

ROYAUME DE BELGIQUE



BREVET D'INVENTION

NUMERO DE PUBLICATION : 1002237A3

NUMERO DE DEPOT : 8901003

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

Classif. Internat.: C07K

Date de délivrance : 30 Octobre 1990

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d' invention, notamment l' article 22;

Vu l' arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d' invention, notamment l' article 28;

Vu le procès verbal dressé le 19 Septembre 1989 à 14h55
à l' Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : SOCIETE D'EXPANSION SCIENTIFIQUE EXPANSIA
Société Anonyme
rue du Docteur Blanche 42, 75016 PARIS(FRANCE)

représenté(e)s par : KUBORN Jacques, OFFICE HANSSENS S.P.R.L., Square
Marie-Louise, 40 Bte 19 - 1040 BRUXELLES.

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes
annuelles, pour : SYNTHESE PEPTIDIQUE EN PHASE SOLIDE.

INVENTEUR(S) : Calas Bernard, avenue du Père Prévost 360, 34090 Montpellier (FR); Follet
Michel, rue des Chatelles 6, 30390 Aramon (FR); Mery Jean, rue des Lilas 44, 34980 Saint
Gely Du Fesc (FR); Naharisoa Hanitra, Cité Vertbois, rue de la Chênaie 192, 34075
Montpellier (FR)

Priorité(s) 24.09.88 GB GBA 8822502

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité
de l' invention, sans garantie du mérite de l' invention ou de l' exactitude de
la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Bruxelles, le 30 Octobre 1990
PAR DELEGATION SPECIALE :

W. L. L.
Directeur

Synthèse peptidique en phase solide.

La présente invention concerne un procédé de synthèse peptidique en phase solide.

Les abréviations utilisées ci-après sont conformes aux recommandations de 1983 de la Commission Conjointe à la Nomenclature Biochimique de l'IUPAC-IUB, comme cela est
5 indiqué dans Eur.J. Biochem, 138, 9-37 (1984). Les abréviations suivantes sont également utilisées :

	TFA	acide trifluoroacétique
	DCM	dichlorométhane
10	DMF	diméthylformamide
	NMP	N-méthylpyrrolidine
	DMAc	diméthylacétamide

En l'absence d'indication expresse, les acides aminés et leurs restes sont de série L : par exemple
15 Ala = L-alanine, mais DAla = D-alanine. Le terme (meth)acrylique est utilisé pour indiquer soit acrylique ou méthacrylique.

Les méthodes habituelles de synthèse peptidique en phase solide comprennent la séquence d'opérations
20 suivantes :

1. - Déprotection du groupement Boc ;
2. - Lavages ;
3. - Neutralisation du NH_2 en position α ;
4. - Lavages ;
- 25 5. - Couplages et,
6. - Lavages.

Les étapes de la déprotection et de la neutralisation sont réalisées en traitant le peptide-résine avec des solutions de TFA et de diisopropyléthylamine dans le DCM. Ce même solvant est également utilisé lors des lavages intermédiaires. Quelle que soit la technique utilisée (anhydride symétrique, dicyclohexylcarbodiimide, hydroxy-benzotriazole, etc.) le couplage est réalisé, soit dans le DCM, soit dans le DMF.

En conséquence, la synthèse peptidique en phase solide nécessite l'utilisation d'importantes quantités de solvants et de réactifs relativement onéreux tels que le TFA, si bien que le coût d'un peptide est directement lié à celui du DCM, NMP, DMF, DMAc et du TFA utilisés dans la synthèse.

Il serait donc particulièrement intéressant de trouver des solvants et réactifs moins coûteux afin d'abaisser de manière significative le coût de fabrication des peptides.

