéder à des protéines difficiles à obtenir par voie biotechnologique, comme les protéines cytotoxiques ou
20 celles modifiées spécifiquement, à la fois sur les chaînes latérales des résidus introduits (modifications post-traductionnelles, sondes, chaînes de polyéthylèneglycols. ..) mais également sur le squelette peptidique et les extrémités N- et C-terminales.

25 La synthèse chimique de petites protéines peut être effectuée par Synthèse Peptidique sur Phase Solide (**SPPS**) (Merrifield, B. Solid phase synthesis, *Science* **1986**, 232, 341-347). La SPPS est une technique qui permet, par le biais d'un «bras», de fixer un acide aminé C-terminal muni de groupements protecteurs adaptés sur un support solide, généralement un polymère insoluble appelé «résine». Les acides aminés suivants sont ajoutés un par un jusqu'à atteindre le N-terminus, par une
30 succession de réactions chimiques de couplage et déprotection. De cette façon, il est possible d'utiliser de très larges excès de réactifs, ce qui augmente considérablement le rendement des réactions. La seule purification qui devient alors nécessaire est un rinçage abondant de la résine effectué par simple filtration après chaque réaction, les

étapes de purification chromatographique intermédiaires étant supprimées. Le bras est inerte dans toutes les conditions de la synthèse et permet la libération du peptide en solution uniquement lors d'une étape finale de coupure du bras, habituellement concomitante avec la déprotection des chaînes latérales. Le détail des étapes de la Synthèse Peptidique sur Phase Solide (SPPS) est illustré à la figure 1.

Deux stratégies principales de synthèse ont été développées en SPPS, à savoir la SPPS en stratégie Boc ou la SPPS en stratégie Fmoc, qui mettent en jeu respectivement des acides α -aminés A[^]-protégés soit par un groupement *t*-butyloxycarbonyle (Boc) soit par un groupement fluorénylméthoxyloxycarbonyle (Fmoc). Ces deux groupes protecteurs Boc et Fmoc sont illustrés à la figure 2. La SPPS en stratégie Boc nécessite un traitement final au fluorure d'hydrogène (HF) dangereux et délicat à mettre en œuvre, et est de ce fait de plus en plus délaissée. La SPPS en stratégie Fmoc (**Fmoc SPPS**) est la plus largement utilisée de nos jours.

La SPPS est limitée en termes de taille des protéines synthétisable en routine (< ~50 résidus d'acides aminés). Une méthode alternative consiste à synthétiser des fragments de protéines *via* la SPPS qui peuvent être condensés grâce à des réactions hautement chimiosélectives. Ces réactions se réalisent généralement en milieu aqueux tamponné entre des partenaires peptidiques déprotégés et sont appelées ligations chimiques. Lorsque la liaison qui résulte de la ligation est une liaison amide, la ligation chimique est dite « native » (Dawson P. et al; Synthesis of proteins by native chemical ligation, *Science* 1994, 266, 776-779). La technique de ligation chimique native « **Native Chemical Ligation : NCL** » la plus utilisée est illustrée à la figure 3. Cette réaction est au jour d'aujourd'hui la méthode de référence pour la synthèse chimique de protéines. Cette technique fait intervenir un peptide dont le C-terminus est modifié par un C ^{α} -thioester (voir composé nommé (a) sur la figure 3 avec R' représentant un radical provenant d'un thiol de formule R'-SH) et un peptide portant une cystéine N-terminale (voir composé nommé (b)). Dans un premier temps, le groupement sulfhydryle de la cystéine N-terminale du composé (b) réagit par une réaction de *trans*-thioestérification avec la fonction thioester de (a). Le composé (c) qui en résulte se réarrange spontanément par un transfert d'acyle du soufre vers l'azote (S→N) *via* un état de transition cyclique à cinq chaînons, thermodynamiquement très favorisé. On obtient ainsi un peptide (d) présentant une liaison amide à la jonction entre les deux fragments.

Contrairement à la synthèse de peptides C^α -acides et C^α -amides, les peptides C^α -thioesters sont particulièrement difficiles à synthétiser par SPPS en stratégie Fmoc du fait de la non-compatibilité de la fonction thioester (-CO-S-) avec la pipéridine utilisée pour déprotéger le groupement Fmoc. La pipéridine est en effet une aminé nucléophile qui réagit rapidement avec les fonctions thioesters pour couper la liaison carbone-soufre et donner l'amide et le thiol correspondants. Les stratégies contemporaines pour la synthèse de peptides thioesters par Fmoc SPPS sont pour leur vaste majorité des méthodes indirectes : la fonction thioester n'est introduite qu'après avoir réalisé l'élongation complète du peptide.

Parmi les différentes méthodes existantes permettant de synthétiser des peptides C^α -thioesters par SPPS en stratégie Fmoc (figure 4-2, composé (a)), certaines font intervenir des peptides C^α -N-alkyl-N-(P-mercaptoalkyl)-amides (figure 4-1, composé (e) avec R = alkyle et R'' représentant un groupe comprenant une fonction ayant permis, lors des premières étapes de la synthèse de (e), de greffer un précurseur de (e) à un polymère insoluble par l'intermédiaire d'un bras) ou des peptides C^α -N-aryl-N-(P-mercaptoalkyl)-amides (figure 4-1, composé (e) avec R = aryle et R'' tel que défini précédemment).

De tels peptides C^α -P-mercapto-amides (e) sont généralement spontanément en équilibre avec une forme C^α -P-amino-thioester (f) *via* un transfert d'acyle intramoléculaire de l'azote vers le soufre (N→S) détaillé dans la figure 4-1. L'équilibre est déplacé vers la forme amide (e) dans des conditions neutres ou basiques, alors que la forme thioester (f) prédomine en milieu acide. La réaction avec un excès de thiol (R'SH) à pH acide de composés de type (e) ou (f) permet de déplacer progressivement cet équilibre et d'obtenir le peptide C^α -thioester (a) dénué de fonction β -amine (composé (a)).

Il a été montré dans plusieurs exemples récents que certains de ces peptides C^α - β -mercapto-amides (e) peuvent être directement utilisés, au même titre que les peptides C^α -thioesters (f), dans les conditions de NCL, c'est-à-dire en présence d'un peptide muni d'une cystéine N-terminale de type (b) et d'un excès de thiol R'SH, dans un milieu tamponné à un pH proche de la neutralité. Le principe est *a priori* que le transfert d'acyle N→S et la trans-thioestérification se font *in situ* lors de la ligation (figure 4-3). Les peptides C^α -P-mercapto-amides (e) dotés de cette propriété sont

appelés « crypto-thioester ». Seuls quelques exemples ont été décrits à ce jour (1- Ollivier N. et al; Bis(2-sulfanylethyl)amino native peptide ligation, Org. Lett. 2010, 12, 5238-5241; 2- Sato K. et al; N-Sulfanylethylanilide peptide as a crypto-thioester peptide, ChemBioChem 2011, 12, 1840-1844; 3- Hou W. et al; Peptidyl *N,N*-bis(2-mercaptoethyl)-amides as thioester precursors for native chemical ligation. Organic Letters 2011, 13, 386-389).

La synthèse de peptides peptides C^{α} -*N*-alkyl -*N*-(P-mercaptoalkyl)-amides ou C^{α} -*N*-aryl -*N*-(P-mercaptoalkyl)-amides (voir figure 5-1, composé (e) avec R = alkyl ou aryl) se réalise par SPPS en stratégie Fmoc en masquant la fonction thiol du composé (h) par un groupement protecteur (Protec), ce qui a pour conséquence d'empêcher le réarrangement en une forme thioester de type (f) (figure 4-3). Le peptide reste sous sa forme amide, et est donc stable tout au long de l'élongation.

Le principal inconvénient de cette approche de la synthèse de thioesters ou de crypto-thioesters réside dans le fait que toutes les synthèses décrites à ce jour ont en commun une première étape extrêmement délicate de *N*-acylation (figure 5-1). En effet, à cause de l'encombrement stérique autour de l'atome d'azote, la cinétique de la réaction est généralement très lente ce qui peut conduire à une *N*-acylation incomplète, des produits secondaires indésirables et des rendements faibles. Dans de nombreux cas, cette approche est limitée en pratique à des peptides C^{α} -thioesters présentant un résidu glycine en C-terminal.

Il subsiste donc toujours le besoin de synthétiser des peptides C^{α} -*N*-alkyl-*N*-(β -mercaptoalkyl)-amides ou C^{α} -*N*-aryl -*N*-(P-mercaptoalkyl)-amides par une méthode simple et efficace. En effet, une préparation simple et efficace de tels peptides C^{α} -amides permet notamment une préparation simple et efficace des peptides C^{α} -thioesters puisque ces peptides C^{α} -amides sont des précurseurs directs des peptides C^{α} -thioesters.

En outre, de tels peptides C^{α} -amides pourront également être dotés de propriétés de crypto-thioester, et être utilisés directement dans une réaction de NCL sans qu'il soit nécessaire d'isoler au préalable la forme thioester.

De façon avantageuse selon l'invention, la *N*-acylation de l'aminé secondaire de type (h) (figure 5-1) est avantageusement accélérée notamment grâce à un radical R tout à fait original permettant une assistance intramoléculaire lors de la *N*-acylation.

Le principe d'une telle assistance de l'acylation d'une aminé secondaire a été décrit dans la littérature mais jamais appliqué à des peptides C^α-P-mercapto-amides précurseurs de C^α-thioesters. A titre d'exemple, on pourra citer l'assistance de l'acylation d'une aminé secondaire d'un peptide par une fonction N-(2-hydroxybenzyle) (Johnson T. et al; A réversible protecting group for the amide bond in peptides. Use in the synthesis of "difficult séquences", J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1993, 369-374.).

Cette assistance est illustrée dans la figure 5-2. La N-acylation de l'aminé secondaire (j) est beaucoup plus rapide que celle de l'aminé secondaire (m), alors que l'encombrement stérique autour de l'atome d'azote (principal facteur déterminant la cinétique d'une réaction de N-acylation classique) de chacun de ces deux composés est comparable. Cette grande différence de réactivité est due à la présence d'un groupement N-(2-hydroxybenzyle) dans (j) mais pas dans (m). La fonction hydroxyle de ce groupe peut être O-acylée dans des conditions de N-acylation, pour donner un intermédiaire (k). Contrairement à la fonction aminé secondaire, la fonction hydroxyle est très peu encombrée, et cette réaction de O-acylation est rapide. L'intermédiaire (k) va rapidement subir un transfert d'acyle de l'oxygène vers l'azote (O → N) pour donner l'amide (1) via un état de transition cyclique à six chaînons, thermodynamiquement très favorisé. Cette N-acylation par transfert d'acyle intramoléculaire conduisant à (1) est très peu sensible à l'encombrement stérique autour de l'atome d'azote, contrairement à la version intermoléculaire conduisant à (n), ce qui explique la N-acylation beaucoup plus rapide de (j) comparé à (m). Une assistance similaire a également été évoquée lors de l'acylation de peptides munis d'une fonction aminé muni d'un groupement de type γ-(2-aza-hétérocycle) (Zhang L. et al; Orthogonal coupling of unprotected peptide segments through histidyl amino terminus, Tetrahedron Lett. 1997, 38, 3-6.).

L'un des buts de la présente invention est de proposer une méthode de synthèse de peptides C^α-N-alkyl -N-(P-mercaptoalkyl)-amides précurseurs de peptides C^α-thioesters qui soit à la fois simple à mettre en œuvre, rapide, non-onéreuse et qui ne génère pas de produits secondaires indésirables.

De façon avantageuse selon l'invention, certains des groupements présents sur les radicaux R originaux tels que mentionnés précédemment pourront permettre également une assistance intramoléculaire du transfert d'acyle N → S et/ou de la

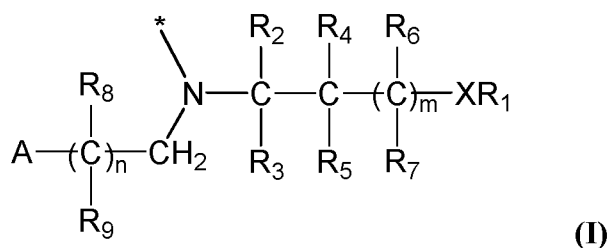
trans-thioesterification, et ainsi augmenter l'aptitude des peptides C^α -N-alkyl -N-(β -mercaptoalkyl)-amides de l'invention à se comporter comme des crypto-thioesters. Cette assistance pourra résulter par exemple de la formation de liaisons hydrogènes, d'interactions dipolaires, d'interactions π - π , ou d'une catalyse acidobasique.

5 Un autre but de l'invention est de proposer une méthode de synthèse de peptides C^α -N-alkyl -N-(P-mercaptoalkyl)-amides originaux qui soient dotés de propriétés de crypto-thioesters afin de pouvoir être directement utilisés comme partenaire dans des réactions de NCL.

10 Dans la présente demande, les peptides C^α -N-alkyl -N-(P-mercaptoalkyl)-amides seront plus simplement dénommés peptides C^α -amides. Les peptides C^α -amides de l'invention couvrent à la fois lesdits peptides C^α -N-alkyl -N-(P-mercaptoalkyl)-amides mais aussi des peptides C^α -N-alkyl -N-(γ -mercaptoalkyl)-amides, C^α -N-alkyl -N-(P-sélénioalkyl)-amides et C^α -N-alkyl -N-(γ -sélénioalkyl)-amides, lesdits peptides C^α -amides de l'invention étant des précurseurs de peptides C^α -thioesters, selon un
15 mécanisme supposé de transfert d'acyle du soufre ou du sélénium vers l'azote.

Les peptides C^α -amides de l'invention peuvent aussi être dénommés peptides « crypto-thioesters » du fait de la possibilité de les utiliser directement dans des réactions de NCL, sans qu'il soit nécessaire de préparer au préalable la forme thioester.

20 La présente invention a ainsi pour objet un peptide C^α -amide précurseur d'un peptide C^α -thioester caractérisé en ce qu'il comprend le radical de formule générale (I) :



dans laquelle

25 X représente un atome de soufre ou de sélénium,

R_i représente un atome d'hydrogène ou un groupe protecteur du soufre ou du sélénium compatible avec des conditions d'élongation par Fmoc SPPS,

m représente un entier égal à 0 ou 1,

un des R_2, R_3, R_4, R_5, R_6 ou R_7 représente le radical -B-C-D dans lequel :

D représente un atome d'hydrogène ou un support solide convenant pour la synthèse de peptides en phase solide (SPPS),

C est absent ou représente un bras utilisable pour la SPPS,

B représente un radical divalent comportant un hétéroatome,

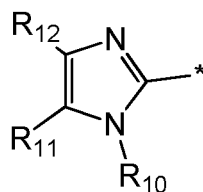
5 les autres desdits R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 ou R_7 qui ne représentent pas -B-C-D représentent alors indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un radical alkyle ayant de 1 à 10 atomes de carbone, et de préférence un radical méthyle ($-\text{CH}_3$) ou un radical phényle ($-\text{C}_6\text{H}_5$), à la condition qu'au plus deux desdits radicaux R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 ou R_7 représentent en même temps un
10 phényle,

R_8 et R_9 représentent indépendamment l'un de l'autre un radical alkyle ayant de 1 à 10 atomes de carbone, et de préférence un radical méthyle ou un atome d'hydrogène,

n représente un entier allant de 0 à 4, de préférence de 0 à 1,

15 A représentant un radical aryle ou hétéroaryle choisi dans le groupe comprenant

• le radical de formule :

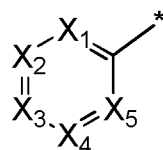


dans laquelle

20 Rio représente un radical alkyle ayant de 1 à 10 atomes de carbone, et de préférence un méthyle,

R_u et R_{12} représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un atome d'halogène choisi dans le groupe comprenant Cl, Br, I ou F, un radical $-\text{CN}$, un radical $-\text{NO}_2$, un radical $-\text{CF}_3$, un radical phényle ($-\text{C}_6\text{H}_5$), un radical $-\text{CONH}_2$, un radical Rio, un radical $-\text{OR}_{10}$, un radical
25 $-\text{SR}_{10}$, un radical $-\text{N}(\text{Rio})_2$, un radical $-\text{COOR}_{10}$, un radical $-\text{CONHR}_{10}$ ou un radical $-\text{CON}(\text{Rio})_2$, Rio étant tel que défini précédemment,

• le radical de formule :



dans laquelle

au moins un des X_1 , X_2 , X_3 , X_4 et X_5 représente un atome d'azote (N), un radical C-OH ou un radical C-SH, les autres desdits X_1 , X_2 , X_3 , X_4 ou X_5 qui ne représentent pas N, C-OH ou C-SH représentent alors indépendamment l'un de l'autre un radical C-R_n avec R₁₁ tel que défini précédemment,

• le radical de formule :



dans laquelle

au moins un des X_1 , X_2 , X_3 et Y_4 représente un atome d'azote (N), un radical C-OH ou un radical C-SH, les autres desdits X_1 , X_2 ou X_3 qui ne représentent pas N, C-OH ou C-SH représentent alors indépendamment l'un de l'autre un radical C-R_i avec R_i tel que défini précédemment,

Y_1 , Y_2 , Y_3 et Y_4 (à condition que Y_4 ne représente pas C-OH ou C-SH) représentent indépendamment l'un de l'autre, selon qu'ils soient liés par une liaison simple ou double, un atome d'azote (N) ou un groupe NR₁₀ avec R₁₀ tel que défini précédemment, un groupe CH ou CH₂, un groupe C-R₁₁ ou CHR_n ou CR₁R₁₂ avec R₁₁ et R₁₂ tels que définis précédemment, un carbonyle (C=O), un atome d'oxygène (O), un atome de soufre (S), avec la condition qu'au plus deux desdits Y_1 , Y_2 , Y_3 et Y_4 représentent en même temps un atome d'oxygène ou un atome de soufre,

l'un desdits Y_1 , Y_2 , Y_3 ou Y_4 pouvant être absent, de sorte à former un cycle à 5 chaînons.

Par alkyle on entend un radical hydrocarbyle ayant 1 à 10 atomes de carbone, répondant à la formule générale C_nH_{2n+1} où n est supérieur ou égal à 1. Les groupes alkyles peuvent être linéaires ou ramifiés et peuvent être substitués par les groupements indiqués dans la présente demande.

Par aryle on entend un groupe hydrocarbyle polyinsaturé, aromatique, ayant un seul cycle (comme par exemple le phényle) ou plusieurs cycles accolés (comme par exemple le naphthyle) ou plusieurs cycles reliés par une liaison covalente (par exemple biphényle), qui contiennent typiquement 5 à 12 atomes de carbone,

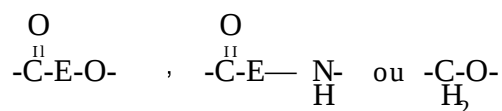
préférentiellement 6 ou 12, et où au moins un cycle est aromatique. Le cycle aromatique peut optionnellement comprendre un à deux cycles supplémentaires (soit cycloalkyle, hétérocycloalkyle ou hétéroaryle) accolés. Le terme aryle comprend également les dérivés partiellement hydrogénés de systèmes carbocycliques décrits ci-dessus. Le cycle aromatique peut optionnellement comprendre un à cinq substituants (différents de H) de type alkyle (préférentiellement méthyle), -F, -Cl, -Br, -I, -CF₃, -OMe, -SMe, -N(Me)₂, -COOH, -SO₃H, -CH₂N(Me)₂, -CH₂COOH, -CH₂SO₃H, -CH₂CH₂N(Me)₂, -CH₂CH₂COOH, -CH₂CH₂SO₃H, -OCH₂COOH, -OCH₂SO₃H, -OCH₂CH₂N(Me)₂, -OCH₂CH₂COOH ou -OCH₂CH₂SO₃H.

Par hétéroaryle on entend un cycle ou plusieurs cycles accolés ou reliés par une liaison covalente, comprenant 3 à 17 atomes de carbone, préférentiellement 3 à 11 atomes de carbone, où au moins l'un des cycles est aromatique et où au moins un ou plusieurs atomes de carbone sont remplacés par de l'oxygène, de l'azote et/ou du soufre. Le terme hétéroaryle comprend également des systèmes décrits ci-dessus ayant un groupe aryle, cycloalkyle, hétéroaryle ou hétérocycloalkyle accolé ou un à cinq substituants alkyle, préférentiellement méthyle. Le terme hétéroaryle comprend également des systèmes décrits ci-dessus comportant un à quatre substituants (différents de H) de type alkyle (préférentiellement méthyle), -F, -Cl, -Br, -I, -CF₃, -OMe, -SMe, -N(Me)₂, -COOH, -SO₃H, -CH₂N(Me)₂, -CH₂COOH, -CH₂SO₃H, -CH₂CH₂N(Me)₂, -CH₂CH₂COOH, -CH₂CH₂SO₃H, -OCH₂COOH, -OCH₂SO₃H, -OCH₂CH₂N(Me)₂, -OCH₂CH₂COOH ou -OCH₂CH₂SO₃H.

Par cycloalkyle on entend un hydrocarbyle monovalent, cyclique, insaturé ou saturé, présentant un ou deux cycles et comportant 3 à 10 atomes de carbone.

Par hétérocycloalkyle on entend un cycloalkyle dans lequel au moins un atome de carbone est remplacé par un atome d'oxygène, d'azote et/ou de soufre.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le radical divalent B présent dans le radical (I), représente :



dans lequel

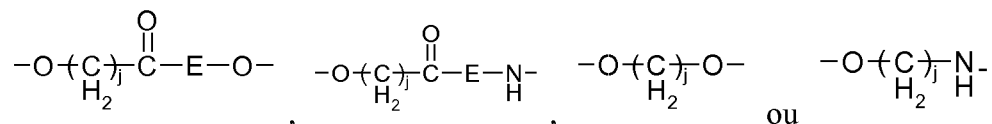
E est absent ou représente le groupe -(Xaa)_i- dans lequel :

i représente un entier allant de 1 à 20, et de préférence de 1 à 5,

chaque Xaa représente indépendamment les uns des autres un résidu d'acide aminé, et lorsque i est supérieur ou égal à 2, chacun desdits Xaa est relié à son voisin Xaa par une liaison peptidique,

ou, dans le cas où m = 1, et R_4 ou $R_5 = -B-C-D$, alors le radical divalent B

5 représente de préférence :



dans lequel :

j représente un entier allant de 0 à 10, de préférence de 0 à 3 et E est tel que défini précédemment.

10 Les éventuelles fonctions réactives des chaînes latérales desdits résidus d'acides aminés peuvent être libres c'est-à-dire non protégées ou au contraire protégées par des groupes protecteurs habituellement utilisés par l'homme de l'art lors de la SPPS.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, dans le radical (I), C représente un bras utilisable pour la SPPS en stratégie Fmoc, et de préférence un

15 bras acido-labile choisi dans le groupe comprenant un bras de Rink (4-[(2,4-diméthoxyphényl)méthyl]phénoxyacétyle), un bras de type Wang (4-alkoxybenzyle), un bras de Sieber (xanthén-3-yloxyalkyle), un bras PAL (4-2,5-diméthoxy-alkoxybenzyle), un bras 2-chlorotrityle, un bras PAM (phénylacetamidométhyle), un bras SASRIN (2-méthoxy-4-alkoxybenzyle) ou un bras MBHA (4-

20 méthyl)benzhydryle.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, dans le radical (I), D représente un support solide convenant pour la SPPS en stratégie Fmoc et de préférence est choisi dans le groupe comprenant une résine commercialisée sous la

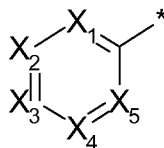
dénomination PEGA®, une résine commercialisée sous la dénomination

25 CHEMMATRIX™, une résine de type polyacrylamide, une résine de type polystyrène ou une résine mixte polystyrène/polyéthylèneglycol (PEG).

A titre d'exemple de résine mixte polystyrène/polyéthylèneglycol (PEG), on pourra citer celles commercialisées sous la dénomination tentagel ou argogel.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, dans le radical (I), n est

30 un entier égal à 0, et le radical A présente la formule :

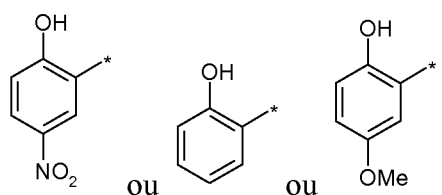


dans laquelle X_i représente C-OH, et chacun des X_2 , X_3 , X_4 et X_5 est tel que défini précédemment.

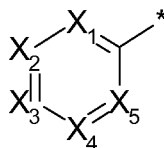
De manière préférée, chacun des X_2 , X_3 ou X_5 représente CH et X_4 représente C-
 5 R_{ii} avec R_{ii} tel que défini précédemment.

De manière encore plus préférée X_4 représente CH, C-OMe ou C-NO₂.