Le Brevet Européen No. 0 079 842 décrit des résines polyacryliques qui sont des copolymères des trois monomères définis comme suit :

(i) un premier monomère constituant la matrice du copolymère et choisi parmi les corps suivants :

(meth)acryloyl-1-pyrrolidine,
(meth)acryloyl-1-pipéridine,
(meth)acryloyl-1-perhydroazépine,
(meth)acryloyl-1-méthyl-4-pipérazine,
(meth)acryloyl-4-morpholine,
N,N-diméthyl-(meth)acrylamide and
N,N-diéthyl-(meth)acrylamide

(ii) un second monomère constituant l'agent de réticulation du copolymère et choisi parmi les corps suivants :

N,N'-di(meth)acryloyl-diamino-1,2-méthane et
N,N'-di(meth)acryloyl-diamino-1,2-éthane, et

(iii) un troisième monomère activant le copolymère et
choisi parmi les acides suivants :

- 5 acide (meth)acrylamido-2 acétique,
 acide (meth)acrylamido-3 propionique,
 acide (meth)acrylamido-4 butyrique
 acide (meth)acrylamido-6 hexanoïque,
 N-(meth)acryloyl-L-alanine,
10 N-(meth)acryloyl-L-valine,
 N-(meth)acryloyl-L-leucine,
 N-(meth)acryloyl-L-phénylalanine,
 N-(meth)acryloyl-L-tyrosine,
 N-(meth)acryloyl-L-méthionine,
15 N-(meth)acryloyl-L-lysine, and
 N-(meth)acryloyl-L-proline
 ou l'ester méthylique d'un de ces acides.

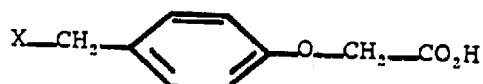
20 Ces copolymères ont des groupements carboxy ou
 méthoxy-carboniques libres provenant du troisième monomère.
 Le Brevet Européen No. 81408 décrit d'autres résines
 polyacryliques dans lesquelles ces groupements sont
 amidifiés avec de l'éthylène diamine. Il décrit également
 l'utilisation de ces autres résines polyacryliques lors de
25 la synthèse peptidique en phase solide, mais seulement en
 relation avec les solvants coûteux utilisés en général avec
 les résines polystyrènes, comme cela est décrit ci-dessus.

30 L'invention concerne une méthode pour la synthèse
 peptidique en phase solide, cette méthode comprenant la
 fixation d'un premier reste d'acide aminé à une résine
 polyacrylique, le couplage d'un ou de plusieurs autres
 restes d'acides aminés pour obtenir le peptide voulu et la
 séparation du peptide de la résine, caractérisée en ce que
 le protocole de couplage englobe des étapes de lavage de la

résine dans l'eau et/ou dans une solution aqueuse.

La méthode de l'invention tire avantage des propriétés hydrophiles des résines polyacryliques à l'inverse des résines polystyrènes. Les résines polyacryliques utilisées dans le procédé de l'invention sont, de préférence, celles décrites dans les Brevets Européens No. 0 079 842 et 0 081 408.

Le premier reste d'acide aminé est fixé sur la matrice à l'aide du maillon glycolamidique (B. CALAS et Al., Tetrahedron, 1985, 41, 5331). Les essais précédents avec d'autres restes labiles tels que :



dans lesquels X = Br, Cl ou OH n'ont pas donné de résultats satisfaisants.

La résine est alors lavée dans l'eau. L'acide aminé suivant de la séquence peptidique à construire est alors introduit de la manière suivante (applicable quand le groupement protégé est Boc) :

1. - Lavage : eau distillée - 2 à 4 fois 2 mn ;
2. - Déprotection : HCl (6N) en solution dans l'eau - 1 fois 2 mn puis une nouvelle fois 30 mn ;
3. - Lavage : eau distillée - 4 à 6 fois 2 mn ;

4. - Neutralisation : 1 équivalent de tampon borate 12,5 mM pH 8,5-9,0 - 1 fois, 1 à 2 mn et une nouvelle fois 1 à 2 mn ;
5. - Lavage : eau distillée - 4 à 6 fois, 1 à 2 mn ;
6. - Lavage : DMF - 2 fois, 1 à 2 mn ;
7. - Couplage : Anhydride symétrique (2 équivalents, 2 fois dans le DMF) ;
8. - Lavage : DMF ou NMP - 2 fois, 2 mn ; et
9. - Lavage : eau distillée - 4 fois, 2 mn.