Ainsi un radical A préféré est celui représenté par l'une des formules suivantes :

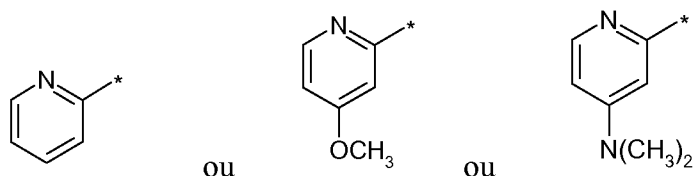


Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, dans le radical (I),
 10 n est un entier égal à 0, et le radical A présente la formule :



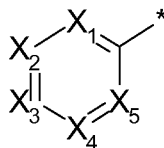
dans laquelle X_i représente l'atome d'azote (N) et chacun desdits X_2 , X_3 , X_4 et X_5 est tel que défini précédemment. De manière préférée, chacun des X_2 , X_3 ou X_5 représente CH et X_4 représente CH ou C-R_n avec R₁₁ représentant OCH₃ ou
 15 N(CH₃)₂.

Ainsi un autre radical A préféré est celui représenté par l'une des formules suivantes :



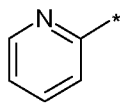
Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, dans le radical (I),
 20 n est un entier égal à 1, et le radical A présente la formule :

12

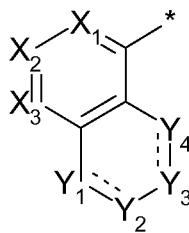


dans laquelle X_i représente l'atome d'azote (N) et chacun desdits X_2 , X_3 , X_4 et X_5 est tel que défini précédemment. 9. De manière préférée, chacun des X_2 , X_3 , X_4 et X_5 représente CH.

5 Ainsi un autre radical A préféré avec n égal à 1 est celui représenté par la formule suivante :



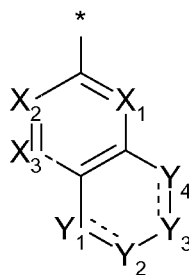
Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, dans le radical (I), n est un entier égal à 0, et le radical A présente la formule :



10

dans laquelle X_i ou Y_4 représente C-OH ou N, l'autre desdits X_i ou Y_4 qui ne représente pas C-OH ou N, ainsi que chacun desdits X_2 , X_3 , Y_1 , Y_2 , et Y_3 sont tels que définis précédemment.

15 Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, dans le radical (I), n est un entier égal à 0, et le radical A présente la formule :



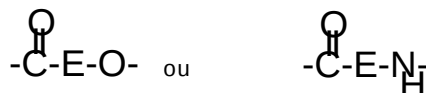
dans laquelle X_i ou X_2 représente C-OH ou N, l'autre desdits X_i ou X_2 qui ne représente pas C-OH ou N, ainsi que chacun desdits X_3 , Y_1 , Y_2 , Y_3 et Y_4 sont tels que définis précédemment.

20 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le peptide C^α -amide est caractérisé en ce que dans le radical (I) :

m représente 0 ou 1,

chacun desdits R_3 , R_4 , R_5 , R_6 ou R_7 représente H,

R_2 représente -B-C-D dans lequel B représente :



5 et C, D et E sont tels que définis précédemment.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, dans le radical (I), m est égal à 0 et X représente un atome de soufre (S).

Lorsque R_i est un groupe protecteur du soufre, alors ce dernier peut être choisi dans le groupe comprenant trityle (Trt), méthyltrityle (Mtt), méthoxytrityle (Mmt),
 10 xanthényle (Xan), tri-méthoxybenzyle (Tmob), acétamidométhyle (Acm),
 triméthylacétamidométhyle (Tacm), benzamidométhyle (Bam),
 allyloxycarbonylaminométhyle (Allocam), phthalimidométhyle (Pim), 2-
 (triméthylsilyl)éthyle, t-butyle (tBu), 2,4,6-triméthylbenzyle, quinolinylméthyle
 (Qm), diphényl-4-pyridylméthyle, 1-adamantyle, benzyloxyméthyle (BOM), 2-
 15 tétrahydropyranyle (Thp), benzylthiométhyle, éthylsulfényle (SEt), t-butylsulfényle
 (StBu), phénylsulfényle (SPh) et 2,4-dinitrophényle.

Plus particulièrement, selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, lorsque R_i est un groupe protecteur du soufre pouvant être coupé par un traitement à l'acide trifluoroacétique (TFA), alors ce dernier est de préférence choisi dans le
 20 groupe comprenant trityle (Trt), méthyltrityle (Mtt), méthoxytrityle (Mmt), xanthényle (Xan) et tri-méthoxybenzyle (Tmob).

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, lorsque R_i est un groupe protecteur du soufre stable à un traitement au TFA et stable dans des conditions de NCL, alors ce dernier est de préférence choisi dans le groupe
 25 comprenant acétamidométhyle (Acm), triméthylacétamidométhyle (Tacm), benzamidométhyle (Bam), allyloxycarbonylaminométhyle (Allocam), phthalimidométhyle (Pim), 2-(triméthylsilyl)éthyle, t-butyle (tBu), 2,4,6-triméthylbenzyle, quinolinylméthyle (Qm), diphényl-4-pyridylméthyle, 1-adamantyle, benzyloxyméthyle (BOM), 2-tétrahydropyranyle (Thp) et
 30 benzylthiométhyle.

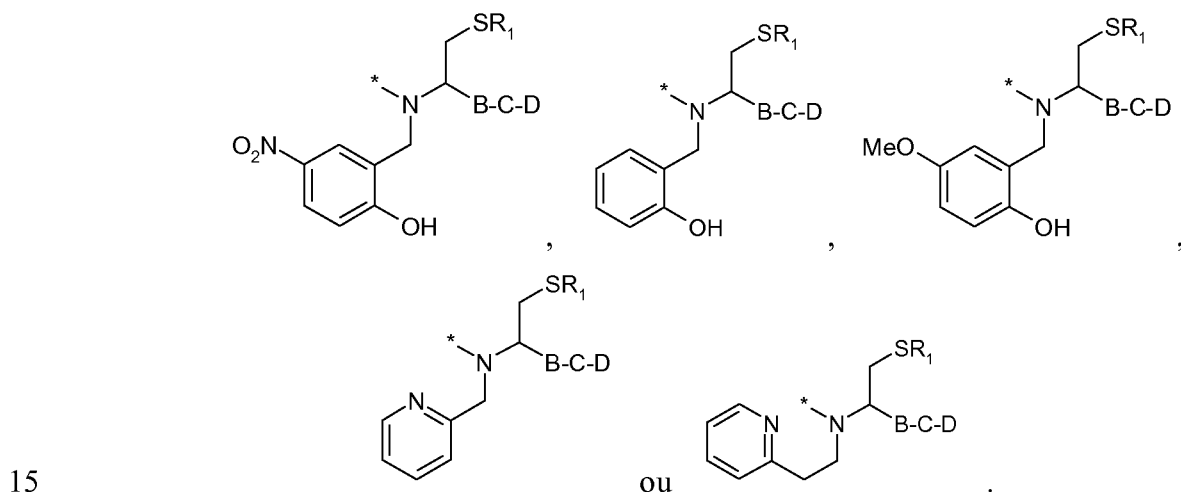
Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, lorsque R_i est un groupe protecteur du soufre qui est stable à un traitement au TFA mais labile

dans des conditions de NCL, alors ce dernier est de préférence choisi dans le groupe comprenant éthylsulfényle (SEt), t-butylsulfényle (StBu), phénylsulfényle (SPh) et 2,4-dinitrophényle.

5 Selon encore un autre mode de réalisation avantageux, Ri est un groupement labile dans une réaction de ligation chimique native NCL et est de préférence choisi dans le groupe contenant les groupements éthylsulfényle (SEt), t-butylsulfényle (StBu) et phénylsulfényle (SPh).

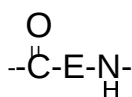
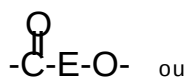
10 Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, X représente un atome de sélénium (Se), Ri est un groupe protecteur du sélénium et est de préférence choisi dans le groupe comprenant 4-méthoxybenzyle (Mob), 4-méthylbenzyle (MeBzl) ou benzyle (Bzl).

A titre d'exemple de radical (I) selon l'invention, on pourra citer un de ceux choisis dans le groupe comprenant :



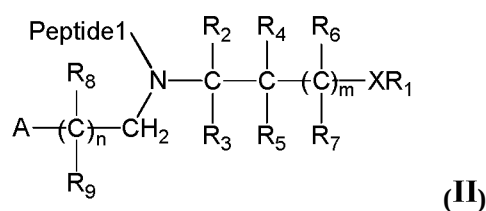
dans lequel :

B représente



et E, C, D et Ri sont tels que définis précédemment.

20 Le peptide C^α-amide objet de l'invention est plus particulièrement caractérisé en ce qu'il présente la formule générale (II) :



dans laquelle :

Peptidel représente le groupement $R_{i8}-(Xaa)_k$ - dans lequel :

k est un entier allant de 1 à 100, de préférence de 4 à 60, et plus préférentiellement encore de 8 à 40,

5 Xaa représente indépendamment les uns des autres un résidu d'acide aminé provenant d'un acide aminé de formule $H-Xaa-OH$, et lorsque k est supérieur ou égal à 2, chacun desdits Xaa est relié à son voisin Xaa par une liaison peptidique,

10 Ris est un atome d'hydrogène ou un substituant de l'extrémité N-terminale comprise dans le résidu Xaa,

X, m, n, A et R_i à R_9 étant tels que définis précédemment.

De manière préférée, dans le radical divalent B tel que défini ci-dessus, E est absent ou représente $-(Xaa)_i-$ qui est choisi de manière à augmenter la solubilité aqueuse du Peptidel.

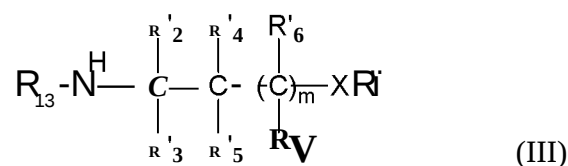
15 Les éventuelles fonctions réactives des chaînes latérales des résidus d'acides aminés $-(Xaa)_k-$ peuvent être libres c'est-à-dire non protégées ou au contraire protégées par des groupes protecteurs habituellement utilisés par l'homme de l'art lors de la SPPS.

20 Selon un premier mode de réalisation avantageux de l'invention, le procédé de préparation du composé de formule (I bis) (ledit composé (I bis) formant le radical (I) au sein du peptide C^α-amide de l'invention) est caractérisé en ce qu'il comporte :
- une étape de greffage, sur un support solide de formule :



25 dans lequel E et C tels que définis précédemment, D' représente une résine convenant pour la SPPS et H, O, NH et Cl correspondant aux symboles chimiques habituellement utilisés,

d'un composé de formule générale (III) :



dans laquelle :

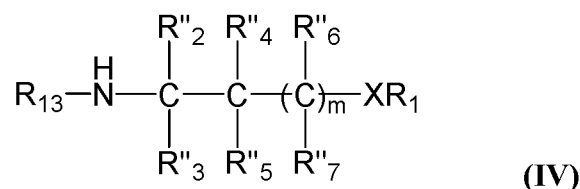
30 R_{13} représente un groupement protecteur de la fonction aminé, et de préférence un groupement Fmoc,

m, X et Ri sont tels que définis précédemment,

un des R'₂, R'₃, R'₄, R's, RV ou R'₇ représentant un groupe réactif comprenant une fonction chimique réactive choisie de préférence dans le groupe comprenant -COOH, -NH₂ ou -OH, et permettant de greffer ledit composé (III) sur le support solide tel que mentionné ci-dessus selon une méthode connue de l'homme de l'art pour la SPPS en stratégie Fmoc,

les autres desdits R'₂, R'₃, R'₄, R's, RV ou R'₇ qui ne représentent pas ledit groupe réactif ont la même signification que lesdits R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ ou R₇ tels que définis précédemment et ne représentent pas -B-C-D,

afin d'obtenir un composé de formule générale (IV) :



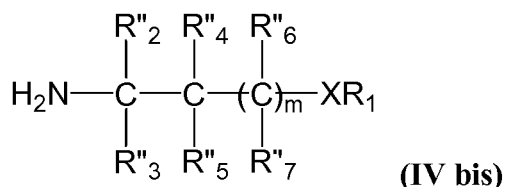
dans laquelle :

m, X, Ri et R₁₃ sont tels que définis précédemment,

un des R''₂, R''₃, R'V, R'V, R'V ou R''₇ représente -B-C-D' dans lequel B, C et D' sont tels que définis précédemment,

les autres desdits R''₂, R'V, R''₄, R'V, R'V ou R''₇ qui ne représentent pas le radical -B-C-D' ont la même signification que lesdits R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ ou R₇ tels que définis précédemment et ne représentent pas le radical -B-C-D,

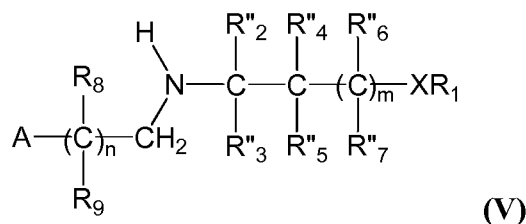
- ladite étape de greffage étant suivie d'une étape de coupure du groupement protecteur R₁₃ du composé (IV) afin d'obtenir un composé de formule générale (IV bis) :



dans laquelle :

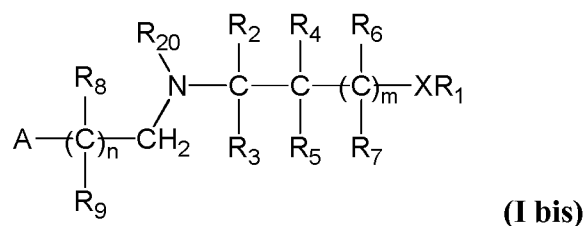
m, X, Ri, R''₂, R'V, R''₄, R'V, R'V et R''₇ sont tels que définis précédemment,

- ladite étape de coupure étant suivie d'une étape de mono-N-alkylation du composé (IV bis) afin d'obtenir le composé de formule générale (V) :



dans laquelle X, R₁, m, R''₂, R''₃, R''₄, R''₅, R''₆, R''₇, n, R₈, R₉ et A sont tels que définis précédemment,

le composé (V) étant un précurseur direct du composé de formule générale (I bis) :



dans laquelle :

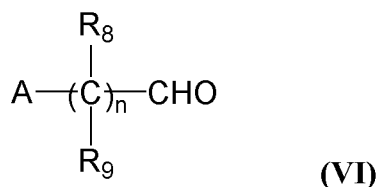
R₂₀ = H ou R₁₃ tel que défini précédemment,

X, R_i, m, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, n, R₈, R₉ et A sont tels que définis précédemment,

le composé (I bis) étant obtenu à partir du composé (V) selon une des méthodes connues de l'homme de l'art.

Le composé (I bis) forme le radical (I) au sein du peptide C^α-amide de l'invention (voir par exemple le composé de formule générale (II)).

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de préparation du composé (I bis) de l'invention, l'étape de mono-*N*-alkylation du composé (IV bis) comporte une réaction d'amination réductrice dudit composé (IV bis) à l'aide d'un aldéhyde de formule générale (VI) :



dans laquelle A, n, R₈ et R₉ sont tels que définis précédemment,

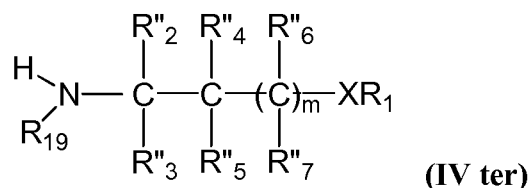
afin de former une imine qui est réduite pour former le composé (V) tel que défini ci-dessus.

La réduction pourra par exemple être effectuée à l'aide d'un borohydrure choisi dans le groupe comprenant le cyanoborohydrure de sodium (NaBH₃CN), le

triacétoxyborohydrure de sodium (NaBH(OAc)₃) ou le borohydrure de sodium (NaBH₄).

Selon un autre mode de réalisation avantageux du procédé de préparation du composé (I bis) de l'invention, l'étape de mono-*N*-alkylation du composé (IV bis) comporte :

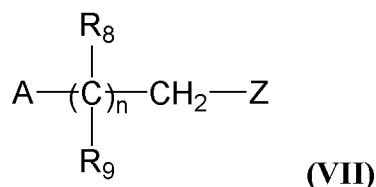
- une étape préalable de sulfonylation de la fonction aminé primaire du composé (IV bis), afin d'obtenir le composé de formule (IV ter) :



dans laquelle R₁₉ représente un groupement arylsulfonyle choisi dans le groupe comportant 2-nitrobenzènesulfonyle, 4-nitrobenzènesulfonyle et 2,4-dinitrobenzènesulfonyle,

m, X, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ et R₇ sont tels que définis précédemment,

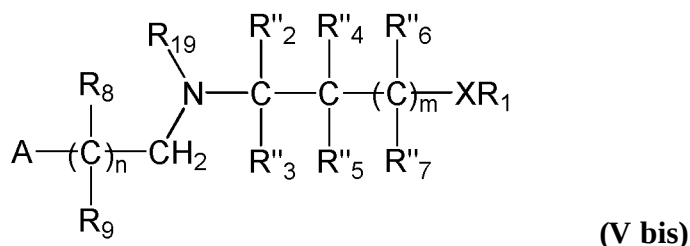
- ladite étape de sulfonylation étant suivie d'une étape de monoalkylation par *N*-substitution nucléophile entre le composé (IV ter) et un composé de formule générale (VII) :



dans laquelle Z représente un groupe partant choisi dans le groupe comprenant Cl, Br, I ou un sulfonate, ledit sulfonate pouvant par exemple être un « O-mésylate » (-OMs) représenté par MeSO₂-O-, un « O-tosylate » (-OTs) représenté par *p*-Me-C₆H₄-SO₂-O- ou un « O-triflate » (-OTf) représenté par CF₃SO₂-O-,

A, n, R₈ et R₉ sont tels que définis précédemment,

pour obtenir le composé de formule (V bis) :

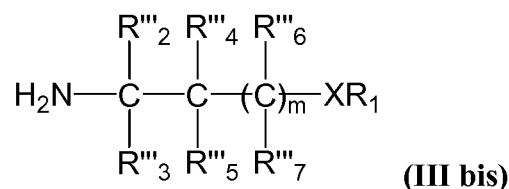


dans laquelle m , X , R_1 , R''_2 , R''_3 , R''_4 , R''_5 , R''_6 , R''_7 , A , n , R_8 et R_9 sont tels que définis précédemment,

- ladite étape de monoalkylation étant suivie d'une étape de coupure du groupement sulfonyle R_{10} du composé (V bis) afin d'obtenir le composé de formule générale (V), le composé (V) étant un précurseur direct du composé de formule générale (I bis), ledit composé (I bis) formant le radical (I) au sein du peptide C $^\alpha$ -amide de l'invention.

Selon un deuxième mode de réalisation avantageux de l'invention, le procédé de préparation du composé (I bis) est caractérisé en ce qu'il comporte :

- une étape de mono-*N*-alkylation d'un composé de formule générale (III bis) :

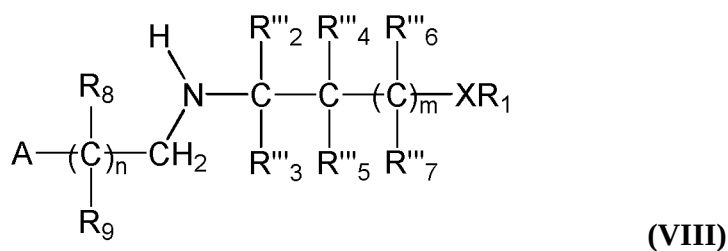


dans laquelle X , R_1 , m , sont tels que définis précédemment,

- un des R''_2 , R''_3 , R''_4 , R''_5 , R''_6 ou R''_7 représente un groupe réactif comprenant une fonction chimique réactive éventuellement protégée par un groupe protecteur, ladite fonction étant choisie de préférence dans le groupe comprenant -COOH, -NH₂ ou -OH, et permettant de greffer ledit composé (III bis) sur le support solide tel que mentionné ci-dessus selon une méthode connue de l'homme de l'art pour la SPPS en stratégie Fmoc, ledit groupe protecteur éventuel étant choisi de préférence dans un groupe comprenant tert-butyle, tert-butyloxycarbonyle, phénacyle, benzyle, benzyloxycarbonyle, méthyle, éthyle, trityle et allyle,

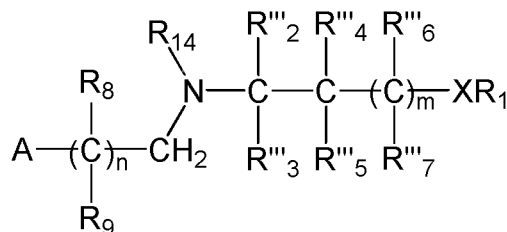
- les autres desdits R''_2 , R''_3 , R''_4 , R''_5 , R''_6 ou R''_7 qui ne représentent pas ledit groupe réactif ont la même signification que lesdits R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 ou R_7 tels que définis précédemment et qui ne représentent pas -B-C-D,

- afin d'obtenir un composé de formule générale (VIII) :



dans laquelle X, R₁, m, R'''₂, R'''₃, R'''₄, R'''₅, R'''₆, R'''₇, n, R₈, R₉ et A sont tels que définis précédemment,

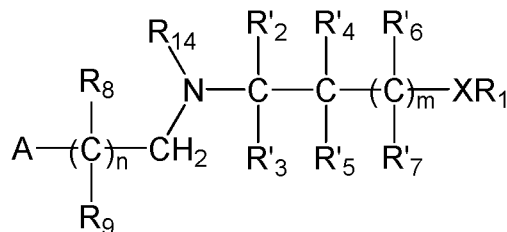
- une étape de *N*-acylation ou de protection de la fonction aminé secondaire du composé de formule (VIII) afin d'obtenir un composé de formule générale (VIII bis) :



(VIII bis)

dans laquelle R_{i4} = R_{i3} tel que défini précédemment ou R_{i4} représente un résidu amino acyle protégé de formule R_{i3}-Xaa- avec Xaa représentant un résidu d'acide aminé, les éventuelles fonctions réactives de la chaîne latérale du résidu d'acide aminé Xaa étant protégées par des groupes protecteurs habituellement utilisés par l'homme de l'art lors de la SPPS,

- une étape éventuelle de déprotection de la fonction réactive comprise dans l'un desdits R''', pour donner un composé de formule générale (VIII ter)

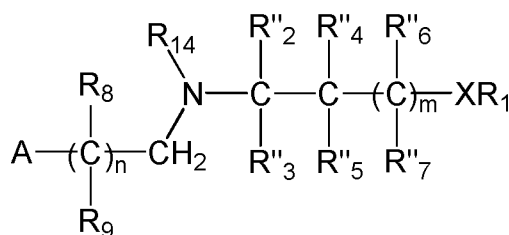


(VIII ter)

- une étape de greffage du composé (VIII ter) sur un support solide de formule :



dans lequel E, C et D' sont tels que définis précédemment et H, O, NH et Cl correspondant aux symboles chimiques habituellement utilisés, afin d'obtenir le composé de formule (V ter) :



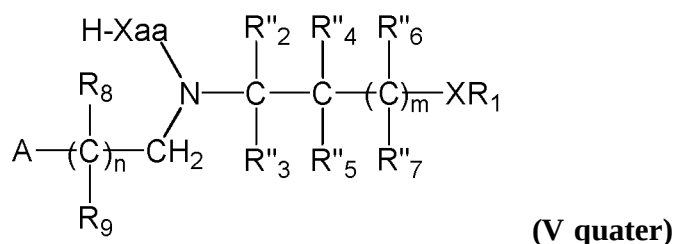
(V ter)

dans laquelle

X, Ri, m, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ et A sont tels que définis précédemment,

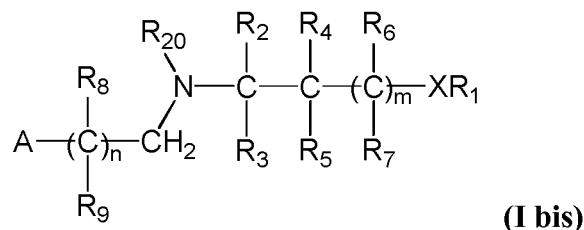
- dans le cas où R₁₄ = R₃, ladite étape de greffage étant suivie d'une étape de coupure du groupement R₁₄ du composé (V ter) afin d'obtenir un composé de formule générale (V) tel que défini précédemment, ledit composé (V) étant un précurseur direct d'un composé de formule (I bis) tel que défini précédemment,

- dans le cas où R₁₄ = R₃-Xaa-, ladite étape de greffage étant suivie d'une étape de coupure du groupement R₃ faisant partie du groupement R₁₄ du composé (V ter) afin d'obtenir un composé de formule générale (V quater),



ledit composé (V quater) étant le précurseur d'un peptide C^α-amide de l'invention comportant un radical (I), par élongation de la chaîne peptidique par SPPS.

L'invention a encore pour objet un composé caractérisé en ce qu'il présente la formule générale (I bis) :



dans laquelle :

X, Ri, m, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, n, R₈, R₉ et A sont tels que définis précédemment et R₂₀ représente un hydrogène ou R₁₄.

L'invention a encore pour objet un procédé de préparation d'un peptide C^α-amide de formule (II) tel que défini ci-dessus par SPPS en stratégie Fmoc, caractérisé en ce qu'il comporte une étape d'élongation par Fmoc SPPS du composé (I bis) tel que défini précédemment, ladite étape d'élongation permettant d'ajouter Peptidel tel que défini précédemment.