10 La progression du couplage est suivie grâce aux tests à la ninhydrine ou à la fluorescamine.

Alternativement, quand le groupement protégé est Fmoc, le processus d'élongation est le suivant :

1. Lavage : eau distillée - 4 à 6 fois, 2 mn ;
- 15 2. Déprotection : pipéridine ou diéthylamine en solution dans l'eau ;
3. Lavage : isopropanol - 2 fois, 2 mn ; eau distillée - 4 à 6 fois, 2 mn ;
4. Lavage facultatif : DMF - 1 fois, 2 mn ;
- 20 5. Couplage : anhydride symétrique - 3 fois en excès dans le DMF) et,
6. Lavage : DMF (2 fois, 2 mn) ; eau distillée - 6 fois, 2 minutes.

25 Lorsque la synthèse est terminée, le peptide est séparé de la matrice par une coupure sélective de la liaison glycolamidique obtenue par l'un des traitements suivants :

- NaOH dans l'isopropanol,
- NH_3 dans le trifluoroéthanol ou dans le méthanol ou dans l'éthanol ou dans l'isopropanol,
- 30 - N_2H_4 dans le DMF et,
- CH_3OH dans le triéthylamine.

Avec cette méthode, on obtient, par exemple, le peptide de Dorman (Leu Ala Gly Val) et des analogues du LHRH avec des rendements supérieurs à 50 %.

5 L'invention sera mieux comprise grâce à la description des exemples qui suivent.

EXEMPLE 1

DTrp⁶-LHRH : pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-DTrp-Leu-Arg-Pro-Gly.

10 5 g d'une résine polyacrylique (0,55 mmol NH₂/g) préparés par copolymérisation d'acryloylpyrrolidine-1, de N,N'-diacryloyl diamino-1,2 éthane et d'acryl-2 amido-acétate de méthyle comme cela est décrit dans l'exemple 19 du Brevet Européen 0 079 842 sont traités de la manière suivante :

- 15
1. Lavages avec du DCM (4 fois, 2 mn),
 2. Neutralisation avec 5 % de diisopropyléthylamine dans du DCM (2 fois, 2 mn),
 3. Lavages avec du DCM (4 fois, 2 mn).

20 On ajoute à la résine 4,29 g (0,0165 mol) d'anhydride bromoacétique en solution dans 50 ml de DCM. Après avoir laissé sous agitation pendant 45 mn, la solution de DCM est filtrée et le support bromé est lavé de la manière suivante :

1. DCM (4 fois, 2 mn)
2. DMF (4 fois, 2 mn).

25 On dissout du sel de césium de BocGlyOH (4,22 g, 0,0137 mol) préparé selon la méthode de Mery et al. (Int.J.Protein Peptide Res. 1988, 31, 412) dans 75 ml de DMF et on ajoute cette solution à la résine. Le mélange est mis sous agitation pendant 2 jours à température ambiante.

30 Le DMF est drainé et le polymère est lavé avec :

1. DMF (10 fois, 2 mn),
2. Méthanol (4 fois, 2 mn),
3. DCM (4 fois, 2 mn)
4. Ether éthylique (4 fois, 2 mn).

5 La résine est séchée sous vide poussé en présence de pastilles KOH pendant 12 heures. Le total de Gly liés représente de 0,483 mmol/g ; il est déterminé par l'analyse d'acides aminés après hydrolyse HCl 6N, dans des tubes scellés sous vide à 110°C pendant 24 heures.

10 On lave la résine-BocGly (4,47 g) avec de l'eau (4 fois, 2 mn) et le groupement Boc est clivé par traitement HCl 6N en solution dans l'eau (2 fois, une fois 2 mn et une autre fois 30 mn). Le HCl est éliminé par filtration et la résine lavée à l'eau (6 fois, 2 mn). Pour la
15 neutralisation, on utilise du tampon borate (12,5 mmol, pH 9), la résine étant traitée 2 fois 1 mn avec 50 ml du tampon. Après avoir lavé avec de l'eau (6 fois, 2 mn) et du DMF (2 fois, 2 mn), on ajoute à la résine l'anhydride symétrique de BocProOH en solution dans 50 ml de DMF.