De manière avantageuse selon l'invention l'accrochage du premier acide aminé sur le composé (I bis) par N-acylation (à savoir l'ajout d'un acide aminé sur l'azote

du composé (I bis)), pourra être effectué de manière très aisée grâce à la structure même du composé (I bis).

En effet l'utilisation du composé de l'invention (I bis) est extrêmement avantageuse, comparée par exemple au composé (h) de l'art antérieur défini à la figure 5-1, puisque c'est la structure originale dudit composé (I bis) qui permet de faciliter cette étape de N-acylation de l'aminé secondaire.

La présente invention a encore pour objet un procédé de préparation d'un peptide C^α-thioester de formule générale (IX) :



dans laquelle :

R'- représente un radical provenant d'un thiol de formule R'-SH, et Peptidel est tel que défini précédemment,

caractérisé en ce qu'il comprend une réaction de thio-estérification entre :

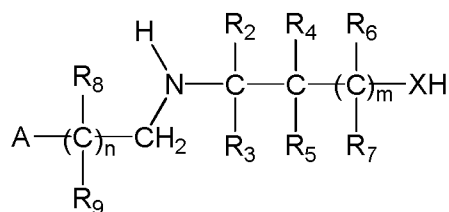
- le peptide C^α-amide de formule (II) tel que défini précédemment et dans laquelle R_i = H et,

- un thiol de formule R'-SH,

afin d'obtenir :

- le peptide C^α-thioester de formule (IX) tel que défini ci-dessus et,

- le composé de formule (I ter) :



(I ter)

dans laquelle :

X, m, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, n, R₈, R₉ et A sont tels que définis précédemment.

Le composé (I ter) correspond au composé de formule générale (I bis) dans laquelle R_i et R₂₀ représente chacun un atome d'hydrogène.

Le radical R'- provenant du thiol de formule R'-SH, peut représenter n'importe quel radical permettant de former un thiol (R'-SH) lorsqu'il est lié à la fonction SH du thiol.

Le radical R'- pourra par exemple représenter un groupement alkyle, aryle, arylalkyle, cycloalkyle, hétérocycloalkyle, hétéroaryle tel que défini ci-dessus, chacun desdits groupements pouvant en outre comporter un ou plusieurs substituants

classiques choisis parmi : halogène, carboxyle, sulfonate, ammonium, alcool, éther, alkyle, cycloalkyle, hétérocycloalkyle, aryle, hétéroaryle, alcoxy, halogénoalkyle, arylalkyle, hétéroarylalkyle, arylhétérocycloalkyle.

A titre d'exemple de radical alkyle on pourra citer un de ceux choisis dans le groupe comprenant éthyle, 2-hydroxyéthyle, 3-hydroxypropyle, $\text{NaSO}_3\text{CH}_2\text{CH}_2^-$, $\text{HOOC-CH}_2\text{CH}_2^-$, HOOC-CH_2^- ou $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_2^-$.

A titre d'exemple de radical aryle ou arylalkyle on pourra citer un de ceux choisis dans le groupe comprenant benzyle ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2^-$), 4-méthoxybenzyle ($p\text{-MeO-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2^-$), 2,4,6-triméthoxybenzyle, 4-méthylbenzyle, phényle (C_6H_5^-), $p\text{-(HOOC-CH}_2\text{)-C}_6\text{H}_4^-$, $p\text{-CF}_3\text{-C}_6\text{H}_4^-$, $p\text{-F-C}_6\text{H}_4^-$, $p\text{-Cl-C}_6\text{H}_4^-$, $p\text{-Br-C}_6\text{H}_4^-$, $p\text{-I-C}_6\text{H}_4^-$, $p\text{-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4^-$, $p\text{-Me-C}_6\text{H}_4^-$ ou $p\text{-HO-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4^-$.

La réaction entre le peptide C^α -amide de formule (II) et le thiol $\text{R}'\text{-SH}$ pourra être effectuée en présence d'un excès de thiol dans de l'acide trifluoroacétique (TFA), de l'acide acétique, de l'acide formique ou dans un tampon aqueux, éventuellement additionné d'un co-solvant organique, d'urée ou de chlorure de guanidinium, pour assurer la solubilisation du peptide C^α -amide de formule (II) ou du thiol $\text{R}'\text{-SH}$.

Le pH du tampon aqueux pourra être de 0 à 8, et de préférence de 1 à 4.

A titre d'exemple de co-solvant organique on pourra citer un de ceux choisis dans le groupe comprenant l'acétonitrile (MeCN), le méthanol (MeOH), l'isopropanol (iPrOH), le diméthylformamide (DMF) ou la N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP).

De manière préférée, la réaction pourra être effectuée dans un mélange eau/MeCN 7:3, en présence de 0,1% v/v TFA et de 50 équivalents d'un thiol $\text{R}'\text{SH}$.

Dans un mode particulier de préparation d'un peptide C^α -thioester de formule (IX), D représente un support solide convenant pour la SPPS en stratégie Fmoc et C est absent ou représente un bras utilisable pour la SPPS en stratégie Fmoc et de préférence un bras stable au TFA tel que le bras PAM ou MBHA. Dans ce mode particulier, l'obtention du peptide C^α -thioester de formule (IX) est effectuée à l'aide, dans un premier temps, d'un traitement au TFA de la peptidyle résine pour couper les groupements protecteurs des chaînes latérales de Peptide 1 utilisés lors de l'étape d'élongation du peptide 1 par Fmoc SPPS, sans le décrocher du support solide. Puis, dans un deuxième temps, on effectue la thio-estérification du peptide déprotégé supporté obtenu après le traitement au TFA à l'aide du thiol $\text{R}'\text{-SH}$. Ceci a également pour effet de décrocher le peptide C^α -thioester de formule (IX) du support solide.

De façon avantageuse selon l'invention, le peptide C^α-amide tel que défini ci-dessus pourra être utilisé pour préparer un peptide C^α-thioester. L'invention a donc aussi pour objet l'utilisation d'un peptide C^α-amide tel que défini ci-dessus pour préparer un peptide C^α-thioester.

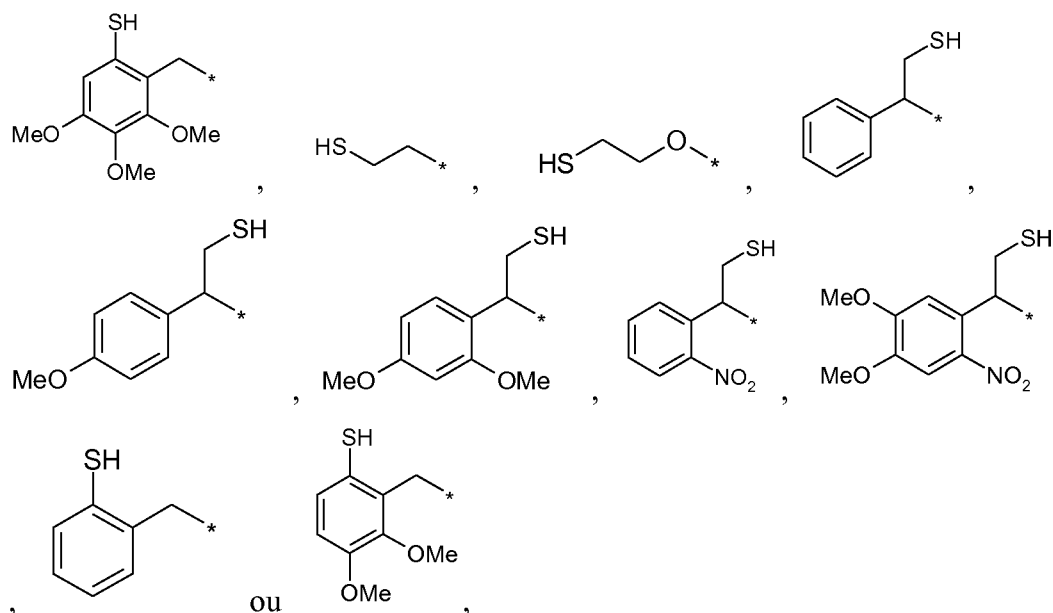
5 L'invention concerne encore un procédé de préparation d'un peptide de formule générale (X) :



dans laquelle :

Peptide 1 est tel que défini précédemment,

10 Yaa est un résidu d'acide aminé provenant d'un acide aminé de formule H-Yaa-OH choisi dans le groupe comprenant une cystéine, une homocystéine, une β-mercapto-valine, une β-mercapto-leucine, une β-mercapto-isoleucine, une β-mercapto-phénylalanine, une β-mercapto-lysine, une β-mercapto-proline, une γ-mercapto-valine, une γ-mercapto-isoleucine, une γ-mercapto-leucine, une γ-mercapto-lysine, une γ-mercapto-proline, ou un acide aminé substitué sur son atome d'azote N^α par un groupement contenant une fonction β- ou γ-amino thiol ledit groupement étant choisi dans le groupe comprenant:



Peptide2= (Xaa)_i, avec 1= un entier allant de 1 à 60, de préférence de 4 à 40,

Xaa représente indépendamment les uns des autres un résidu d'acide aminé provenant d'un acide aminé de formule H-Xaa-OH, et lorsque 1 est supérieur ou

égal à 2, chacun desdits Xaa étant relié à son voisin Xaa par une liaison peptidique,

Ris représente -OH, -NH₂ ou un radical de formule générale (I) tel que défini ci-dessus, dans laquelle X= S et Ri est un groupe protecteur du soufre qui est stable à un traitement au TFA et stable dans des conditions de NCL,

caractérisé en ce que l'on fait réagir par une réaction de NCL :

un peptide C^α-amide de formule générale (II) tel que défini ci-dessus, dans laquelle RI = H ou un groupement labile dans des conditions de ligation chimique native NCL,

avec un peptide possédant un résidu β- ou γ-amino thiol N terminal de formule générale (XI) :

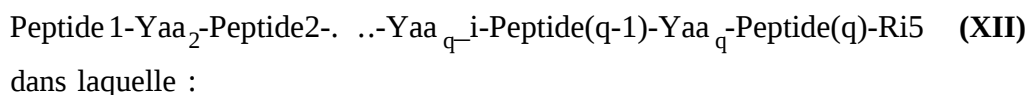


dans laquelle Yaa, Ri₅ et Peptide2 sont tels que définis ci-dessus, afin d'obtenir

- le peptide de formule générale (X) tel que défini ci-dessus et
- le composé de formule (I bis) tel que défini ci-dessus.

De façon avantageuse selon l'invention, les peptides C^α-amides présentent des propriétés de crypto-thioesters et à cet égard peuvent donc être utilisés directement dans une réaction de ligation chimique native NCL, sans être convertis préalablement en peptides C^α-thioesters. L'invention a donc aussi pour objet l'utilisation d'un peptide C^α-amide tel que défini ci-dessus dans une réaction de ligation native NCL (« Native Chemical Ligation ») pour préparer un peptide ou une protéine, en particulier d'intérêt thérapeutique.

La présente invention a encore pour objet un procédé de préparation d'un peptide de formule générale (XII) :



Ris est tel que défini précédemment,

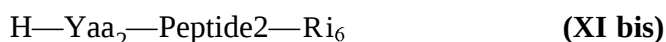
q est un entier allant de 3 à 10,

chaque Yaa (Yaa₂, ..., Yaa_{q-1} et Yaa_q) représente indépendamment les uns des autres un résidu d'acide aminé tel que défini précédemment,

chaque Peptide de la formule (XII) ci-dessus (Peptide2 ... Peptide(q-1) et Peptide(q)), excepté le Peptidel, représente indépendamment les uns des autres (Xaa)_i tel que défini précédemment à propos de Peptide2,

caractérisé en ce que l'on fait réagir par une première réaction de NCL :

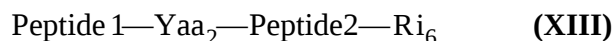
- 5 un peptide de formule (II) tel que défini précédemment dans laquelle Ri = H ou un groupement labile dans des conditions de ligation chimique native NCL, avec un peptide de formule générale (XI bis) :



- 10 dans laquelle :

Yaa₂ est égal à Yaa tel que défini précédemment, et Peptide2 est tel que défini précédemment, Ri₆ représente un radical de formule (I) dans laquelle Ri représente un groupement protecteur stable dans des conditions de NCL, afin d'obtenir un peptide de formule générale (XIII) :

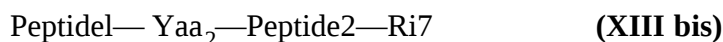
15



dans laquelle :

Yaa₂, Peptidel, Peptide2 et Ri₆ sont tels que définis précédemment, et un composé de formule (I ter) tel que défini précédemment.

- 20 Le peptide de formule générale (XIII) présentant le radical Ri₆ tel que défini précédemment est ensuite soumis à une déprotection dans les conditions connues de l'homme de l'art afin d'obtenir le peptide de formule générale (XIII bis) :

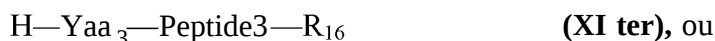


- 25 dans laquelle :

Ri₇ représente un radical de formule (I) dans laquelle Ri représente un hydrogène.

Le composé (XIII bis) ainsi obtenu est :

- soit converti au préalable en peptide thioester puis mis à réagir avec un peptide
30 de formule générale (XI ter) :



- soit directement mis à réagir avec le peptide de formule (XI ter), en exploitant les propriétés de crypto-thioester du composé (XIII bis).

Cet assemblage successif est continué de façon itérative, en répétant (q-3) fois les étapes successives de NCL et de déprotection telles que décrites ci-dessus.

5 Le composé final de formule générale (XII) est obtenu par un dernier assemblage permettant de rajouter le Peptide(q).

Ce dernier assemblage s'effectue :

- soit en deux étapes, à savoir conversion préalable en thioester puis réaction avec un peptide de formule générale (XI quater) :

10
$$\text{H—Yaa}_q\text{—Peptide(q)—R}_{15} \quad \textbf{(XI quater)}, \text{ ou}$$

- soit par réaction directe avec ledit peptide de formule (XI quater).

Lorsque q est un entier égal à 3, alors le peptide de formule (XII) est représenté par la formule (XII) suivante :

$$\text{Peptide 1—Yaa}_2\text{—Peptide 2—Yaa}_3\text{—Peptide 3—R}_{15} \quad \textbf{(XII)}.$$

15

Le composé de formule (XI bis) est un peptide C^α-amide qui ne présente pas des propriétés de crypto-thioester du fait du masquage de sa fonction thiol par un radical Ri représentant un groupe protecteur du soufre stable à un traitement au TFA et stable dans des conditions de NCL.

20 Un groupement Ri préféré du radical (I) présent dans ledit composé (XI bis) est plus particulièrement un groupement choisi dans le groupe comprenant acétamidométhyle (Acm), triméthylacétamidométhyle (Tacm), benzamidométhyle (Bam), allyloxycarbonylaminométhyle (Allocam), phtalimidométhyle (Pim), 2-(triméthylsilyl)éthyle, t-butyle (tBu), 2,4,6-triméthylbenzyle, quinolinylméthyle (Qm),
25 diphényl-4-pyridylméthyle, 1-adamantyle, benzyloxyméthyle (BOM), 2-tetrahydropyranyle (Thp) et benzylthiométhyle.

Selon un mode de réalisation préféré du procédé de préparation du peptide de formule générale (XII), le Peptidel est préalablement greffé sur un support solide hydrocompatible, comme par exemple un support choisi dans un groupe comprenant
30 PEGA[®], CHEMMATRIX[™], l'agarose, le sépharose et des microparticules de verre à porosité contrôlée (CPG, controlled pore glass). Plus particulièrement le Peptidel est greffé sur un support solide par un lien pouvant être coupé après les (q-1) étapes de ligation chimique native NCL, ledit lien étant de préférence un bras N-terminal tel

que décrit dans le document WO 2011/058188. D'autres réactions de ligations (nécessitant éventuellement d'autres types de précurseurs) pourront également être combinées avec la NCL dans une même stratégie de ligations multiples sur support solide de N vers C.

5 L'invention sera mieux comprise à la lumière des exemples non limitatifs et purement illustratifs suivants. Les figures 6 à 26 permettent d'illustrer lesdits exemples ci-dessous.

Les figures 1 à 5, concernant l'art antérieur, ont été commentées ci-dessus dans l'introduction de la présente demande.

10 La figure 1 représente les étapes de la Synthèse Peptidique sur Phase Solide (SPPS).

La figure 2 représente les groupements protecteurs des aminés (Boc et Fmoc) utilisés en SPPS.

15 La figure 3 représente une réaction de ligation chimique native « NCL » entre un peptide C^α-thioester (composé (a)) et un peptide portant une cystéine N-terminale (composé (b)).

La figure 4 représente l'utilisation de peptides C^α-N-alkyl(ou aryl)-N-(β-mercaptoalkyl)-amides (e) pour :

- 20 - la synthèse de peptides C^α-thioesters (a) (par transfert d'acyle de N vers S) (Fig. 4-1 et 4-2),
- l'utilisation directe en NCL (Fig. 4-3).

La figure 5-1 représente un schéma de principe de synthèse de peptides C^α-β-mercapto-amides de type (e), détaillant l'étape difficile de N-acylation de l'aminé secondaire.

25 La figure 5-2 est une comparaison entre l'acylation d'une aminé secondaire portant un groupement 2-hydroxybenzyle (j) et celle d'une aminé secondaire portant un groupement 2-méthoxybenzyle (m), et illustre plus particulièrement le principe de l'assistance par un groupement 2-hydroxybenzyle de l'acylation d'une aminé secondaire.

30 La figure 6 est un schéma de synthèse illustrant la préparation de six composés de l'invention répondant à la formule générale (I bis) (composés **3a**, **3b**, **3c**, **3'a**, **3'b** et **3'c**).

La figure 7 est un schéma de synthèse illustrant la préparation d'un peptide C^α-amide de formule générale (II) (composés **5** et **5'**) à partir d'un composé de formule générale (I bis) (composé **3a**).

5 La figure 8 représente le chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du peptide **2'** représenté à la figure 6.

Les figures 9, 10 et 11 représentent les chromatogrammes d'analyses par HPLC/MS respectifs des peptides **3'a**, **3'b** et **3'c** représentés à la figure 6.

Les figures 12 et 13 représentent les chromatogrammes d'analyses par HPLC/MS respectifs des peptides **4'a** et **4'b** représentés à la figure 7.

10 La figure 14 représente le chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du peptide **5'** représenté à la figure 7.

La figure 15 représente l'utilisation d'un peptide C^α-amide de formule générale (II) (composé **5'**) pour obtenir un peptide C^α-thioester (composé **6**).

15 La figure 16 représente l'utilisation d'un peptide C^α-amide de formule générale (II) (composé **5'**) dans une réaction de NCL pour obtenir un peptide modèle (composé **9**) (réactivité de type crypto-thioester).

La figure 17 est un schéma de synthèse illustrant la préparation de trois composés de l'invention répondant à la formule générale (I bis) (composés **12**, **13** et **13'**).

20 La figure 18 représente le chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du composé **13'** représenté à la figure 17.

La figure 19 est un schéma de synthèse illustrant la préparation d'un peptide C^α-amide de formule générale (II) (composés **14** et **14'**) à partir d'un composé de formule générale (I bis) (composé **12**).

25 La figure 20 représente le chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS des peptides **14'** et **14''** représentés à la figure 19.

La figure 21 est un schéma de synthèse illustrant la préparation d'un peptide C^α-amide de formule générale (II) (composés **15** et **15'**) à partir d'un composé de formule générale (I bis) (composé **13**).

30 La figure 22 représente le chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du peptide **15'** représenté à la figure 21.

La figure 23 représente l'utilisation des peptides **14** et **14''** dans une réaction de ligation chimique native NCL pour donner un peptide **17**, suivi d'un repliement oxydatif *one-pot* afin d'obtenir un peptide **19**.

La figure 24 représente le chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du peptide **16** représenté à la figure 23.

La figure 25 représente le chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du peptide **17** représenté à la figure 23.

5 La figure 26 représente le chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du peptide **19** représenté à la figure 23.

EXEMPLES

10 Dans les exemples 1 et 2 décrits ci-dessous, dans le radical de formule (I) ou dans le composé (I bis):

X représente un atome de soufre,

R_i représente un atome d'hydrogène ou un groupe trityle (Trt),

R₂ représente un groupe -B-C-D dans lequel :

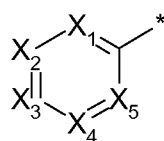
15 B représente -CO-Leu-Tyr-Arg-Ala-Gly-O-, C est absent et D représente un atome d'hydrogène, ou

B représente -CO-Leu-Tyr(t-Bu)-Arg(Pbf)-Ala-Gly-O-, C représente un bras de Wang (-CH₂-C₆H₄-O-CH₂-) et D représente un support solide tel qu'une résine de type polystyrène,

R₃, R₄ et R₅ représentent chacun un atome d'hydrogène

20 m est égal à n qui est égal à 0,

A représentant un groupe aryle de formule générale :



dans laquelle X_i représente C-OH, chacun des X₂, X₃ et X₅ représente CH et X₄ représente CH, C-OCH₃ ou C-NO₂,

25 et, si il s'agit du composé (I bis), R_{2o} représente un atome d'hydrogène.

Lorsque D représente un atome d'hydrogène cela signifie que le radical (I) n'est pas accroché sur un support solide. Dans ce cas R_i représente H et R₂ représente un groupe -B-C-D dans lequel B représente -CO-Leu-Tyr-Arg-Ala-Gly-O-, C est absent et D représente un atome d'hydrogène.

30 Lorsque D représente un support solide cela signifie que le radical (I) est accroché sur ledit support solide (ledit support solide faisant partie intégrante de la

définition du radical (I)). Dans ce cas **R_i** représente le trityle (Trt) et **R₂** représente un groupe -B-C-D dans lequel B représente -CO-Leu-Tyr(t-Bu)-Arg(Pbf)-Ala-Gly-O-, C représente un bras de Wang (-CH₂-C₆H₄-O-CH₂-) et D représente un support solide tel qu'une résine de type polystyrène.

5 Les produits obtenus ont été analysés par HPLC sur Colonne : nucleosil C18 300A 5μm, 4,6x250 mm, gradient : 5-50% MeCN/H₂O + 0,1% TFA en 30 min, débit : 1 ml/min, suivie d'une détection UV (λ=276 nm ou 360 nm) puis d'une spectrométrie de masse MALDI-TOF.

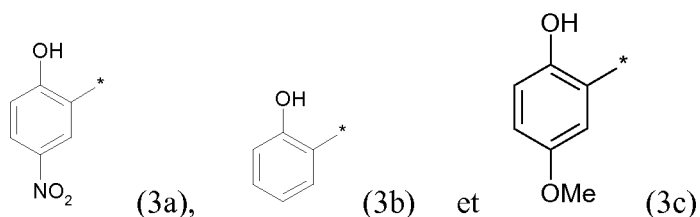
10 Exemple 1 :

Préparation d'un peptide C^α-amide de formule générale (II)

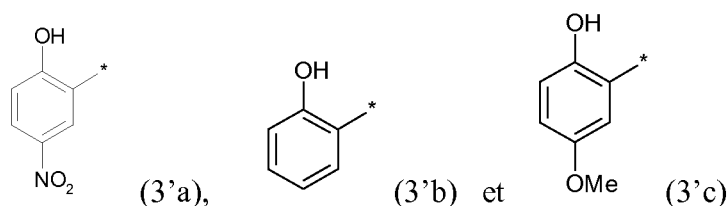
1) Synthèse d'un composé de formule générale (I bis)

15 La synthèse d'un composé de formule générale (I bis) est illustrée à la figure 6. Les composés **3a**, **3b**, **3c** et **3'a**, **3'b** et **3'c** répondent à la formule générale (I bis) dans laquelle :

→ pour les composés **3a**, **3b** et **3c**, X représente S, **R_i** représente Trt, **R₃**, **R₄** et **R₅** représentent H, m est égal à n qui est égal à 0, **R_{2o}** représente un atome d'hydrogène, **R₂** représente -CO-Leu-Tyr(t-Bu)-Arg(Pbf)-Ala-Gly-O- [bras de Wang]-[Résine], et A représente respectivement :



→ pour les composés **3'a**, **3'b** et **3'c**, X représente S, **R_i** représente H, **R₃**, **R₄** et **R₅** représentent H, m est égal à n qui est égal à 0, **R_{2o}** représente un atome d'hydrogène, **R₂** représente -CO-Leu-Tyr-Arg-Ala-Gly-OH, et A représente respectivement :



• Synthèse de la peptidyle résine 2

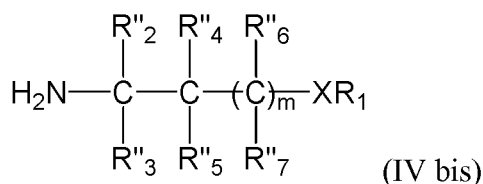
Le schéma de synthèse est illustré à la figure 6.

Le composé 1 répond à la formule H-E-O-C-D' telle que définie ci-dessus dans laquelle :

5 E représente Leu-Tyr(t-Bu)-Arg(Pbf)-Ala-Gly,

C représente un bras de Wang et D' représente une résine de type polystyrène.

Le composé 2 répond à la formule générale (IV bis) telle que définie ci-dessus :

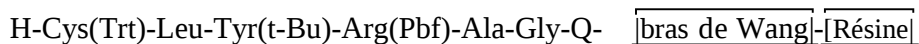


10 dans laquelle

X représente S, Ri représente Trt, R''₃, R''₄, R''₅, R''₆ et R''₇ représentent H, m est égal à 0 et, R''₂ représente :



15 La peptidyle résine 2 de formule :



a été synthétisée dans des conditions standard (synthétiseur ABI 433, programme Fastmoc). Une aliquote de résine est traitée pendant 2h par CF₃COOH/phénol/H₂O/*tri*-isopropylsilane 87,5:5:5:2,5 pour décrocher et déprotéger le peptide 2 afin d'obtenir le peptide 2', qui est précipité par dilution dans un mélange éther de pétrole/Et₂O 1:1, lavé (Et₂O), séché puis analysé par HPLC et spectrométrie de masse (voir figure 8).

Peptide V (voir figure 8):

Formule brute : C₂₉H₄₇N₉O₈S ;

25 HPLC : t_R = 14,41 min (C18, gradient : 5-50% MeCN/H₂O + 0,1%TFA en 30 min) ;

Détection UV (λ=276 nm) ;

MS (MALDI-TOF) : m/z observée = 682,0 ([MH]⁺ calculée pour C₂₉H₄₇N₉O₈S = 682,3).

30

• Animations réductrices

Le schéma de synthèse est illustré à la figure 6.

0,1 mmol de la peptidyle résine **2** de formule :

H-Cys(Trt)-Leu-Tyr(t-Bu)-Arg(Pbf)-Ala-Gly-Q- [bras de Wang]-[Résine]

5 est solvatée dans le mélange diméthylformamide /méthanol/acide acétique (9 :9 :2).

10 20 équivalents d'aldéhyde (de formule générale VII) tel que représenté à la figure 6 sont ensuite dissouts dans 4 mL de diméthylformamide /méthanol (1 :1) et sont ajoutés à la peptidyle résine **2**. La suspension ainsi obtenue est agitée pendant 45 minutes. La résine est ensuite lavée avec le mélange diméthylformamide /méthanol (1 :1).

15 20 équivalents de NaBH_3CN sont dissouts dans 4 mL de diméthylformamide /méthanol/acide acétique (9 :9 :2) puis ajoutés à la résine. La suspension ainsi obtenue est agitée pendant 30 minutes. La résine est lavée avec le mélange diméthylformamide /méthanol/acide acétique (9 :9 :2). Une aliquote de résine est traitée pendant 2h par TFA/PhOH/ H_2O / $\text{z}'\text{-Pr}_3\text{SiH}$ 87,5:5:5:2,5 pour décrocher et déprotéger le peptide **3a**, **3b** ou **3c** afin d'obtenir respectivement le peptide **3'a**, **3'b** ou **3'c**, qui est précipité par dilution dans un mélange éther de pétrole/ Et_2O 1 :1, lavé (Et_2O), séché puis analysé par HPLC et spectrométrie de masse (voir figures 9, 10 et 11).

Peptide **3'a** (figure 9):

Formule brute : $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_{10}\text{O}_{11}\text{S}$;

HPLC : $t_R = 20,44$ min (Cl 8, gradient : 5-50% MeCN/ H_2O + 0,1%TFA en 30 min) ;

25 Détection UV ($\lambda = 360$ nm) ;

MS (MALDI-TOF) : m/z observée = 833,3 ($[\text{MH}]^+$ calculée pour $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_{10}\text{O}_{11}\text{S}$ = 833,4).

Peptide **3'b** (figure 10) :

Formule brute : $\text{C}_{36}\text{H}_{53}\text{N}_9\text{O}_9\text{S}$;

30 HPLC : $t_R = 19,17$ min (gradient : 5-50% MeCN/ H_2O + 0,1%TFA en 30 min) ;

Détection UV ($\lambda = 276$ nm) ;

MS (MALDI-TOF) : m/z obtenue = 788,3 ($[\text{MH}]^+$ calculée pour $\text{C}_{36}\text{H}_{53}\text{N}_9\text{O}_9\text{S}$ = 788,4).

Peptide **3'c** (figure 11) :

Formule brute : $C_{37}H_{55}N_9O_{10}S$;

HPLC : $t_R = 19,59$ min (Cl 8, gradient : 5-50% MeCN/ H_2O + 0,1%TFA en 30 min) ;

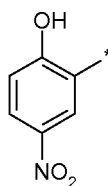
5 Détection UV ($\lambda = 276$ nm) ;

MS (MALDI-TOF) : m/z obtenue = 818,4 ($[MH]^+$ calculée pour $C_{37}H_{55}N_9O_{10}S = 818,4$).

2) Synthèse d'un peptide C $^\alpha$ -amide de formule générale (II)

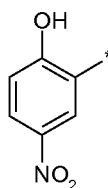
10 La synthèse d'un peptide C $^\alpha$ -amide de formule générale (II) est illustrée à la figure 7. Les composés **5** et **5'** répondent à la formule générale (II) dans laquelle :

→ pour le composé **5**, X représente S, Ri représente Trt, R_3 , R_4 et R_5 représentent H, Peptide 1 représente Ac-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Pfie-Gly, m est égal à n qui est égal à 0, R_2 représente -CO-Leu-Tyr(t-Bu)-Arg(Pbf)-Ala-Gly-0- bras de Wang-Résine, et
15 A représente



→ pour le composé **5'**, X représente S, Ri représente H, R_3 , R_4 et R_5 représentent H, Peptide 1 représente Ac-Tyr-Arg-Phe-Gly-, m est égal à n qui est égal à 0, R_2 représente -CO-Leu-Tyr-Arg-Ala-Gly-OH, et A représente :

20



• Couplage de la Fmoc-glycine sur la N-alkyl cystéine supportée **3a**

Le couplage de la Fmoc-glycine sur la peptidyl résine **3a** est illustré à la figure 7.

25 Le couplage de la Fmoc-glycine sur la peptidyl résine **3a** est réalisée dans des conditions standard (ABI 433, programme Fastmoc). La peptidyl résine **3a** est solvatée dans du DMF. Puis 10 équivalents d'acide aminé protégé (Fmoc-Gly-OH tel

que représenté sur la figure 7) sont activés par 10 équivalents de HBTU (O-benzotriazole -*NN,N'*-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphate) en présence de 10 équivalents de HOBt (1-hydroxybenzotriazole) et 20 équivalents de DIEA (diisopropylamine) puis ajoutés à la résine, qui est ensuite agitée pendant 30 minutes à température ambiante. La résine est rincée avec DMF et CH_2Cl_2 puis le groupement Fmoc est coupé à l'aide de pipéridine (20% dans la NMP), trois traitements successifs de cinq minutes chacun. La résine est rincée avec du DMF et du CH_2Cl_2 . Une aliquote de résine **4a** ainsi obtenue est traitée pendant 2h par TFA/PhOH/FLO/z'-Pr₃SiH 87,5:5:5:2,5 pour décrocher et déprotéger le peptide **4a** et obtenir le peptide **4'a**, qui est analysé par HPLC et spectrométrie de masse (figure 12).

Peptide **4'a** (figure 12):

Formule moléculaire : $\text{C}_{38}\text{H}_{55}\text{N}_{11}\text{O}_{12}\text{S}$;

HPLC : $t_R = 20,53$ min (Cl 8, gradient : 5-50% MeCN/ H_2O + 0,1%TFA en 30 min) ;

Détection UV ($\lambda = 276$ nm) ;

MS (MALDI-TOF) : m/z obtenue = 890,4 ($[\text{MH}]^+$ calculée pour $\text{C}_{38}\text{H}_{55}\text{N}_{11}\text{O}_{12}\text{S}$ = 890,4).

• Couplage de la Fmoc-alanine sur la N-alkyl cystéine supportée **3a**

Le couplage de la Fmoc-alanine sur la peptidyle résine **3a** est illustré à la figure 7.

La peptidyle résine **3a** est solvatée dans du DMF. Puis 10 équivalents de Fmoc-alanine protégée (Fmoc-Ala-OH tel que représenté sur la figure 7) sont activés par 10 équivalents de HBTU en présence de 10 équivalents de HOBt et 20 équivalents de DIEA dans le DMF et de la peptidyle résine **3a** pendant 30 minutes à température ambiante. Cette étape est réalisée deux fois. La résine est rincée avec DMF et DCM puis l'aminé est déprotégée avec de la pipéridine (20% dans la NMP), à trois reprises pendant cinq minutes. La résine est rincée avec du DMF et du DCM. Une aliquote de résine **4b** ainsi obtenue est traitée pendant 2h par TFA/PhOH/ H_2O /z'-Pr₃SiH 87,5:5:5:2,5 pour décrocher et déprotéger le peptide **4b** et obtenir le peptide **4'b**, qui est analysé par HPLC et spectrométrie de masse (figure 13).

Peptide **4'b** (figure 13) :

Formule moléculaire : $\text{C}_{39}\text{H}_{57}\text{N}_{11}\text{O}_{12}\text{S}$;

HPLC : $t_R = 21,50$ min (gradient : 5-50% MeCN/H₂O + 0,1%TFA en 30 min
détection DAD) ;

Détection UV ($\lambda = 276$ nm) ;

MS (MALDI-TOF) : m/z obtenue = 904,5 ([MH]⁺ calculée pour C₃₉H₅₇N₁O₁₂S
= 904,4);

• Elongation du peptide 5' à partir du composé 4a obtenu

L'élongation du peptide 5' est représenté à la figure 7.

La suite de l'élongation du peptide est réalisée dans des conditions standard (ABI
433, programme Fastmoc) avec la peptidyle résine 4a. Une aliquote de résine 5 est
traitée pendant 2h par TFA/PhOH/H₂O/z-Pr₃SiH 87,5:5:5:2,5 pour obtenir le peptide
5' qui est précipité par dilution dans un mélange éther de pétrole/Et₂O 1:1, lavé
(Et₂O), séché puis analysé par HPLC et spectrométrie de masse (figure 14).

Peptide 5' (figure 14) :

Formule moléculaire : C₃₉H₅₇N₁O₁₂S ;

HPLC : $t_R = 21,50$ min (gradient : 5-50% MeCN/H₂O + 0,1%TFA en 30 min
détection DAD) ;

Détection UV ($\lambda = 276$ nm) ;

MS (MALDI-TOF) : m/z obtenue = 904.5 ([MH]⁺ calculée pour C₃₉H₅₇N₁O₁₂S
= 904.4).

Exemple 2 :

Utilisations du peptide C ^{α} -amide de formule générale (II)

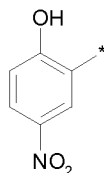
1) Dans une réaction de thioestérification en milieu acide.

L'utilisation d'un peptide C ^{α} -amide 5' de formule générale (II) dans une réaction
de thioestérification est illustrée à la figure 15.

2.5 μ mol de peptide 5' (peptide de formule générale (II)) et 100 μ mol d'acide
mercaptophénylacétique (à savoir un thiol de formule générale R'-SH avec R'
représentant pHOOC-CH₂-C₆H₄- tel que représenté à la figure 15) sont dissouts dans
1 mL du mélange H₂O/MeCN (7:3) + 0,1% TFA. Le mélange réactionnel est agité
pendant 48 heures à température ambiante. L'avancement de la réaction est suivi par
HPLC (figure 15).

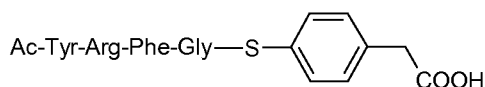
On obtient ainsi le peptide C^α-thioester recherché de formule 6 et le composé 7 répondant à la formule générale (I bis) dans laquelle :

X représente S, R_i représente H, R₃, R₄ et R₅ représentent H, R₂ représente H, m est égal à n qui est égal à 0, R₂ représente -CO-Leu-Tyr-Arg-Ala-Gly-OH, et A représente :



Ce composé de formule (I bis) est particulièrement avantageux du fait de son absorption caractéristique dans l'ultraviolet ($\lambda_{\text{max}} \sim 400-450 \text{ nm}$) : une analyse par HPLC avec détection dans cette gamme de longueur d'onde permet de le détecter et de le caractériser facilement ce qui permettra également à l'homme de l'art de conclure que le peptide C^α-thioester de formule (IX) tel que défini ci-dessus a bien été formé.

Peptide C^α-thioester 6 (figure 15) :



2) Dans une réaction de ligation chimique native NCL

L'utilisation d'un peptide C^α-amide 5' de formule générale (II) dans une réaction de ligation chimique native est illustrée à la figure 16.

Le peptide C^α-amide de formule générale (II) (composé 5'), de par ses propriétés de crypto-thioester, peut être utilisé directement dans une réaction de ligation chimique native NCL, sans le convertir préalablement en peptide C^α-thioester (figure 16).

2.5 μmol de peptide cryptothioester brut 5' et 1.5 équivalents de peptide cystéinyle 8 sont dissouts dans 1 mL de solution dégazée contenant 50 mM d'acide mercaptophénylacétique, 20 mM de triscarboxyéthylphosphine et 200 mM de tampon phosphate pH=7. Le mélange réactionnel est agité pendant 24h à 37°C sous argon.

On obtient ainsi un peptide 9 et un composé 7 de formule générale (I bis).

Peptide 9 (figure 16) : Ac-Tyr-Arg-Phe-Gly-Cys-Leu-Tyr-Arg-Ala-Gly-OH

Dans les exemples 3 et 4 décrits ci-dessous, dans le radical de formule (I) ou dans le composé (I bis):

X représente un atome de soufre,

5 Ri représente un atome d'hydrogène, un groupe trityle (Trt), ou un groupe *tert*-butylsulfanyle (StBu),

R₂ représente un groupe -B-C-D dans lequel :

B représente -CO-NH-, avec

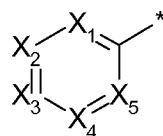
C est absent et D représente un atome d'hydrogène, ou,

10 C représente un bras de Rink (-CH[2,4-di-MeO-C₆H₄]-C₆H₄-O-CH₂-CO-NH-CH₂) et D représente un support solide tel qu'une résine de type ChemMatrix ou polystyrène,

R₃, R₄ et R₅ représentent chacun un atome d'hydrogène,

m est égal à n qui est égal à 0,

A représentant un groupe aryle de formule générale :



15

dans laquelle X_i représente C-OH, chacun des X₂, X₃ et X₅ représente CH et X₄ représente C-NO₂,

et, si il s'agit du composé (I bis), R₂ représente un atome d'hydrogène.

20 Lorsque D représente un atome d'hydrogène cela signifie que le radical (I) n'est pas accroché sur un support solide. Dans ce cas Ri représente H ou un groupe *tert*-butylsulfanyle (StBu) et R₂ représente un groupe -B-C-D dans lequel B représente -CO-NH-, C est absent et D représente un atome d'hydrogène.

25 Lorsque D représente un support solide cela signifie que le radical (I) est accroché sur ledit support solide (ledit support solide faisant partie intégrante de la définition du radical (I)). Dans ce cas Ri représente un groupe trityle (Trt) ou un groupe *tert*-butylsulfanyle (StBu) et R₂ représente un groupe -B-C-D dans lequel B représente -CO-NH-, C représente un bras de Rink (-CH[2,4-di-MeO-C₆H₄]-C₆H₄-O-CH₂-CO-NH-) et D représente un support solide tel qu'une résine de type ChemMatrix ou polystyrène.

30 Les produits obtenus ont été analysés par HPLC sur Colonne : nucleosil C18 300A 5μm, 4,6x250 mm, gradient : 5-50% MeCN/H₂O + 0,1% TFA en 30 min,

débit : 1 ml/min, suivie d'une détection UV ($\lambda=276$ nm ou 320 nm) puis d'une spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Exemple 3 :

5 Préparation de peptides C α -amide de formule générale (II)

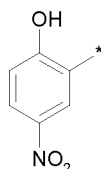
1) Synthèse d'un composé de formule générale (I bis)

La synthèse d'un composé de formule générale (I bis) est illustrée à la figure 17.

10 Les composés **12**, **13** et **13'** répondent à la formule générale (I bis) dans laquelle :

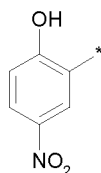
→ pour les composés **12** et **13**, X représente S, R₃, R₄ et R₅ représentent H, m est égal à n qui est égal à 0, R₂₀ représente un atome d'hydrogène,

R₂ représente -CO-NH-bras de Rink|-Résine], A représente :



15 et Ri représente Trt (**12**), ou StBu (**13**)

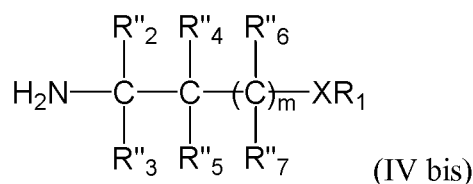
→ pour le composé **13'**, X représente S, Ri représente StBu, R₃, R₄ et R₅ représentent H, m est égal à n qui est égal à 0, R₂₀ représente un atome d'hydrogène, R₂ représente -CO-NH₂, A représente :



20 • Synthèse des cystéinyle résines **10** et **11**

Le schéma de synthèse est illustré à la figure 17.

Les composés **10** et **11** répondent à la formule générale (IV bis) telle que définie ci-dessus :



25 dans laquelle

X représente S, R³, R⁴, R^s, R⁶ et R⁷ représentent H, m est égal à 0, R² représente -NH-[bras de Rink]-[Résine] et Ri représente Trt (**10**) ou StBu (**11**).

Les cystéinyle résines **10** et **11** de formule respective :

H-Cys(Trt)-NH-[bras de Rink]-[Résine] (**10**) et

5 H-Cys(StBu)-NH-[bras de Rink]-[Résine] (**11**),

ont été synthétisées dans des conditions standard (synthétiseur ABI 433, programme Fastmoc).

• Aminations réductrices

10 Le schéma de synthèse est illustré à la figure 17.

0,1 mmol de la peptidyle résine **10** ou **11** telle que définie respectivement ci-dessus est solvatée dans le mélange diméthylformamide/méthanol/acide acétique (9 :9 :2).

15 167 mg (10 équivalents) de 2-hydroxy-5-nitrobenzaldehyde dissouts dans 4 mL de diméthylformamide /méthanol (1 :1) sont ajoutés à la résine. La suspension ainsi obtenue est agitée pendant 45 minutes. La résine est ensuite lavée avec le mélange diméthylformamide /méthanol (1 :1).

20 126 mg (20 équivalents) de NaBH₃CN préalablement dissouts dans 4 mL de diméthylformamide /méthanol/acide acétique (9 :9 :2) sont ajoutés à la résine. La suspension ainsi obtenue est agitée pendant 30 minutes. La résine est lavée avec le mélange diméthylformamide /méthanol/acide acétique (9 :9 :2). Une aliquote de la résine **13** est traitée pendant 2h par TFA/H₂O/z-Pr₃SiH 92,5:5:2,5 afin d'obtenir le composés **13'**, qui est analysé par HPLC et spectrométrie de masse après évaporation du TFA (voir figure 18).

25 Composé **13'** (figure 18):

Formule brute : C₁₄H₂₁N₃O₄S₂ ;

HPLC : t_R = 23,4 min (C18, gradient : 5-50% MeCN/H₂O + 0,1%TFA en 30 min) ;

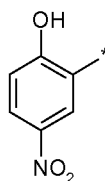
Détection UV (λ= 320 nm) ;

30 MS (ESI+) : m/z observée = 360,1 ([MH]⁺ calculée pour C₁₄H₂₂N₃O₄S₂ = 360,1).

2) Synthèse d'un peptide C^α-amide de formule générale (II)

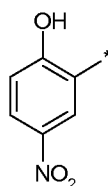
La synthèse d'un peptide C^α-amide de formule générale (II) est illustrée à la figure 19. Les composés **14**, **14'**, **15** et **15'** répondent à la formule générale (II) dans laquelle :

→ pour le composé **14**, X représente S, **Ri** représente Trt, **R₃**, **R₄** et **R₅** représentent H, Peptide 1 représente H-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Asn(Trt)-Gly-Val-Cys(Trt)-Pro-Phe-Glu(OtBu)-Met-Pro-Pro-Cys(Trt)-Gly-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Ala-, m est égal à n qui est égal à 0, **R₂** représente -CO-NH-bras de Rink-Résine, et A représente :

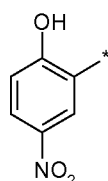


→ pour le composé **14'**, X représente S, **Ri** représente H, **R₃**, **R₄** et **R₅** représentent H, Peptide 1 représente H-Ala-Ser-Cys-Asn-Gly-Val-Cys-Pro-Phe-Glu-Met-Pro-Pro-Cys-Gly-Thr-Ser-Ala-, m est égal à n qui est égal à 0,

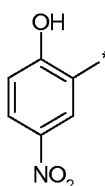
R₂ représente -CO-NH₂, et A représente :



→ pour le composé **15**, X représente S, **Ri** représente StBu, **R₃**, **R₄** et **R₅** représentent H, Peptide 1 représente H-Leu-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Ala-Gly-, m est égal à n qui est égal à 0, **R₂** représente -CO-NH-bras de Rink-Résine, et A représente



→ pour le composé **15'**, X représente S, **Ri** représente StBu, **R₃**, **R₄** et **R₅** représentent H, Peptide 1 représente H-Leu-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Ala-Gly-, m est égal à n qui est égal à 0, **R₂** représente -CO-NH₂, et A représente :



• Elongation du peptide 14' à partir du composé 12

L'élongation du peptide 14' est représentée à la figure 19.

5 L'élongation du peptide est réalisée dans des conditions standard (ABI 433, programme Fastmoc, HCTU comme agent de couplage) avec la résine 12, en effectuant deux fois de suite le couplage du premier acide aminé Fmoc-Ala-OH avant de déprotéger le groupement Fmoc et de continuer l'élongation.

10 La peptidyle résine 14 obtenue est traitée pendant 2h par TFA/PhOH/H₂O/*i*-Pr₃SiH 87,5:5:5:2,5 pour obtenir le peptide 14' qui est précipité par dilution dans un mélange éther de pétrole/Et₂O 1:1, lavé (Et₂O) puis séché sous pression réduite. Le précipité est repris dans de l'eau déminéralisée et lyophilisé. Il est ensuite analysé par HPLC et spectrométrie de masse (figure 21). Le peptide amide 14' est obtenu en mélange avec le peptide thioester 14'' (les deux composés sont en équilibre en solution).

15 Peptide 14' (figure 20) :

Formule moléculaire : C₈₅H₁₂₆N₂₃O₃₁S₅ ;

HPLC : (gradient : 5-50% MeCN/H₂O + 0,1% TFA en 30 min détection UV, λ = 276 nm) - t_R = 25,3 min ;

MS (ESI+) : m/z obtenue = 1055,9 ([M+2H]²⁺).

20 Peptide 14'' (figure 20) :

Formule moléculaire : C₈₅H₁₂₆N₂₃O₃₁S₅ ;

HPLC : t_R = 23,8 min (gradient : 5-50% MeCN/H₂O + 0,1% TFA en 30 min ;

Détection UV (λ = 276 nm) ;

MS (ESI+) : m/z obtenue = 1055,9 ([M+2H]²⁺).

25

• Elongation du peptide 15' à partir du composé 13

L'élongation du peptide 15' est représentée à la figure 21.

30 L'élongation du peptide est réalisée dans des conditions standard (ABI 433, programme Fastmoc, HCTU comme agent de couplage) avec la résine 13, en effectuant deux fois de suite le couplage du premier acide aminé Fmoc-Ala-OH avant de déprotéger le groupement Fmoc et de continuer l'élongation.

La peptidyle résine 15 obtenue est traitée pendant 2h par TFA/*z*-Pr₃SiH 97,5:5:5:2,5 pour obtenir le peptide 15' qui est précipité par dilution dans un mélange éther de

pétrole/Et₂O 1:1, lavé (Et₂O), séché puis analysé par HPLC et spectrométrie de masse (figure 21).

Peptide **15'** (figure 22) :

Formule moléculaire : C₄₃H₆₅N₁₁O₁₁S₂ ;

5 HPLC : t_R = 31.0 min (gradient : 5-50% MeCN/H₂O + 0,1% TFA en 30 min) ;

Détection UV, λ = 320 nm) ;

MS (MALDI-TOF) : m/z obtenue = 976,4 ([MH]⁺ calculée pour C₄₃H₆₅N₁₁O₁₁S₂ = 976,4).

10

Exemple 4 :

Utilisations du peptide C^α-amide de formule générale (II) dans une réaction de ligation chimique native (NCL)

15

L'utilisation d'un peptide C^α-amide **14'** de formule générale (II) dans une réaction de ligation chimique native est illustrée à la figure 23.

Le peptide C^α-amide de formule générale (II) (composé **14'**), de par ses propriétés de crypto-thioester, peut être utilisé directement dans une réaction de ligation chimique native NCL, sans le convertir préalablement en peptide C^α-thioester (figure 23).

20

• Préparation du partenaire cystéinyne peptide 16

25

Le peptide **16** (H-CRCIPVGLIGYCRNPSG-OH) a été synthétisé dans des conditions standard (synthétiseur ABI 433, programme Fastmoc, agent de couplage : HCTU). La résine obtenue après élongation automatisée est traitée pendant 2h par TFA/PhOH/H₂O/i-Pr₃SiH 87,5:5:5:2,5 pour décrocher et déprotéger le peptide **16**, qui est précipité par dilution dans un mélange éther de pétrole/Et₂O 1:1, lavé (Et₂O) puis séché. Le précipité est repris dans de l'eau déminéralisée puis lyophilisé. Il est ensuite analysé par HPLC et spectrométrie de masse (figure 24).