20 La solution d'anhydride symétrique est préparée de la manière suivante : BocProOH (3,55 g, 0,0165 mol) dissous dans 40 ml de DMF, la solution est refroidie à 0°C et on ajoute du dicyclohexylcarbodiimide (1,69 g, 8,25 mmol) en solution dans 10 ml de DCM. Après avoir laissé sous
25 agitation à 0°C pendant 30 mn et filtration, la solution est évaporée sous vide poussé sans élévation de la température et le résidu est dissous dans du DMF et ensuite ajouté à la résine. Le mélange est mis sous agitation pendant 30 mn après quoi on contrôle que, le test
30 qualitatif à la ninhydrine de Kaiser et al. (Anal. Biochem. 1970, 34, 575) se révèle négatif -indiquant un rendement de couplage supérieur à 99,6 %-.

Le DMF est alors éliminé et le support est lavé deux fois avec du DMF (2 mn) et de l'eau (4 fois, 2 mn).

5 Ce protocole est utilisé pour introduire les acides aminés suivants de la séquence DTrp⁶-LHRH. Pour préparer les anhydrides symétriques, on utilise : BocArg (Mts)OH (7,52 g, 0,0165 mol), BocLeuOH (4,11 g, 0,0165 mol), BocDTrpOH (5,02 g, 0,0165 mol), BocTyr (2,6 dichlorobenzyl)OH ou BocTyr (2,6 DCB)OH (7,26 g, 0,0165 mol), BocSer (Bzl)OH (4,86 g, 0,0165 mol), BocTrpOH (5,02 g, 10 0,0165 mol), BocHis (Dinitrophényle)OH ou BocHis (Dnp)OH (6,94 g, 0,0165 mol), pyro-GluOH (2,13 g, 0,0165 mol).

15 Après avoir incorporé du pyro-GluOH, la résine est lavée avec du méthanol (4 fois, 2 mn), de l'éther éthylique (4 fois, 2 mn) et est séchée sous vide poussé à température ambiante pendant 48 heures.

On traite alors le peptide-résine avec 10 ml de thiophénol en solution dans 50 ml de DMF pour séparer le groupement dinitrophényl sur la chaîne latérale histidine.

20 Après avoir laissé sous agitation pendant 45 mn, la solution de thiophénol est drainée et la résine est lavée avec du DMF (4 fois, 2 mn), du DCM (4 fois, 2 mn) et avec de l'éther éthylique (4 fois, 2 mn). La résine est séchée sous vide poussé pendant 12 heures. Elle est traitée 2 fois 30 mn at 0°C avec 50 ml de la solution suivante
25 préalablement refroidie : acide trifluorométhanesulfonique (3,6 ml), anisole (4 ml), thioanisole (4 ml), métacrésol (4 ml) et acide trifluoroacétique (40 ml). A la fin de la séquence de déprotection, on lave la résine avec du DCM (2 fois, 2 mn), du DCM/DMF (50/50) (2 fois, 2 mn), du
30 diisopropyléthylamine en solution à 5 % dans du DCM (2 fois, 1 mn), du DMF (3 fois, 2 mn), de l'isopropanol/eau (70/30) (3 fois, 2 mn). Le peptide-résine est mis en suspension dans 250 ml d'une solution trifluoroéthanolique saturée en NH₃.