30

Peptide **16** (figure 24) :

Formule moléculaire : C₈₁H₁₃₅N₂₅O₂₂S₃ ;

HPLC : t_R = 24,3 min (gradient : 5-50% MeCN/H₂O + 0,1% TFA en 30 min)

Détection UV (λ = 276 nm) ;

MS (MALDI-TOF) : m/z obtenue = 1906,9 ($[MH]^+$ calculée pour $C_{81}H_{136}N_{25}O_{22}S_3 = 1906,9$).

• Ligation chimique native entre les peptides **14714"** et **16**

5 2.5 μmol de peptide cryptothioester brut **14714"** et 1.5 équivalents de cystéinyle peptide brut **16** sont dissouts dans 1 mL d'une solution déoxygenée contenant 25 mM d'acide mercaptophénylacétique, 50 mM de triscarboxyéthylphosphine et 200 mM de tampon phosphate pH=7. Le mélange réactionnel est agité pendant 3h à 37°C sous une atmosphère d'argon. On obtient ainsi un peptide **17** et un composé **18** de formule
10 générale (I bis). Le peptide **17** est purifié par HPLC semi-préparative puis lyophilisé. Il est obtenu avec un rendement de 65%.

Peptide **17** (figure 25) :

Formule moléculaire : $C_{156}LL_{49}N_{45}O_{48}S_7$;

HPLC : $t_R = 14,6$ min (gradient : 30-45% MeCN/ H_2O + 0,1% TFA en 30 min) ;

15 Détection UV ($\lambda = 276$ nm) ;

MS (MALDI-TOF) : m/z obtenue = 3745,6 ($[M+H]^+$ calculée pour $C_{156}H_{250}N_{45}O_{48}S_7 = 3745,6$).

20 • Ligation chimique native entre les peptides **14714"** et **16** suivi d'un repliement oxydatif *one-pot*

2,5 μmol de peptide cryptothioester brut **14714"** et 3,75 μmol (1.5 équivalents) de cystéinyle peptide brut **16** sont dissouts dans 1 mL d'une solution déoxygenée contenant 25 mM d'acide mercaptophénylacétique, 50 mM de triscarboxyéthylphosphine et 200 mM de tampon phosphate pH=7. Le mélange
25 réactionnel est agité pendant 3h à 37°C sous une atmosphère d'argon. Le mélange réactionnel est directement engagé dans une étape de repliement oxydatif du produit de la ligation **17** (concentration finale en **17** : 13 μM) par dilution dans un mélange 1 : 1 d'isopropanol et d'un tampon contenant 0.2 mM de Tris pH 8.6, 2 mM d'EDTA, 1,82 mM de glutathion (GSH) et 0,78 mM de glutathion oxydé (GSSG), et agitation
30 de la solution résultante pendant 24 heures à 4°C. La mini-protéine à trois ponts disulfure **19** est purifiée par HPLC semi-préparative puis lyophilisée. **19** est obtenu avec un rendement de 55%.

Peptide **19** (figure 26) :

Formule moléculaire : C₁₅₆H₂₄₃N₄₅O₄₈S₇ ;

HPLC : t_R = 28,4 min (gradient : 30-45% MeCN/H₂O + 0,1% TFA en 30 min) ;

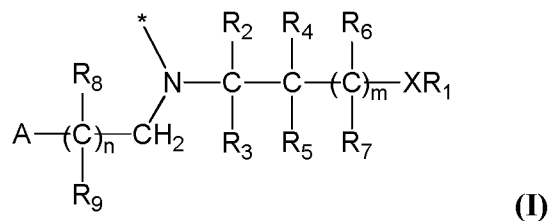
Détection UV (λ = 276 nm) ;

MS (MALDI-TOF) : m/z obtenue = 3739,5 ([MH]⁺ calculée pour

5 C_{i₅₆}H₂₄₄N₄₅O₄₈S₇ = 3739,5).

REVENDICATIONS

1. Peptide C^α-amide précurseur d'un peptide C^α-thioester caractérisé en ce qu'il comprend le radical de formule générale (I) :



dans laquelle

X représente un atome de soufre ou de sélénium,

R_i représente un atome d'hydrogène ou un groupe protecteur du soufre ou du sélénium compatible avec des conditions d'élongation par Fmoc SPPS,

m représente un entier égal à 0 ou 1,

un des R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ ou R₇ représente le radical -B-C-D dans lequel :

D représente un atome d'hydrogène ou un support solide convenant pour la synthèse de peptides en phase solide (SPPS),

C est absent ou représente un bras utilisable pour la SPPS,

B représente un radical divalent comportant un hétéroatome,

les autres desdits R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ ou R₇ qui ne représentent pas -B-C-D représentent alors indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un radical alkyle ayant de 1 à 5 atomes de carbone, et de préférence un radical méthyle (-CH₃) ou un radical phényle (-C₆H₅), à la condition qu'au plus deux desdits radicaux R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ ou R₇ représentent en même temps un phényle,

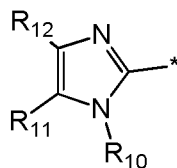
R₈ et R₉ représentent indépendamment l'un de l'autre un radical alkyle ayant de 1 à 10 atomes de carbone, et de préférence un radical méthyle ou un atome d'hydrogène,

n représente un entier allant de 0 à 4, de préférence de 0 à 1,

A représentant un radical aryle ou hétéroaryle choisi dans le groupe comprenant

- le radical de formule :

47

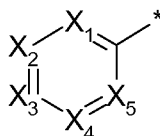


dans laquelle

Rio représente un radical alkyle ayant de 1 à 10 atomes de carbone, et de préférence un méthyle,

R₁₁ et R₁₂ représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un atome d'halogène choisi dans le groupe comprenant Cl, Br, I ou F, un radical -CN, un radical -NO₂, un radical -CF₃, un radical phényle (-C₆H₅), un radical -CONH₂, un radical Rio, un radical -OR₁₀, un radical -SR₁₀, un radical -N(R₁₀)₂, un radical -COOR₁₀, un radical -CONHR₁₀ ou un radical -CON(Rio)₂, Rio étant tel que défini précédemment,

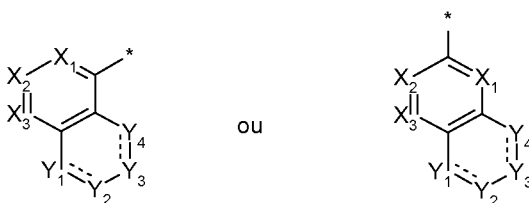
• le radical de formule :



dans laquelle

au moins un des X₁, X₂, X₃, X₄ et X₅ représente un atome d'azote (N), un radical C-OH ou un radical C-SH, les autres desdits X₁, X₂, X₃, X₄ ou X₅ qui ne représentent pas N, C-OH ou C-SH représentent alors indépendamment l'un de l'autre un radical C-R_n avec R₁₁ tel que défini précédemment,

• le radical de formule :



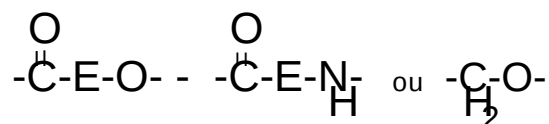
dans laquelle

au moins un des X₁, X₂, X₃ et Y₄ représente un atome d'azote (N), un radical C-OH ou un radical C-SH, les autres desdits X₁, X₂ ou X₃ qui ne représentent pas N, C-OH ou C-SH représentent alors indépendamment l'un de l'autre un radical C-R_{i1} avec R_{i1} tel que défini précédemment,

Y₁, Y₂, Y₃ et Y₄ (à condition que Y₄ ne représente pas C-OH ou C-SH) représentent indépendamment l'un de l'autre, selon qu'ils soient liés par une

liaison simple ou double, un atome d'azote (N) ou un groupe NRio avec Rio tel que défini précédemment, un groupe CH ou CH₂, un groupe C-Rn ou CHRn ou CR₁₁Ri₂ avec R₁₁ et Ri₂ tels que définis précédemment, un carbonyle (C=O), un atome d'oxygène (O), un atome de soufre (S), avec la condition qu'au plus deux desdits Yi, Y₂, Y₃ et Y₄ représentent en même temps un atome d'oxygène ou un atome de soufre, l'un desdits Yi, Y₂, Y₃ ou Y₄ pouvant être absent, de sorte à former un cycle à 5 chaînons.

2. Peptide C^α-amide selon la revendication 1, caractérisé en ce que dans le radical (I), le radical divalent B représente :



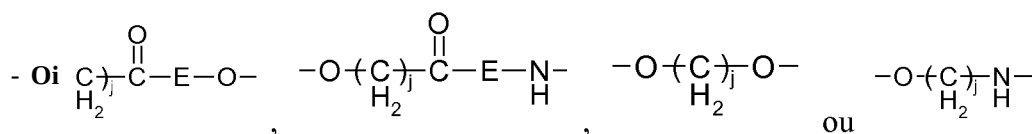
dans lequel

E est absent ou représente le groupe -(Xaa)_i- dans lequel :

i représente un entier allant de 1 à 20, et de préférence de 1 à 5,

chaque Xaa représente indépendamment les uns des autres un résidu d'acide aminé, et lorsque i est supérieur ou égal à 2, chacun desdits Xaa est relié à son voisin Xaa par une liaison peptidique,

ou, dans le cas où m = 1, et R₄ ou R₅ = -B-C-D, alors le radical divalent B représente de préférence :



dans lequel :

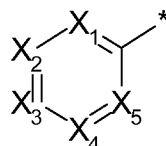
j représente un entier allant de 0 à 10, de préférence de 0 à 3 et E est tel que défini précédemment.

3. Peptide C^α-amide selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que dans le radical (I), C représente un bras utilisable pour la SPPS en stratégie Fmoc.

4. Peptide C^α-amide selon la revendication 3, caractérisé en ce que C représente un bras acido-labile choisi dans le groupe comprenant un bras de Rink (4-[(2,4-diméthoxyphényl)méthyl]phénoxyacétyle), un bras de type Wang (4-alkoxybenzyle), un bras de Sieber (xanthén-3-yloxyalkyle), un bras PAL (4-2,5-diméthoxy-alkoxybenzyle), un bras 2-chlorotrityle, un bras PAM (phénylacetamidométhyle), un bras SASRIN (2-méthoxy-4-alkoxybenzyle) ou un bras MBHA (4-méthyl)benzhydryle.

5. Peptide C^α-amide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que dans le radical (I), D représente un support solide convenant pour la SPPS en stratégie Fmoc et de préférence est choisi dans le groupe comprenant une résine commercialisée sous la dénomination PEGA®, une résine commercialisée sous la dénomination CHEMMATRIX™, une résine de type polyacrylamide, une résine de type polystyrène ou une résine mixte polystyrène/polyéthylèneglycol (PEG).

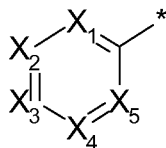
6. Peptide C^α-amide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que dans le radical (I), n est un entier égal à 0, et le radical A présente la formule :



dans laquelle X_i représente C-OH, et chacun des X₂, X₃, X₄ et X₅ est tel que défini à la revendication 1.

7. Peptide C^α-amide selon la revendication 6, caractérisé en ce que dans le radical A, chacun des X₂, X₃ ou X₅ représente CH et X₄ représente C-R_n avec R₁₁ tel que défini à la revendication 1, et de préférence X₄ représente CH, C-OMe ou C-NO₂.

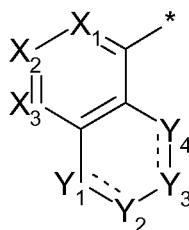
8. Peptide C^α-amide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que dans le radical (I), n est un entier égal à 0, et le radical A présente la formule :



dans laquelle X_i représente l'atome d'azote (N) et chacun desdits X_2 , X_3 , X_4 et X_5 est tel que défini à la revendication 1.

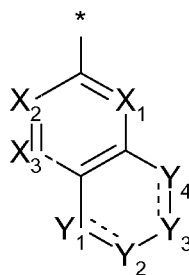
9. Peptide C^α -amide selon la revendication 8, caractérisé en ce que dans le radical A, chacun des X_2 , X_3 ou X_5 représente CH et X_4 représente CH ou C-R_n avec R_n représentant OCH₃ ou N(CH₃)₂.

10. Peptide C^α -amide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que dans le radical (I), n est un entier égal à 0, et le radical A présente la formule :



dans laquelle X_i ou Y_4 représente C-OH ou N, l'autre desdits X_i ou Y_4 qui ne représente pas C-OH ou N, ainsi que chacun desdits X_2 , X_3 , Y_1 , Y_2 , et Y_3 sont tels que définis précédemment.

11. Peptide C^α -amide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que dans le radical (I), n est un entier égal à 0, et le radical A présente la formule :



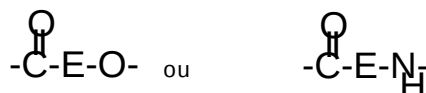
dans laquelle X_i ou X_2 représente C-OH ou N, l'autre desdits X_i ou X_2 qui ne représente pas C-OH ou N, ainsi que chacun desdits X_3 , Y_1 , Y_2 , Y_3 et Y_4 sont tels que définis à la revendication 1.

12. Peptide C^α-amide selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que dans le radical (I) :

m représente 0 ou 1,

chacun desdits R₃, R₄, R₅, R₆ ou R₇ représente H,

R₂ représente -B-C-D dans lequel B représente :

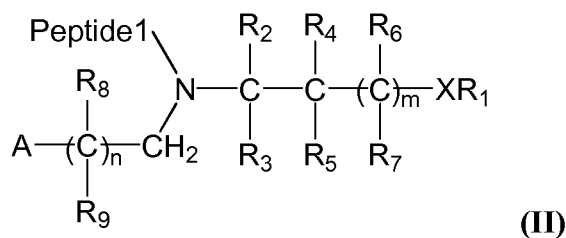


et C, D et E sont tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 4.

13. Peptide C^α-amide selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que dans le radical (I), m est égal à 0 et X représente un atome de soufre (S).

14. Peptide C^α-amide selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que dans le radical (I), R_i est un groupe protecteur du soufre choisi dans le groupe comprenant trityle (Trt), méthyltrityle (Mtt), méthoxytrityle (Mmt), xanthényle (Xan), tri-méthoxybenzyle (Tmob), acétamidométhyle (Acm), triméthylacétamidométhyle (Tacm), benzamidométhyle (Bam), allyloxycarbonylaminométhyle (Allocam), phthalimidométhyle (Pim), 2-(triméthylsilyl)éthyle, t-butyle (tBu), 2,4,6-triméthylbenzyle, quinolinylméthyle (Qm), diphényl-4-pyridylméthyle, 1-adamantyle, benzyloxyméthyle (BOM), 2-tétrahydropyranyle (Thp), benzylthiométhyle, éthylsulfényle (SEt), t-butylsulfényle (StBu), phénylsulfényle (SPh) et 2,4-dinitrophényle.

15. Peptide C^α-amide selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que ledit peptide présente la formule générale (II) :



dans laquelle :

Peptide 1 représente le groupement $Ri_8-(Xaa)_k-$ dans lequel :

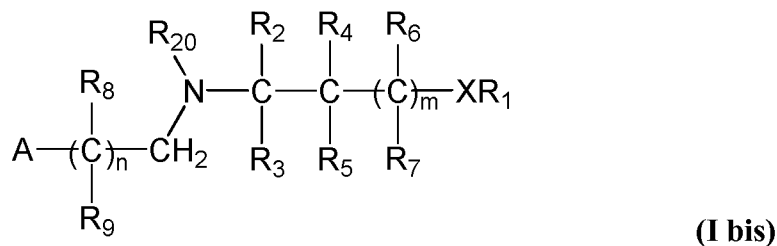
k est un entier allant de 1 à 100, de préférence de 4 à 60, et plus préférentiellement encore de 8 à 40,

Xaa représente indépendamment les uns des autres un résidu d'acide aminé provenant d'un acide aminé de formule $H-Xaa-OH$, et lorsque k est supérieur ou égal à 2, chacun desdits Xaa est relié à son voisin Xaa par une liaison peptidique,

Ri₈ est un atome d'hydrogène ou un substituant de l'extrémité N-terminale comprise dans le résidu Xaa,

X, m, n, A et Ri à R₉ étant tels que définis à la revendication 1.

16. Composé caractérisé en ce qu'il présente la formule générale (I bis) :

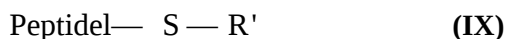


dans laquelle :

X, Ri, m, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, n, R₈, R₉ et A sont tels que définis à la revendication 1 et R₂₀ représente un hydrogène ou R₁₄.

17. Procédé de préparation d'un peptide C^α-amide de formule (II) tel que défini à la revendication 15 par Fmoc SPPS, caractérisé en ce qu'il comporte une étape d'élongation du composé (I bis) tel que défini à la revendication 16, ladite étape d'élongation permettant d'ajouter Peptidel tel que défini à la revendication 15.

18. Procédé de préparation d'un peptide C^α-thioester de formule générale (IX) :

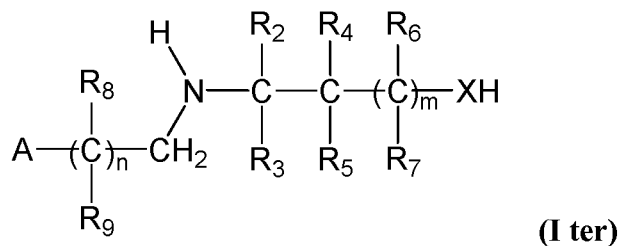


dans laquelle :

R'- représente un radical provenant d'un thiol de formule R'-SH, et Peptide 1 est tel que défini à la revendication 15,

caractérisé en ce qu'il comprend une réaction de thio-estérification entre le peptide C^α-amide de formule (II) tel que défini à la revendication 15 dans laquelle Ri est égal à H, et, un thiol de formule R'-SH,

afin d'obtenir le peptide C^α-thioester de formule (IX) tel que défini ci-dessus et, le composé de formule (I ter) :



dans laquelle X, m, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, n, R₈, R₉ et A sont tels que définis à la revendication 1.

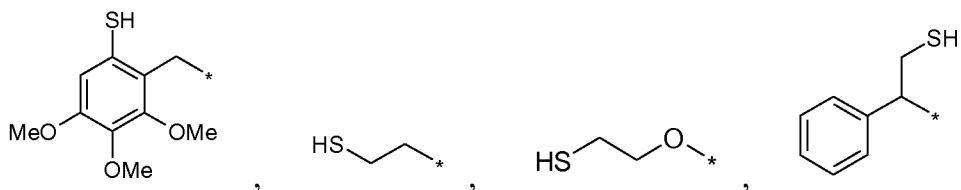
19. Procédé de préparation d'un peptide de formule générale (X) :

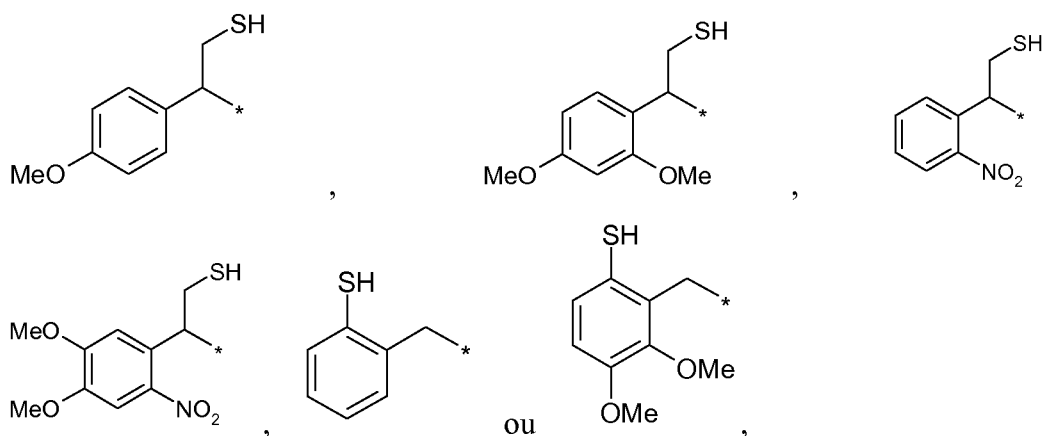


dans laquelle :

Peptide 1 est tel que défini à la revendication 15,

Yaa est un résidu d'acide aminé provenant d'un acide aminé de formule H-Yaa-OH choisi dans le groupe comprenant une cystéine, une homocystéine, une β-mercapto-valine, une β-mercapto-leucine, une β-mercapto-isoleucine, une β-mercapto-phénylalanine, une β-mercapto-lysine, une β-mercapto-proline, une γ-mercapto-valine, une γ-mercapto-isoleucine, une γ-mercapto-leucine, une γ-mercapto-lysine, une γ-mercapto-proline, ou un acide aminé substitué sur son atome d'azote N^o par un groupement contenant une fonction β- ou γ-amino thiol ledit groupement étant choisi dans le groupe comprenant:





Peptide2= (Xaa)_i, avec 1= un entier allant de 1 à 60, de préférence de 4 à 40,

Xaa représente indépendamment les uns des autres un résidu d'acide aminé provenant d'un acide aminé de formule H-Xaa-OH, et lorsque 1 est supérieur ou égal à 2, chacun desdits Xaa étant relié à son voisin Xaa par une liaison peptidique,

Ris représente -OH, -NH₂ ou un radical de formule générale (I) dans laquelle X représente un atome de soufre et Ri est un groupe protecteur du soufre qui est stable à un traitement au TFA et stable dans des conditions de NCL,

caractérisé en ce que l'on fait réagir par une réaction de NCL :

un peptide C^α-amide de formule générale (II) tel que défini ci-dessus, dans laquelle RI = H ou un groupement labile dans des conditions de ligation chimique native NCL,

avec un peptide possédant un résidu β- ou γ-amino thiol N terminal de formule générale (XI) :



dans laquelle Yaa, Ri₅ et Peptide2 sont tels que définis ci-dessus, afin d'obtenir

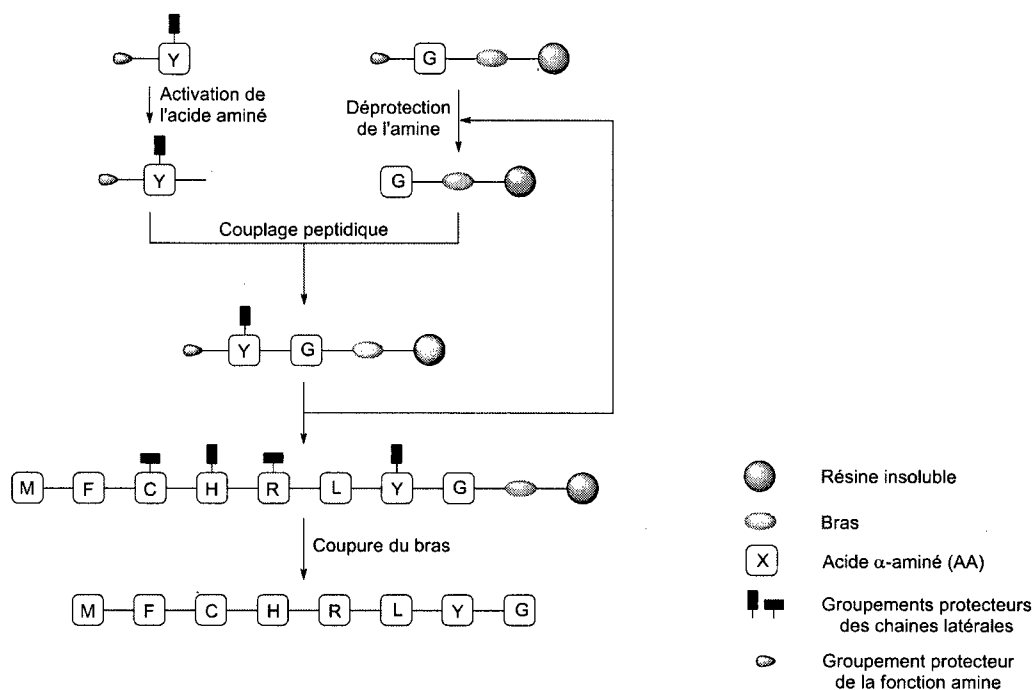
- le peptide de formule générale (X) tel que défini ci-dessus et
- le composé de formule (I bis) tel que défini à la revendication 16.

20. Utilisation d'un peptide C^α-amide tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 15, pour préparer un peptide C^α-thioester.

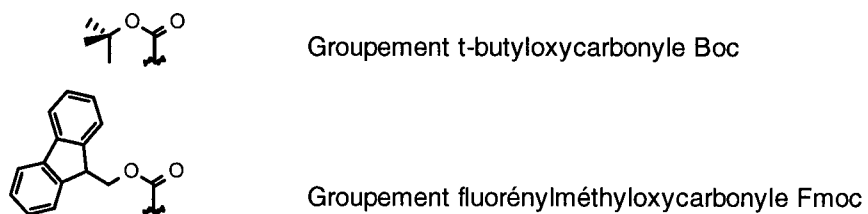
21. Utilisation d'un peptide C^α-amide tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 15, dans une réaction de ligation native NCL (« Native Chemical Ligation ») pour préparer un peptide ou une protéine, en particulier d'intérêt thérapeutique.

Figure 1 :

Détail des étapes de la Synthèse Peptidique sur Phase Solide (SPPS) illustré par la synthèse d'un peptide de séquence MFCHRLYG (séquence aléatoire)

**Figure 2 :**

Groupements protecteurs de la fonction amine Boc et Fmoc

**Figure 3 :**

Ligation chimique native (« NCL »)

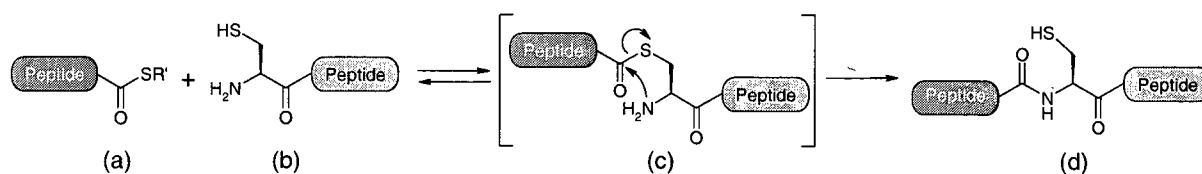


Figure 4 :

Utilisation de peptides C^α -*N*-alkyl-*N*-(β -mercaptoalkyl)-amides (e) ou de peptides C^α -*N*-aryl-*N*-(β -mercaptoalkyl)-amides (e) pour :

- la synthèse de peptides C^α -thioesters (a) (par transfert d'acyle de N vers S) (Fig. 4-1 et 4-2),
- l'utilisation directe en NCL (Fig. 4-3).

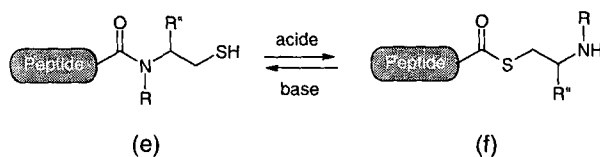
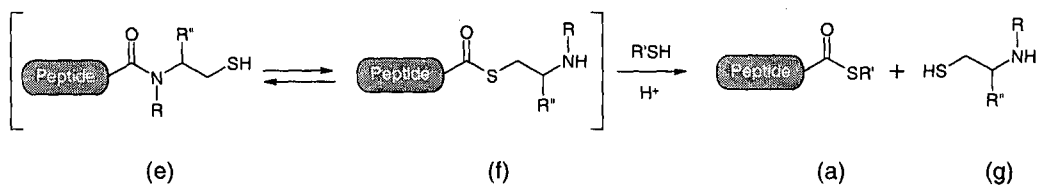
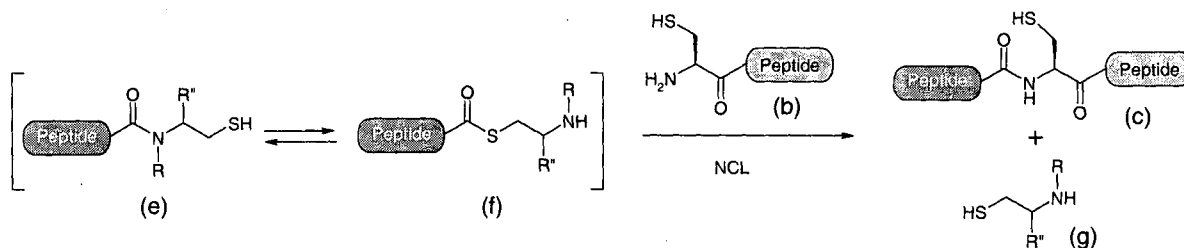
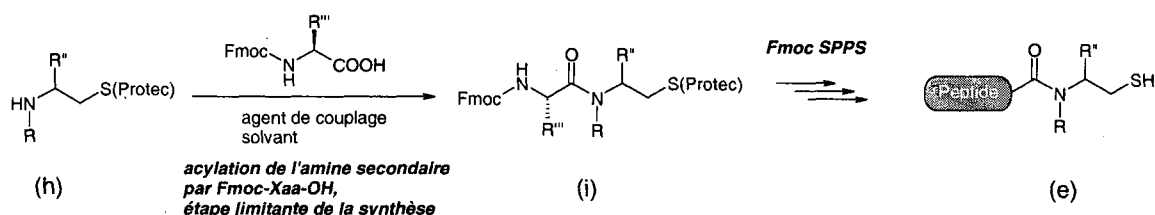
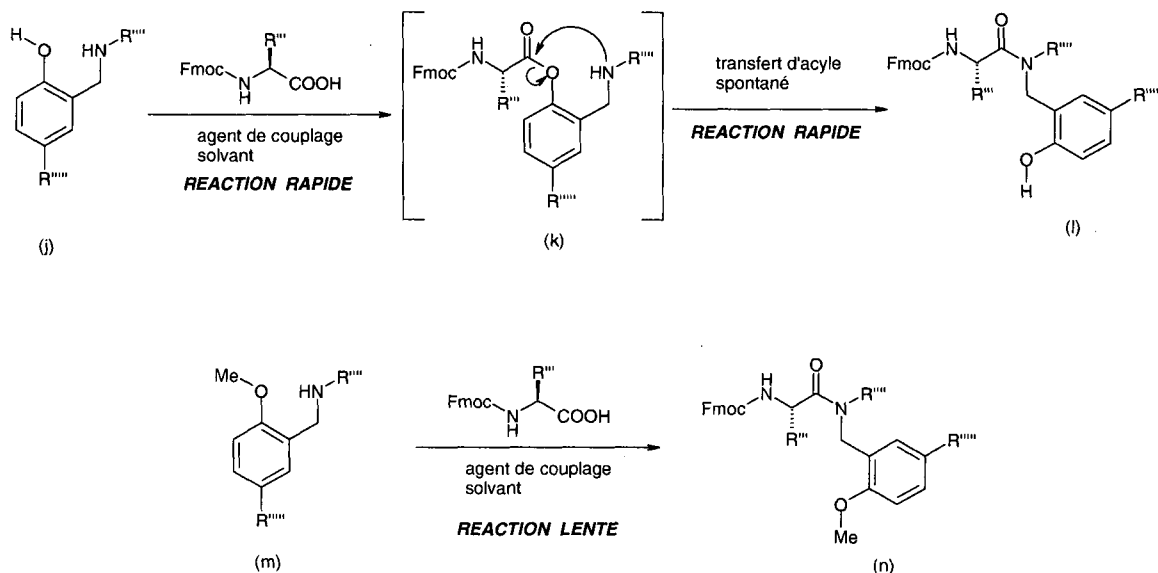
Fig. 4-1 : détail du transfert d'acyle N/S**Fig. 4-2** : réaction de trans-thioestérification en milieu acide**Fig. 4-3** : utilisation directe en NCL

Figure 5 :**Fig. 5-1 :**

Schéma de principe de synthèse de peptides β -mercapto- C^α -amides de type (e), détaillant l'étape difficile de *N*-acylation de l'amine secondaire.

**Fig. 5-2 :**

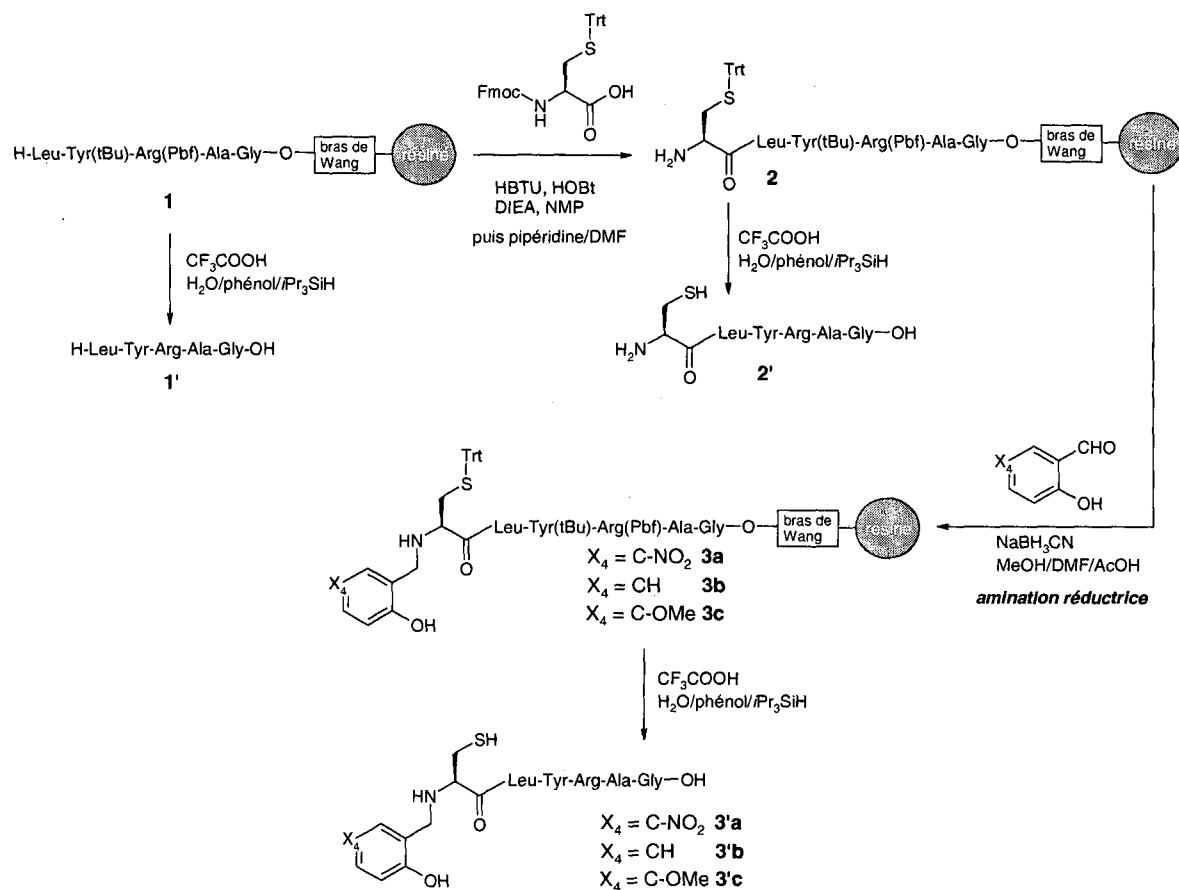
Comparaison entre l'acylation d'une amine secondaire portant un groupement 2-hydroxybenzyle (j) et celle d'une amine secondaire portant un groupement 2-méthoxybenzyle (m).



4/20

Figure 6 :

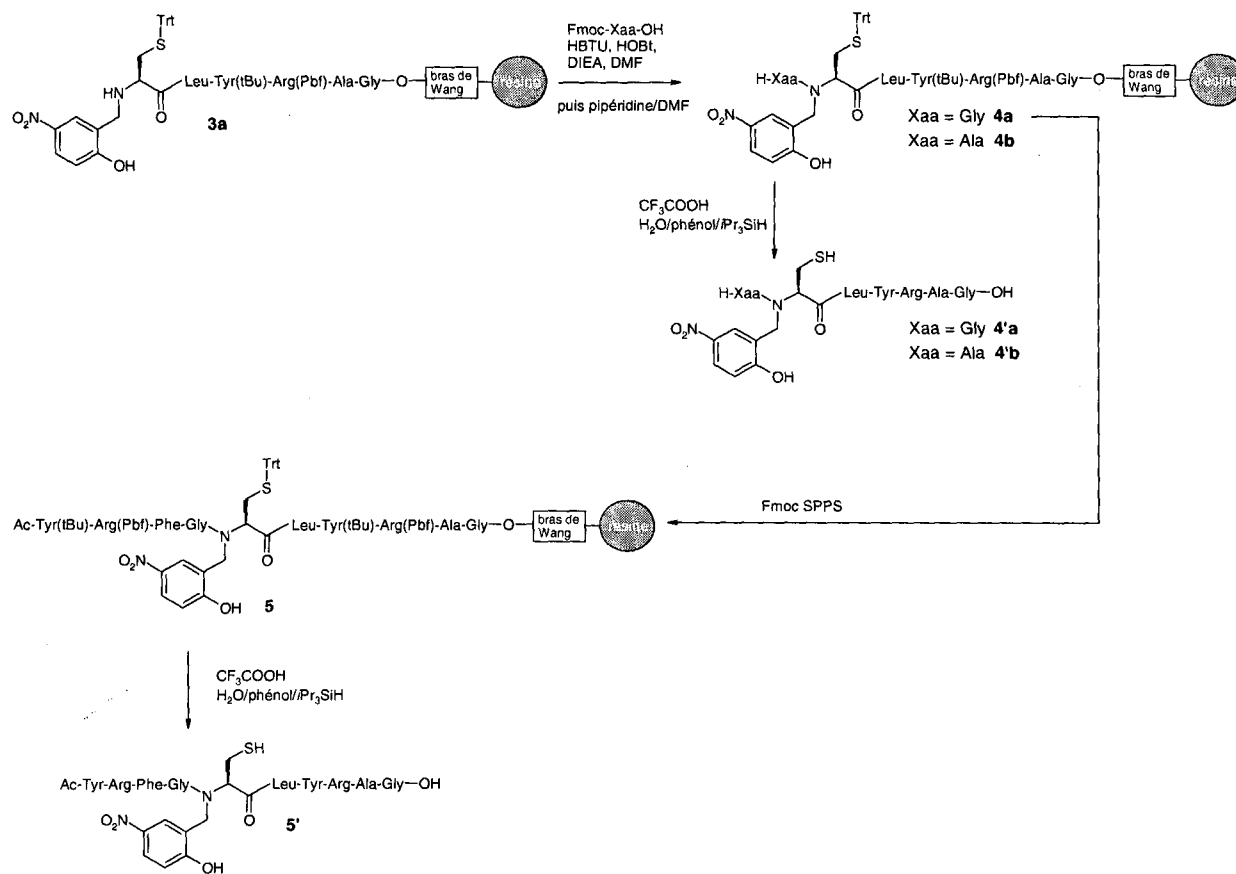
Préparation de six composés répondant à la formule générale (I bis) (à savoir les composés 3a, 3b, 3c, 3'a, 3'b et 3'c)



5/20

Figure 7 :

Préparation d'un peptide C^α-amide de formule générale (II) (composés 5 et 5') à partir d'un composé de formule générale (I bis) (composé 3a).



6/20

Figure 8 :

Chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du peptide 2'

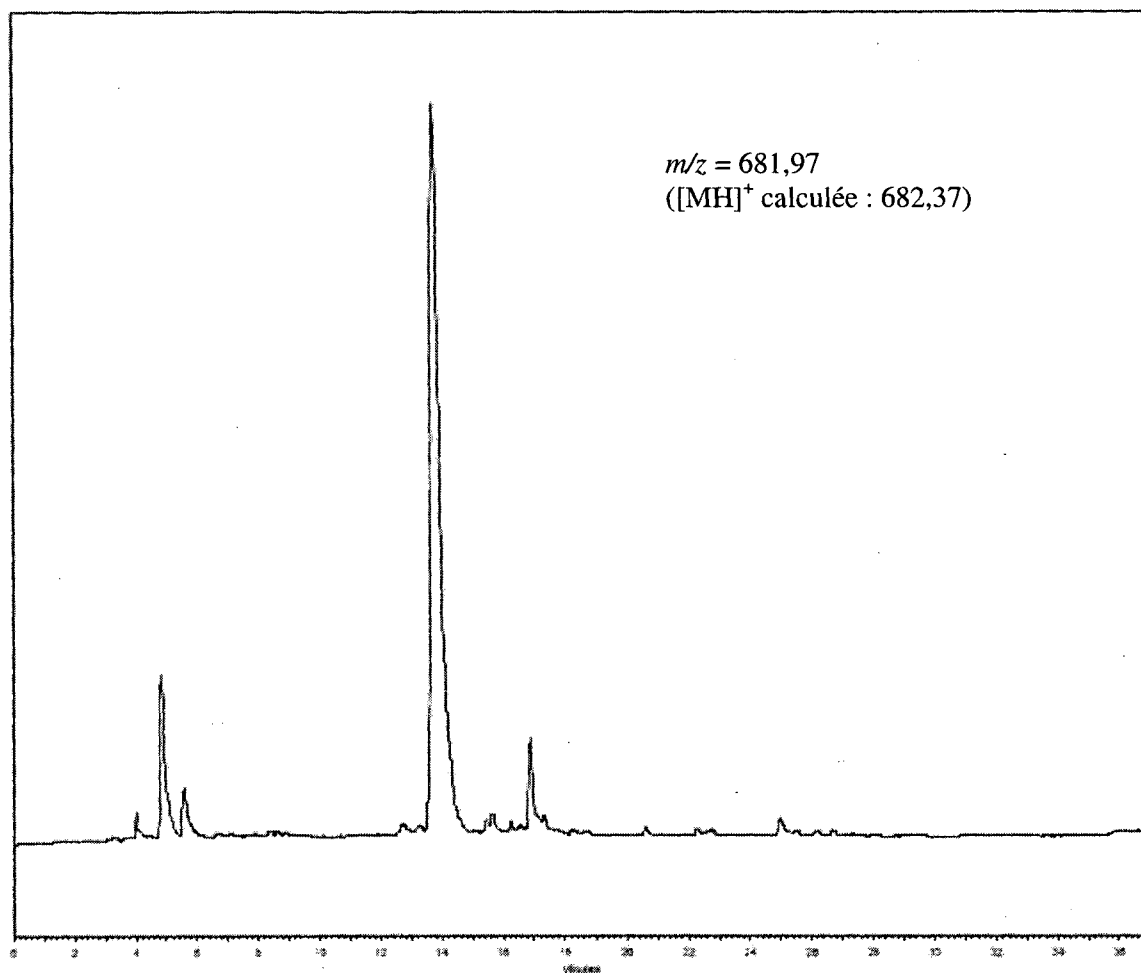


Figure 9 :

Chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du peptide 3'a

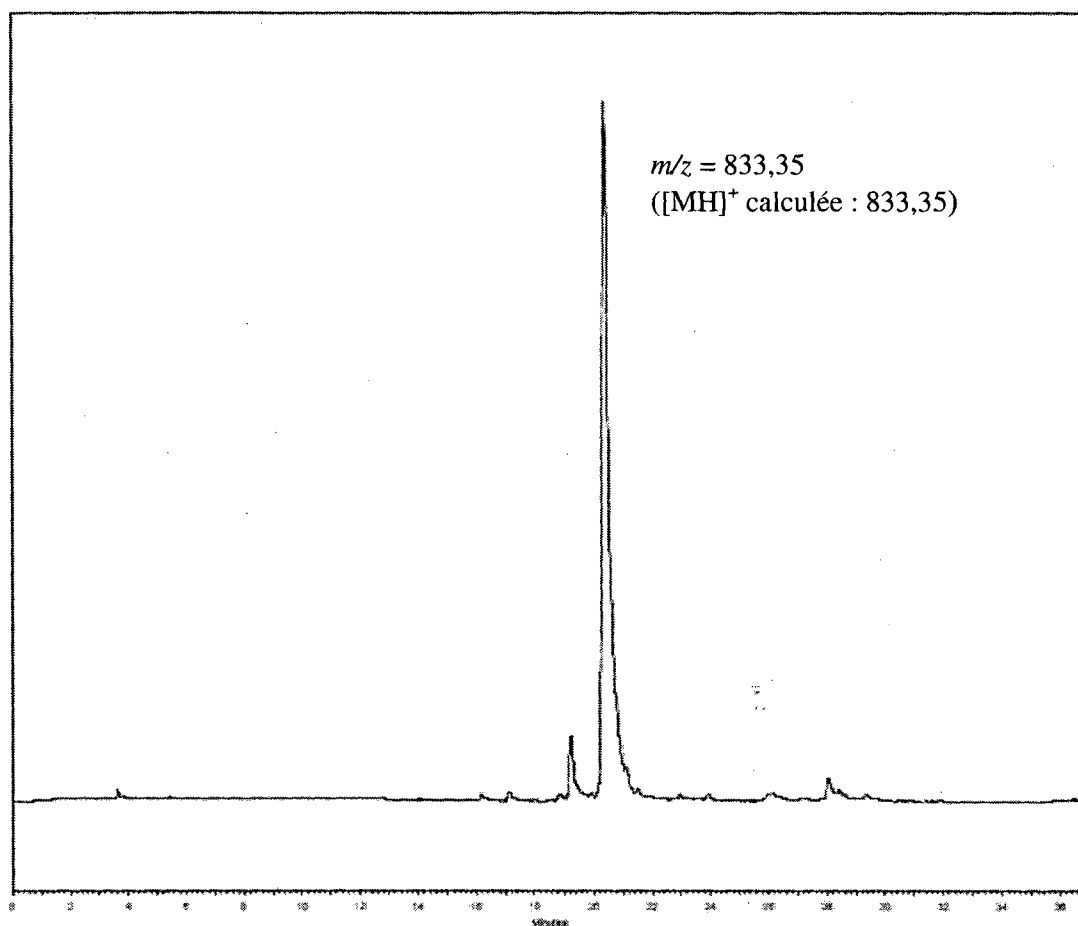
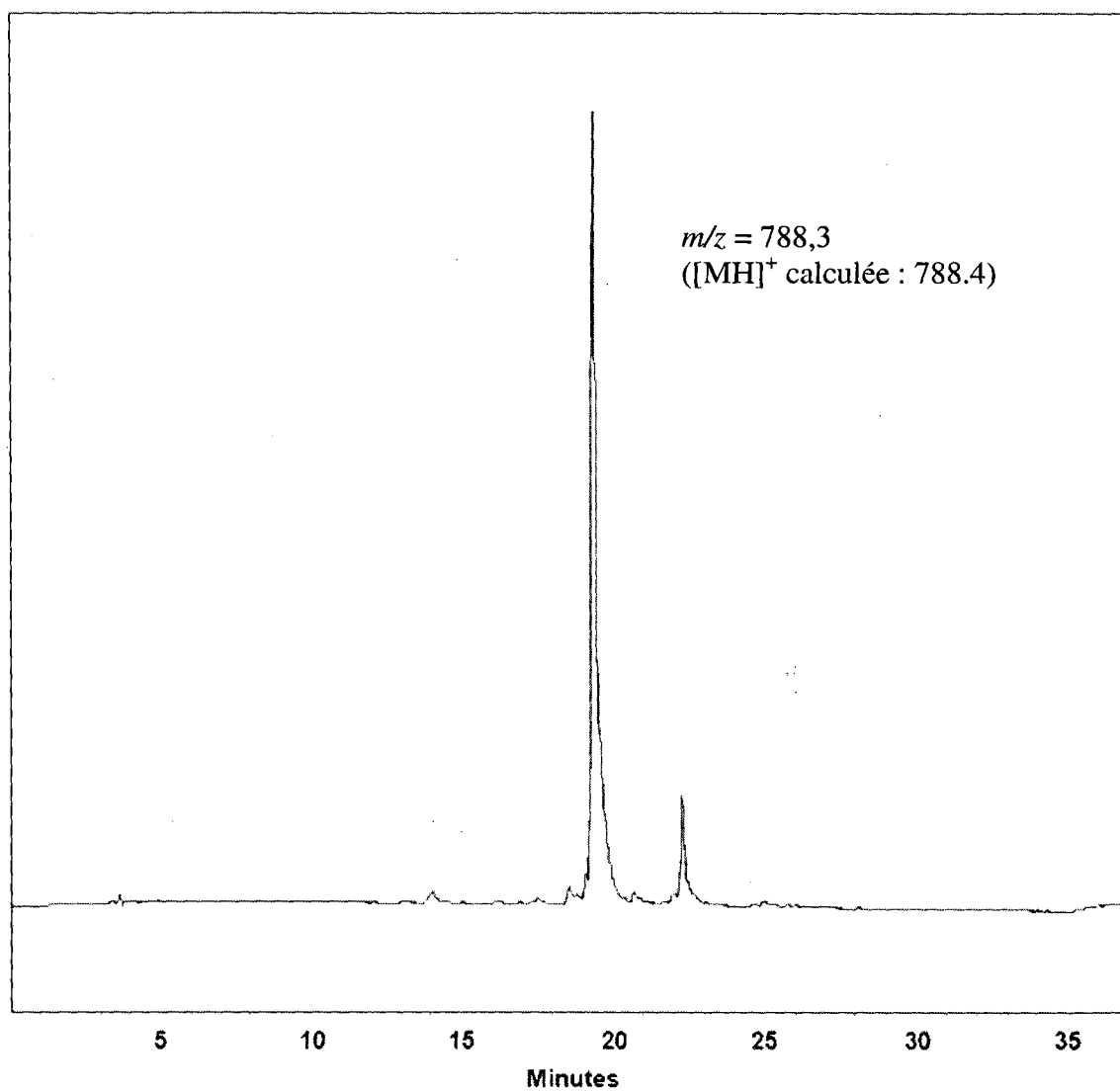


Figure 10 :

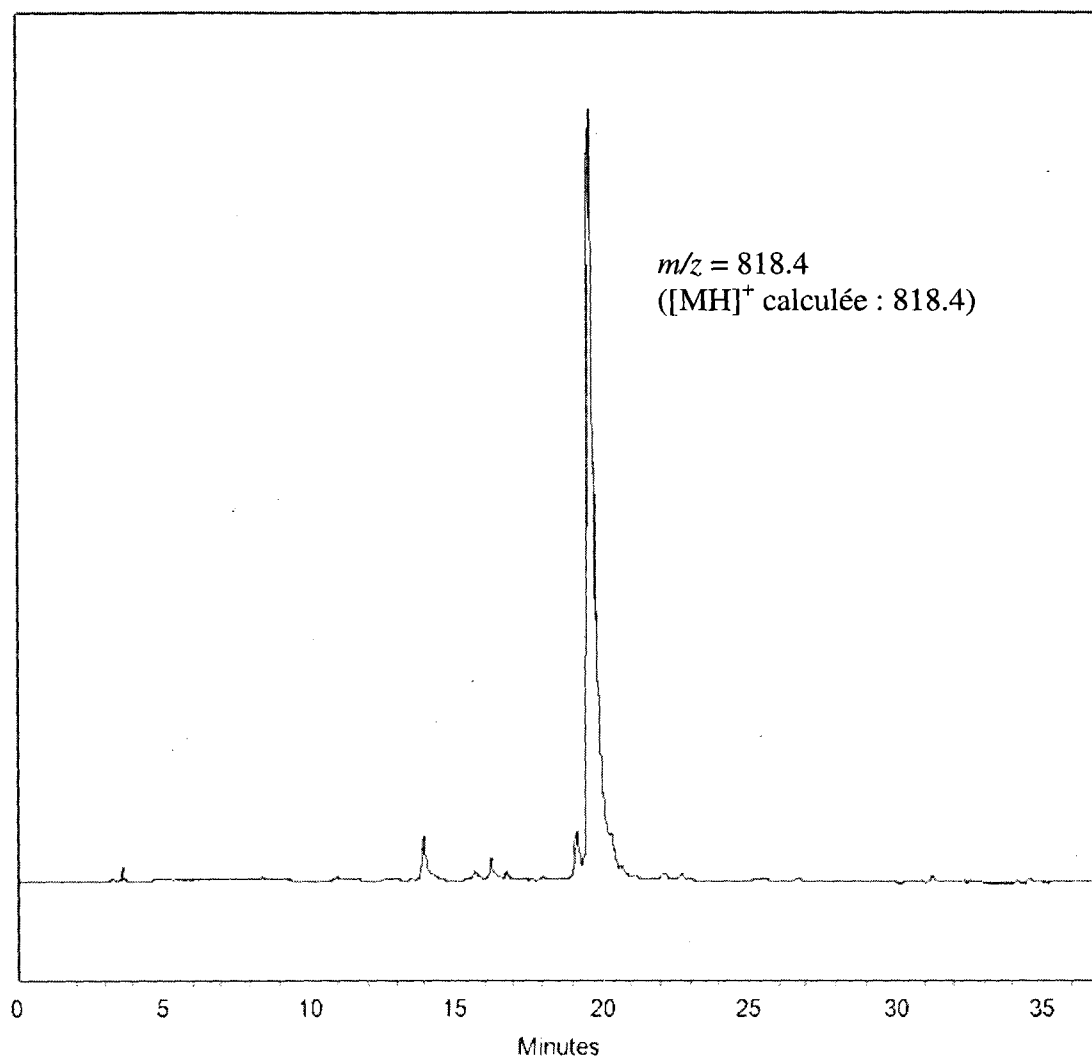
Chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du peptide **3'b**



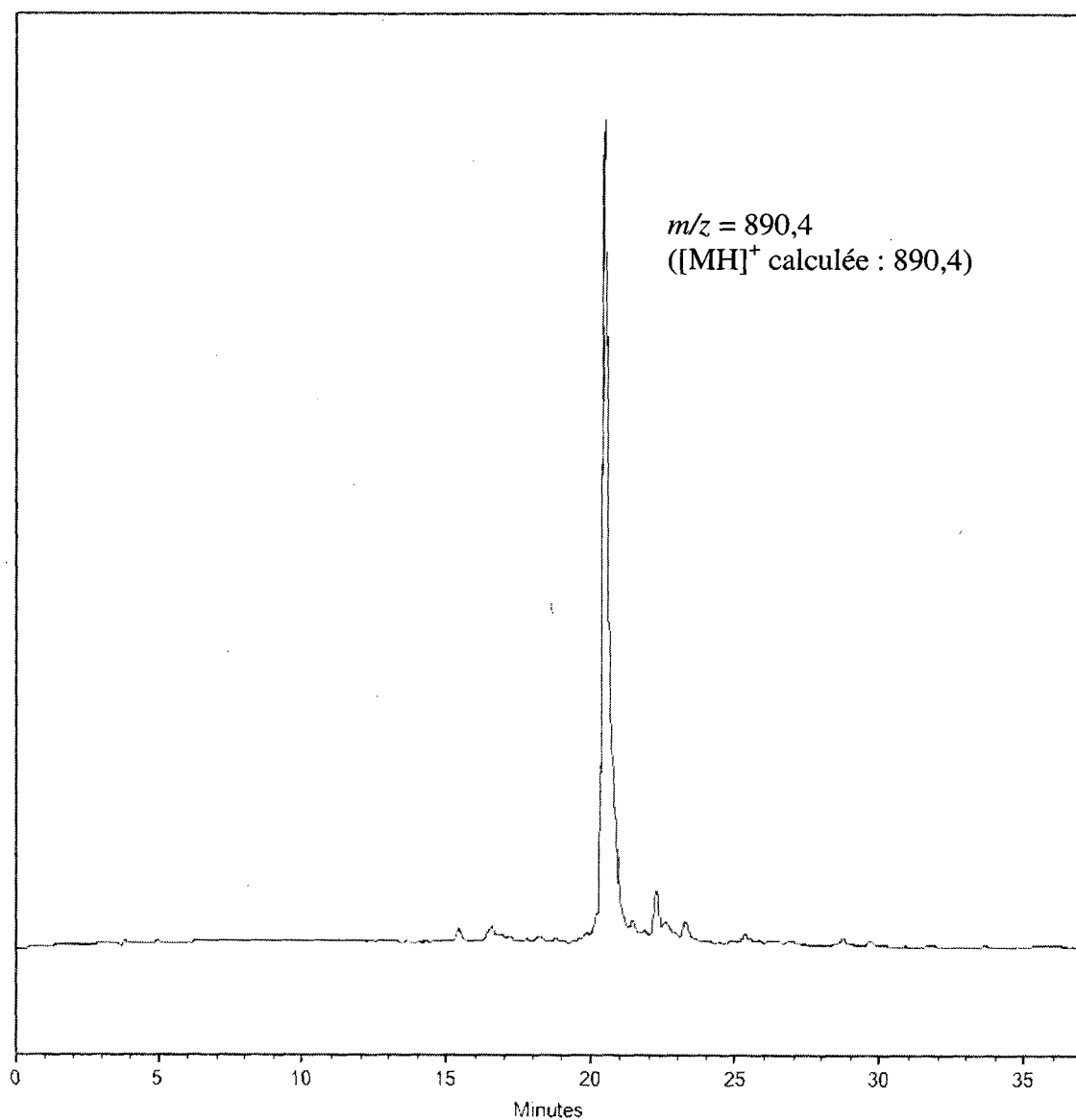
9/20

Figure 11 :

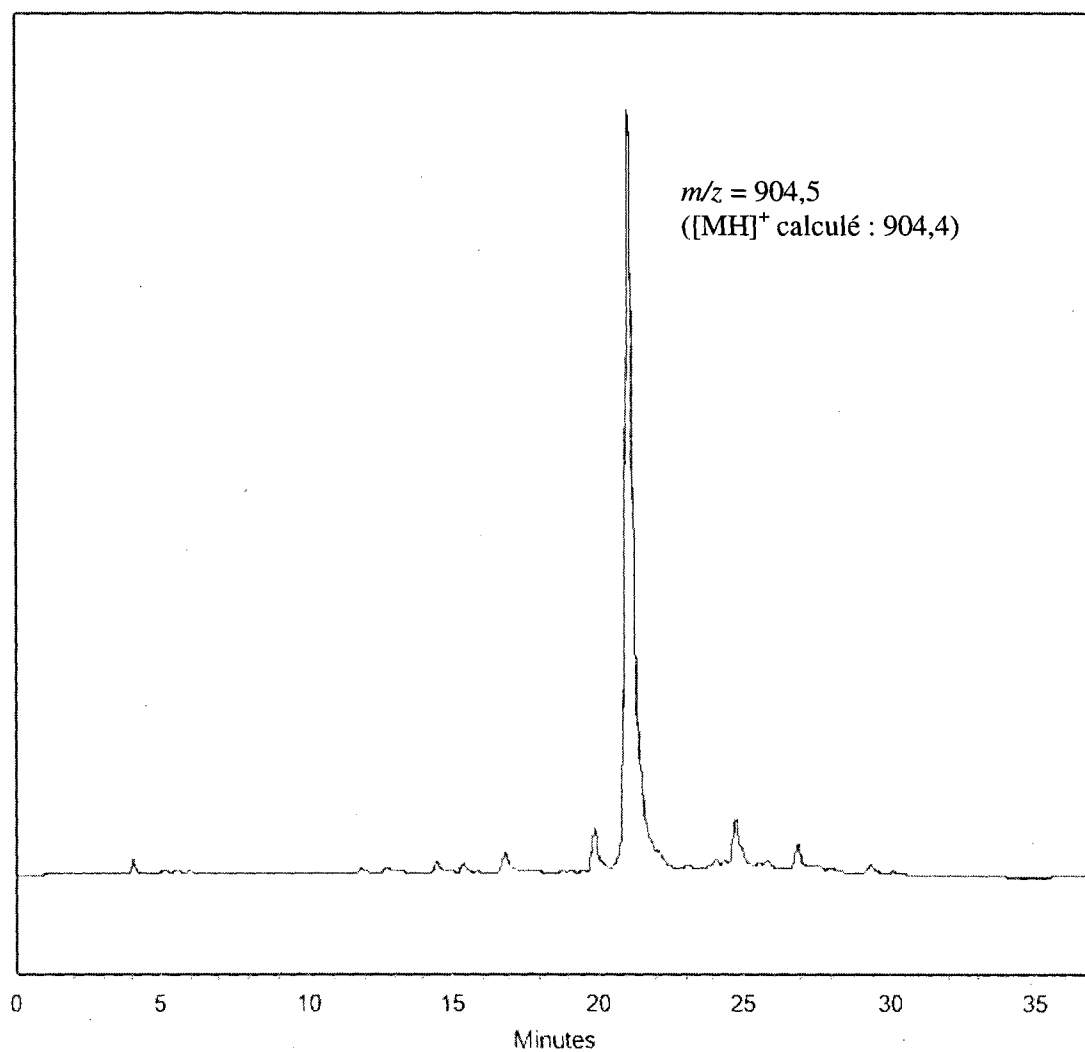
Chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du peptide 3'e



10/20

Figure 12 :Chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du peptide **4'a**

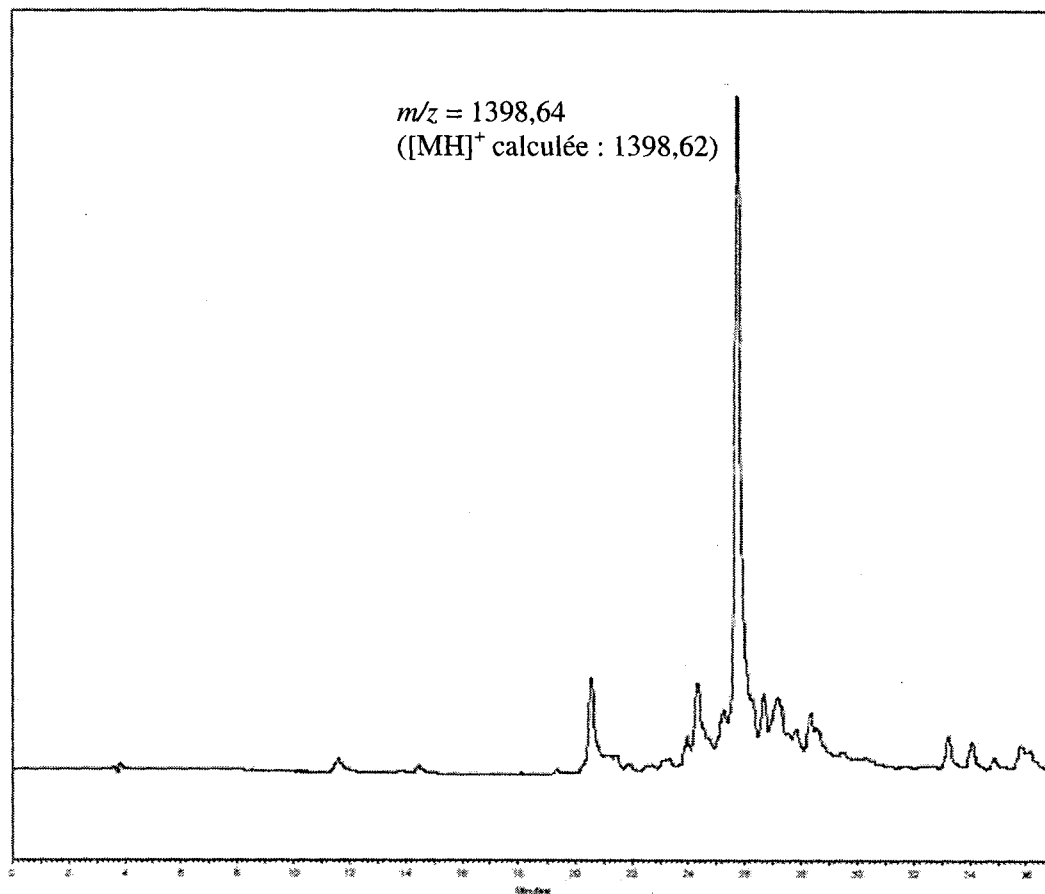
11/20

Figure 13 :Chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du peptide **4'b**

12/20

Figure 14:

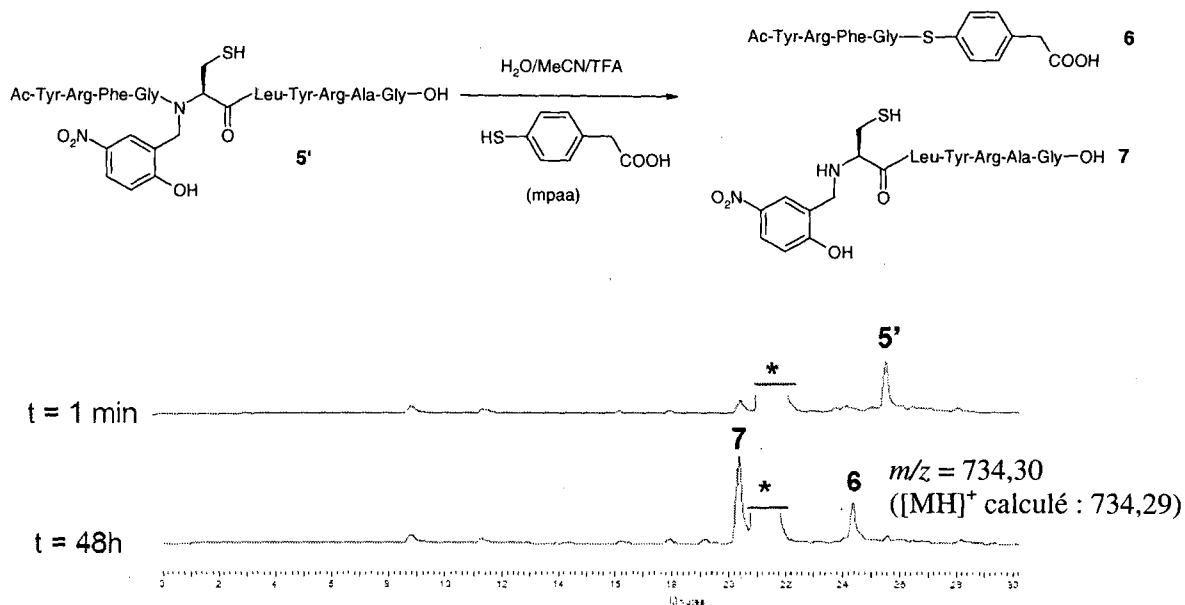
Chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du peptide 5'



13/20

Figure 15 :

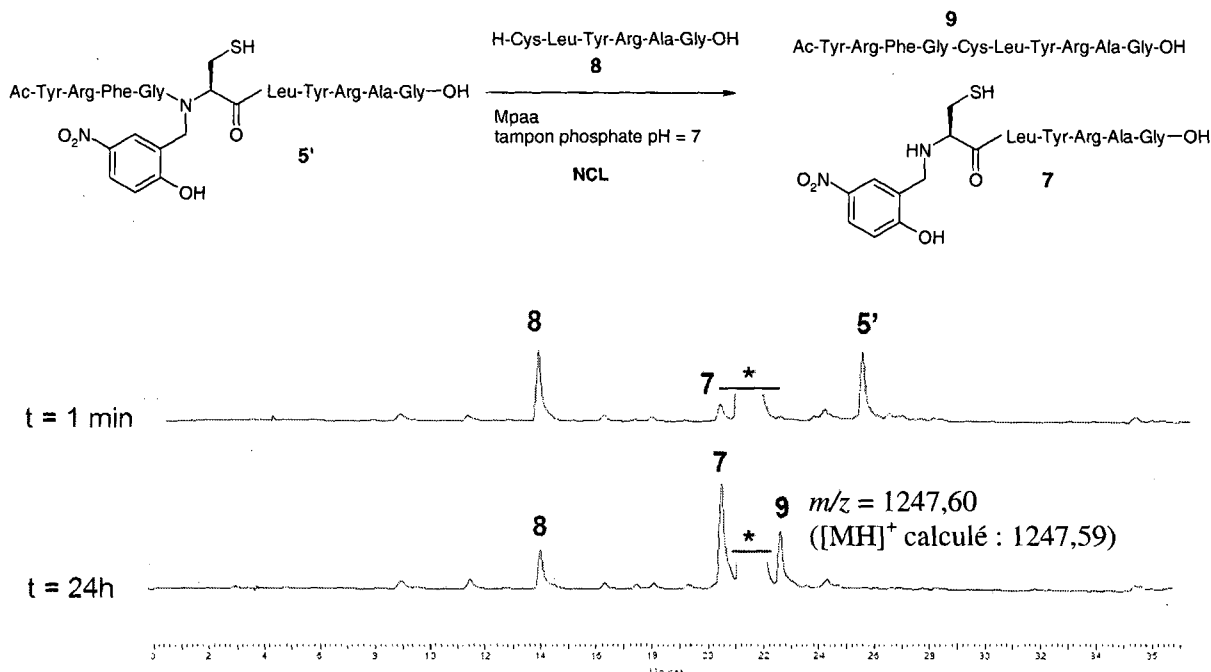
Utilisation du peptide **5'** dans une réaction de thioestérification en milieu acide afin d'obtenir le peptide **6**.



14/20

Figure 16 :

Utilisation du peptide **5'** dans une réaction de ligation native chimique NCL afin d'obtenir un peptide **9**.

**Figure 17**

Préparation de trois composés répondant à la formule générale (I bis) (à savoir les composés **12**, **13** et **13'**)

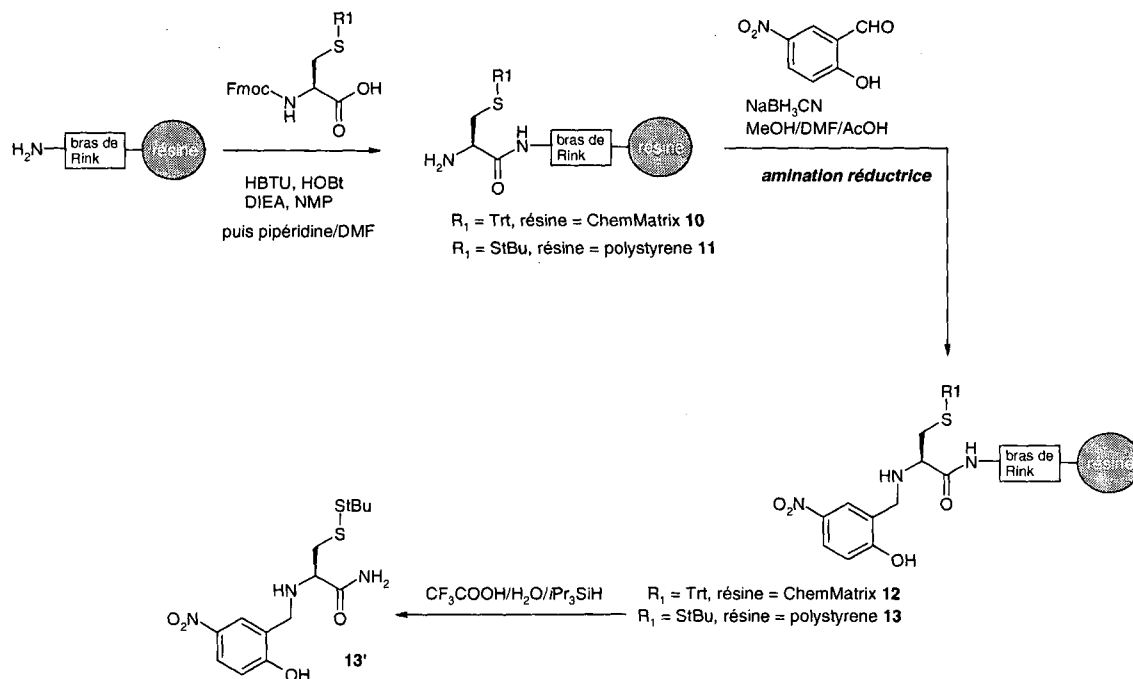
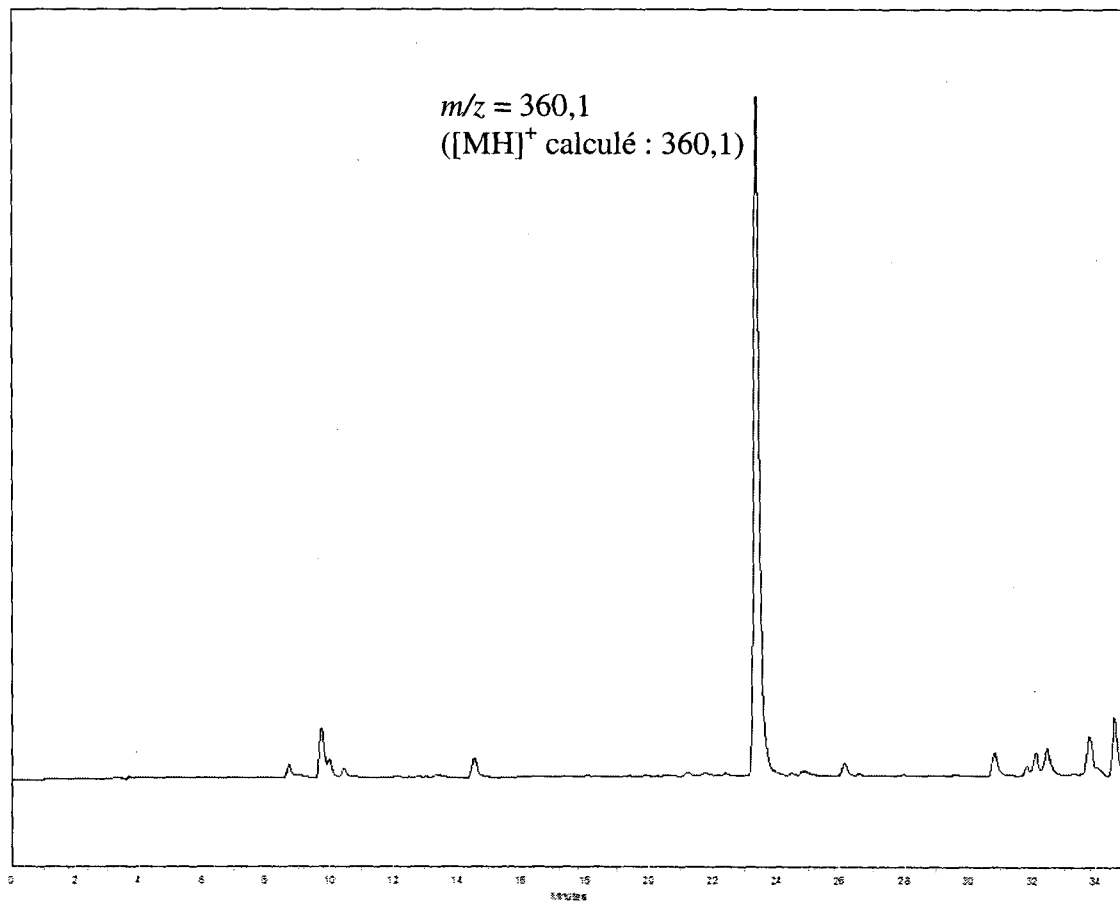


Figure 18

Chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du composé **13'**



16/20

Figure 19 :

Préparation d'un peptide C^α-amide de formule générale (II) (composés **14** et **14'**) à partir d'un composé de formule générale (I bis) (composé **12**).

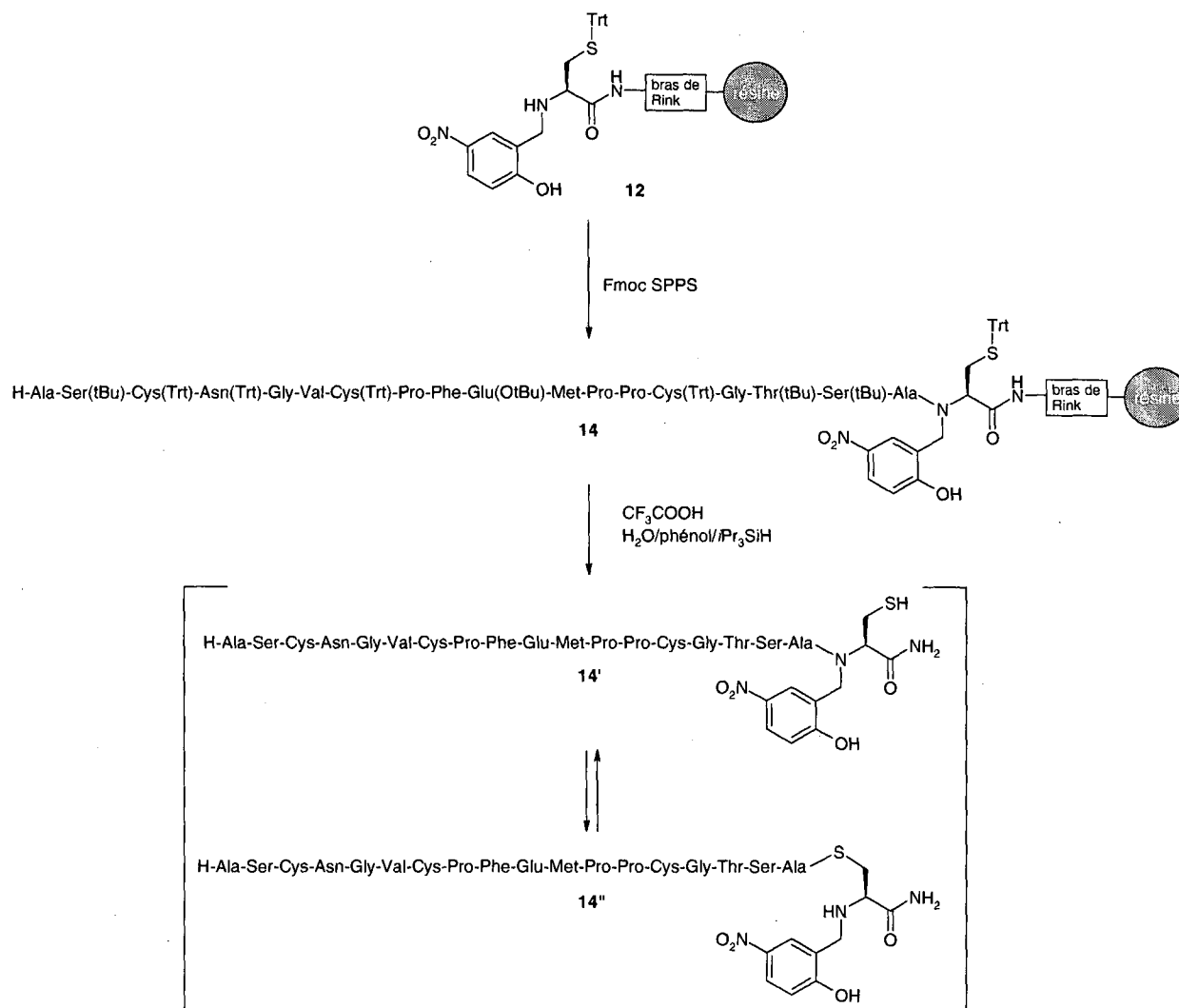
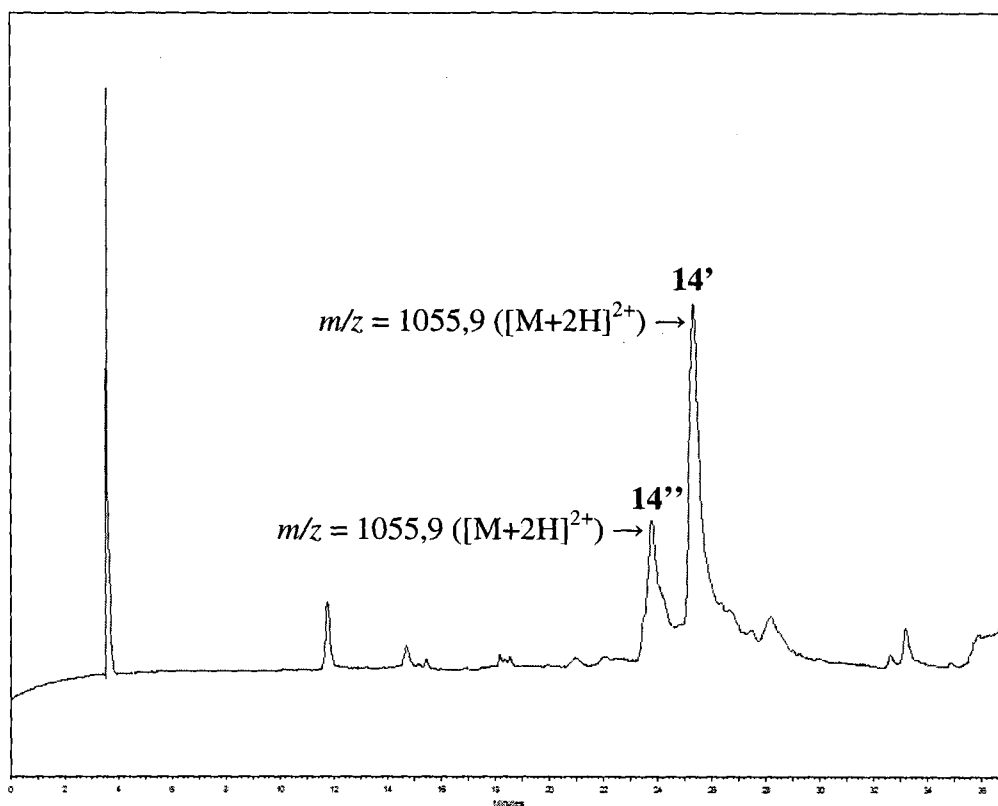


Figure 20:

Chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS des peptides **14'** et **14''**

**Figure 21 :**

Préparation d'un peptide C^α-amide de formule générale (II) (composés **15** et **15'**) à partir d'un composé de formule générale (I bis) (composé **13**).

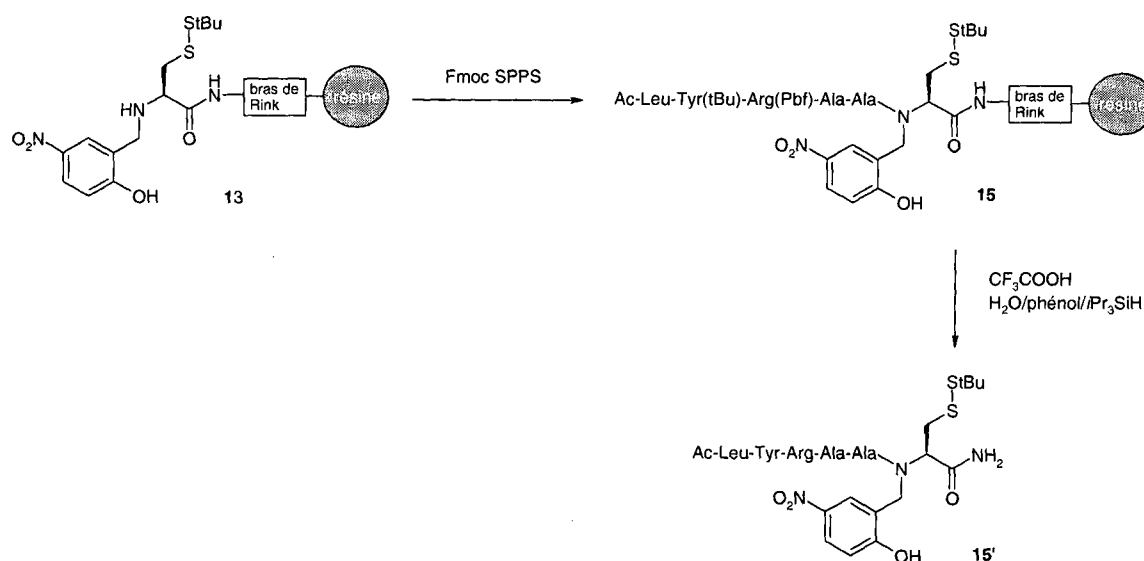
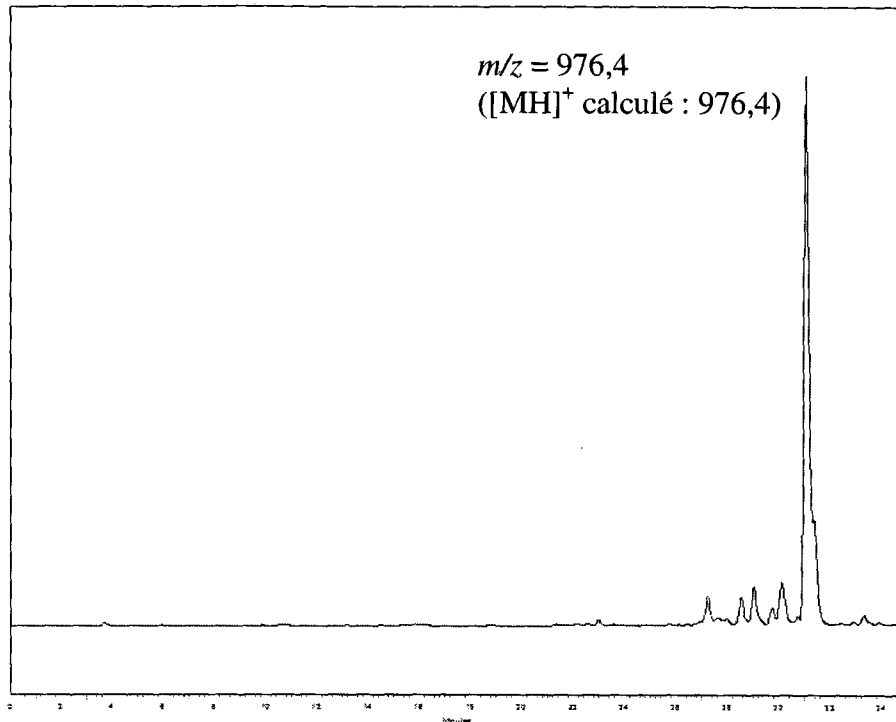
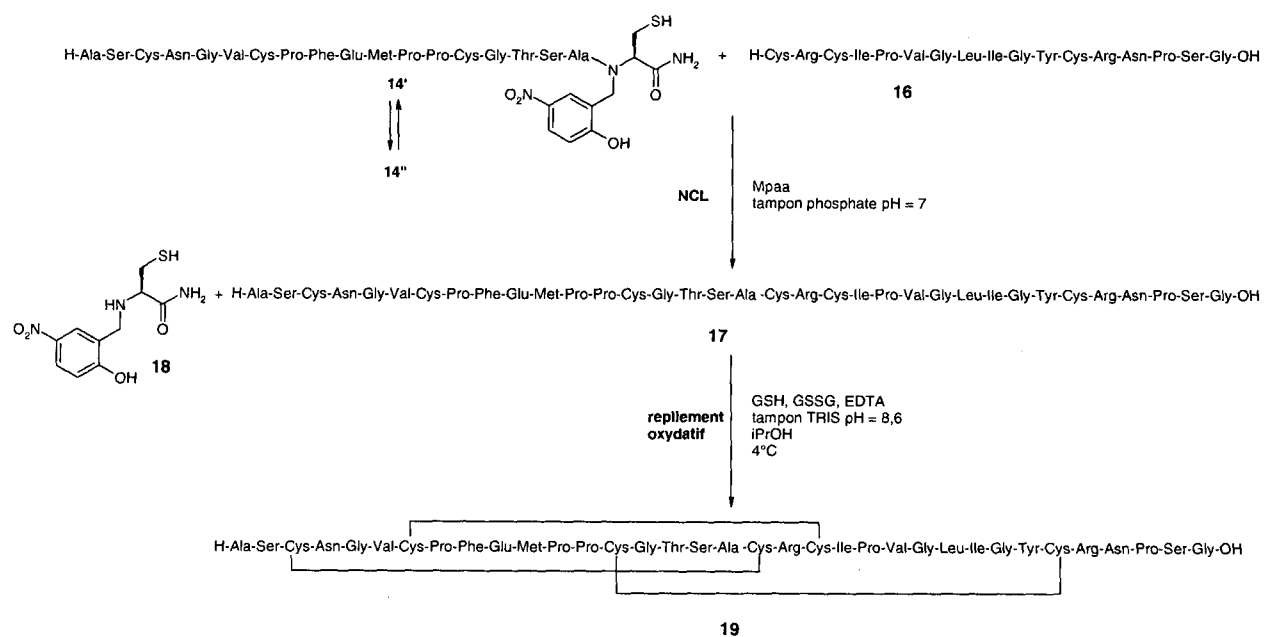


Figure 22:

Chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du peptide **15'**

**Figure 23 :**

Utilisation des peptides **14'**/**14''** dans une réaction de ligation native chimique NCL pour donner un peptide **17**, suivi d'un repliement oxydatif *one-pot* afin d'obtenir un peptide **19**.

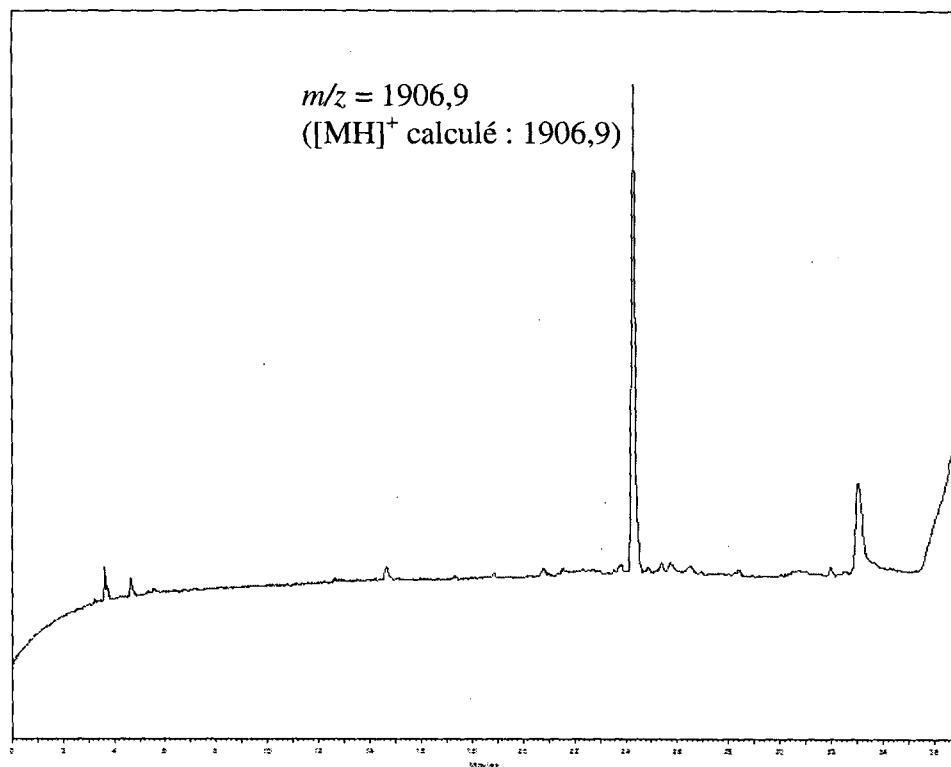


FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Figure 24:

Chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du peptide **16**.

**Figure 25:**

Chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du peptide **17** purifié.

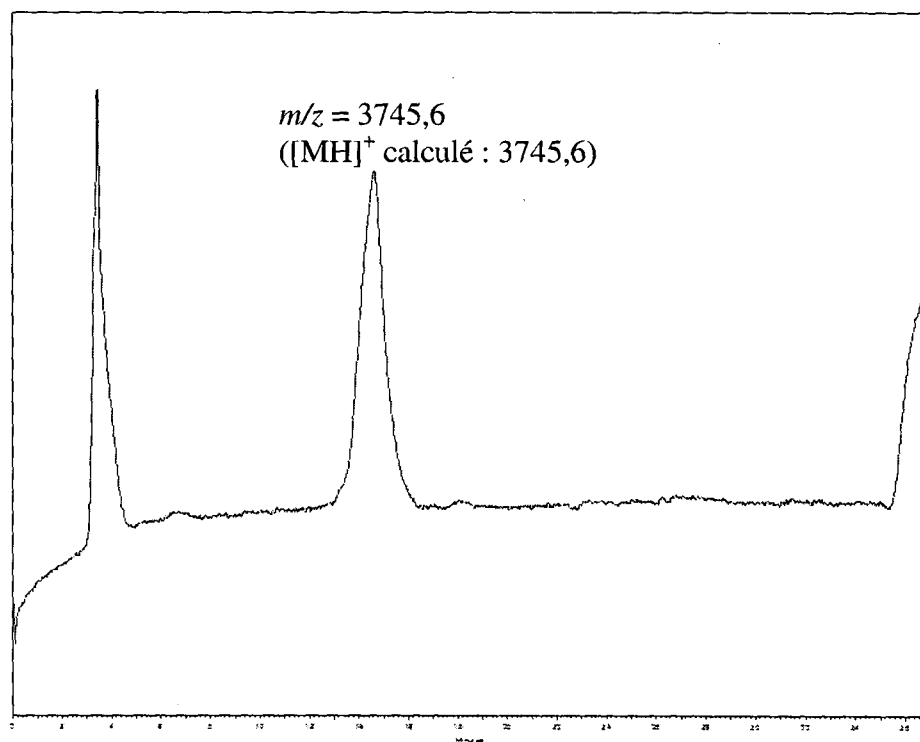
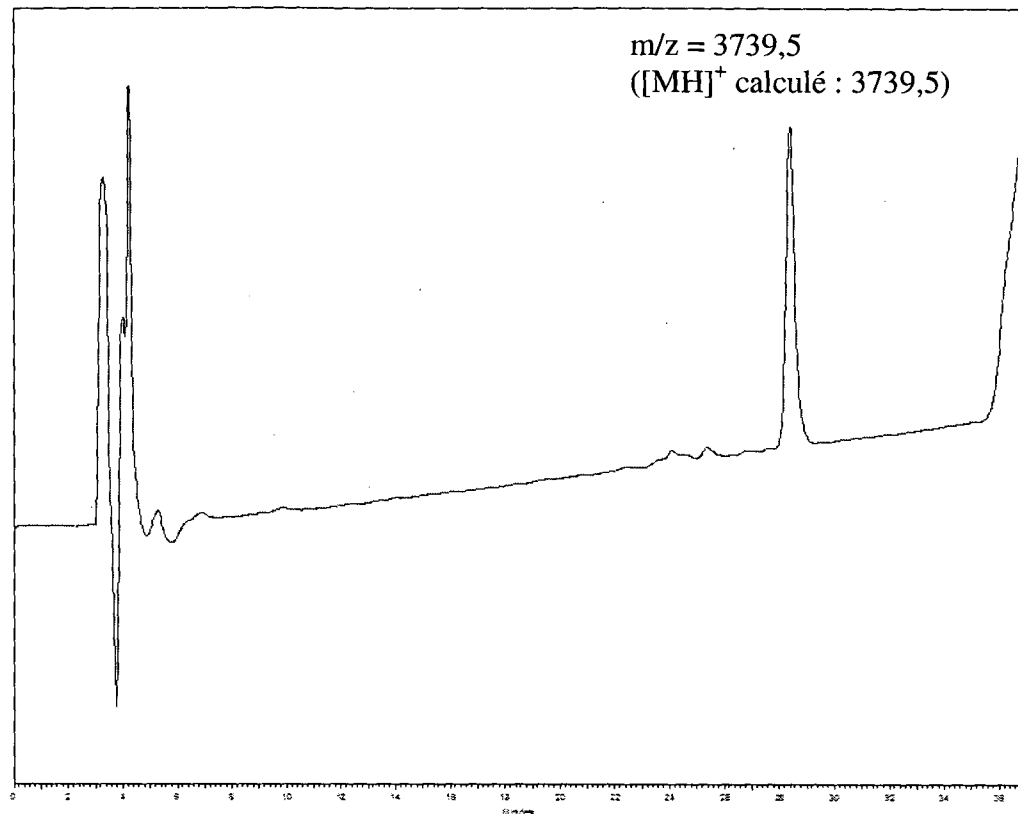


Figure 26

Chromatogramme d'une analyse par HPLC/MS du peptide **19** purifié.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2012/053074

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K1/04 C07K1/02
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification System followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal , CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011/184148 A1 (H0J0 H1 R0N0BU [JP] ET AL) 28 July 2011 (2011-07-28) table 1, 2	1-21
A	----- KOEHI SATO ET AL: "N-Sul fanyl ethyl ani li de Pepti de as a Crypto-Thi oester Pepti de", CHEMBIOCHEM, vol . 12, no. 12, 16 August 2011 (2011-08-16) , pages 1840-1844, XP055040434, ISSN: 1439-4227 , DOI : 10.1002/cbi c.201100241 Scheme 1 ----- -/- .	1-21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Spécial catégories of cited documents :

"A" document defining the général state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other spécial reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April 2013

Date of mailing of the international search report

26/04/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schl ei fenbaum, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2012/053074

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WEN HOU ET AL: "Pepti dyl N , N -Bi s(2-mercaptoethyl) -ami des as Thi oester Precursors for Nati ve Chemi cal Li gati on +", ORGANIC LETTERS, vol . 13, no. 3, 4 February 2011 (2011-02-04) , pages 386-389 , XP055040436, ISSN: 1523-7060, DOI : 10. 1021/O 1102735k cited in the appl icati on Scheme 2	1-21
X	----- Wo 2006/013209 A2 (GENMEDICA THERAPEUTICS SL [ES] ; OLARTE ANTONIO ZORZANO [ES] ; MIAN ALEC) 9 February 2006 (2006-02-09) page 53, line 18 page 55, lines 13, 18 -----	16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2012/053074

Patent document cited in search report			Publication date		Patent family member(s)			Publication date	
US 2011184148	AI	28-07-2011	EP	2085403	AI		05-08-2009		
			JP	5119159	B2		16-01-2013		
			US	2011184148	AI		28-07-2011		
			W0	2008044628	AI		17-04-2008		

W0 2006013209	A2	09-02-2006	AU	2005268781	AI		09-02-2006		
			CA	2575928	AI		09-02-2006		
			CN	101087601	A		12-12-2007		
			EP	1796681	A2		20-06-2007		
			JP	2008508348	A		21-03-2008		
			US	2008269282	AI		30-10-2008		
			W0	2006013209	A2		09-02-2006		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2012/053074

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C07K1/04 C07K1/02 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal , CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 2011/184148 A1 (H0J0 HIRON0BU [JP] ET AL) 28 jui llet 2011 (2011-07-28) tabl e 1, 2	1-21
A	----- KOHEI SATO ET AL: "N-Sul fanyl ethyl ani li de Pepti de as a Crypto-Thi oester Pepti de", CHEMBIOCHEM, vol . 12, no. 12, 16 août 2011 (2011-08-16), pages 1840-1844, XP055040434, ISSN: 1439-4227, DOI: 10.1002/cbi c.201100241 Scheme 1 ----- -/- .	1-21
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 19 avri l 2013		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 26/04/2013
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Schl ei fenbaum, A

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WEN HOU ET AL: "Pepti dyl N , N -Bi s(2-mercaptoethyl)-ami des as Thi oester Precursors for Nati ve Chemi cal Li gati on +", ORGANIC LETTERS, vol . 13, no. 3, 4 févri er 2011 (2011-02-04) , pages 386-389 , XP055040436, ISSN: 1523-7060, DOI : 10. 1021/ol 102735k cité dans la demande Scheme 2 -----	1-21
X	Wo 2006/013209 A2 (GENMEDICA THERAPEUTICS SL [ES] ; OLARTE ANTONIO ZORZANO [ES] ; MIAN ALEC) 9 févri er 2006 (2006-02-09) page 53, ligne 18 page 55, ligne 13, 18 -----	16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2012/053074

Document brevet cité au rapport de recherche			Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
US 2011184148	AI	28-07-2011	EP	2085403	AI	05-08-2009	
			JP	5119159	B2	16- 01-2013	
			US	2011184148	AI	28-07-2011	
			W0	2008044628	AI	17- 04-2008	

W0 2006013209	A2	09-02-2006	AU	2005268781	AI	09-02-2006	
			CA	2575928	AI	09-02-2006	
			CN	101087601	A	12-12-2007	
			EP	1796681	A2	20- 06-2007	
			JP	2008508348	A	21- 03-2008	
			US	2008269282	AI	30-10-2008	
			W0	2006013209	A2	09-02-2006	