Après avoir laissé sous agitation le mélange à température ambiante pendant 15 heures, on sépare la solution trifluoroéthanolique contenant le DTrp⁶-LHRH déprotégé et on lave le support avec de l'eau (4 fois, 2 mn), puis du méthanol (4 fois, 2 mn) et une nouvelle fois avec de l'eau (6 fois, 2 mn). Les filtrats sont rassemblés, le pH est porté à 4 environ avec de l'acide chlorhydrique 1N puis, ils sont concentrés sous vide sans élévation de la température. Le résidu est fractionné sur une colonne de carboxyméthyle cellulose (Wathman CM 52, 10 x 2 cm) ayant un gradient linéaire de NaCl (10 mM ACONa pH 5,0 à 10 mM ACONa, 0,15M NaCl pH 5,0). Les fractions appropriées sont rassemblées, lyophilisées et désalées par filtration du gel sur une colonne (100 x 2,5 cm) de Sephadex G10 dans 10 M HCl. La fraction peptidique est ensuite purifiée par traitement CLHP sur une colonne (270 x 20 mm) de Lichrosorb RP 18 (10 µm) avec 0,01 % d'acide trifluoroacétique (TFA) 0,01 % en solution dans l'eau et de l'acetonitrile en tant qu'éluate.

Rendement : 51 % (basé sur les groupements aminés du support initial).

Analyse d'acides aminés : Glu 0,99 (1), Leu 1,0 (1), His 1,0 (1), Trp 1,89 (2), Ser 0,96 (1), Tyr 0,97 (1), Pro 0,99 (1), Gly 1,07 (1).

Pour certains des acides aminés qui sont moins stables en milieu acide, les valeurs analytiques sont inférieures à celles attendues en raison de leur dégradation.

On utilise le même procédé pour la préparation des peptides suivants :

- Peptide de Dorman : Leu Ala Gly ValOH

Rendement = 46,6 %

Gly : 0,96, Ala = 0,94, Val = 1,05, Leu = 1,04

- Laminine : Tyr Ile Gly Ser ArgNH₂
Rendement = 35,6 %
Ser = 0,75, Gly = 1,03, Ile = 0,99, Tyr = 1, Arg = 0,99
- 5 - CDC 28 protéine kinase du cycle cellulaire de levure "Pombee"
Rendement = 44,1 % (peptide à l'état brut)
Tyr Lys Ala Leu Asp Leu Arg Pro GlyOH
Asp = 1, Gly = 1,08, Ala = 1, Leu = 1,05 x 2, Tyr = 0,99, Arg = 0,99, Lys = 1, Pro = 1.
- 10 - Tyrosine phosphatase
Rendement = 58,6 % (peptide à l'état brut)
Cys Ser Asp Ser Glu Lys Leu Asn Leu Asp Ser IleOH
Asp = 0,95 x 3, Ser = 0,58 x 3, Glu = 0,67, Ile = 1,1, Leu = 1,1.
- 15 - Oncogène : Phe Arg Gly Thr Leu Arg
Rendement = 53,4 %
Phe = 0,97, Arg = 2 x 1,1, Gly = 1,02, Thr = 0,99, Leu = 1.

EXEMPLE 2

20 Leu-Ala-Gly-Val

On traite 1 g de la résine polyacrylique utilisée dans l'exemple 1 de la manière suivante :

- 1. Lavages avec du DCM (4 fois, 2 mn),
- 25 2. Neutralisation avec 5 % de diisopropyléthylamine dans du DCM,
- 3. Lavages avec du DCM (4 fois, 2 mn).

On ajoute à la résine 0,858 g d'anhydride bromoacétique en solution dans 10 ml de DCM. Après avoir

laissé sous agitation pendant 45 mn, la solution de DCM est éliminée par filtration et le support bromé est lavé de la manière suivante :

- 5
1. DCM (4 fois, 2 mn)
 2. DMF (4 fois, 2 mn)

10 On dissout du sel de césium de FmocValOH (1,29 g, 2,75 mmol) préparé selon la méthode de Mery et al. (Int. J. Peptide Protein Res. 1988, 31, 412) dans 15 ml de DMF et on ajoute cette solution à la résine. La suspension est mise sous agitation à température ambiante pendant 3 jours. Le DMF est ensuite drainé et le polymère est lavé avec :

- 15
1. DMF (10 fois, 2 mn)
 2. Méthanol (4 fois, 2 mn)
 3. DCM (4 fois, 2 mn)
 4. Ether éthylique (4 fois, 2 mn)

20 La résine est séchée sous vide poussé en présence de paillettes de KOH pendant 12 heures. Le total de Val liés représente de 0,492 mmol/g ; il est déterminé par l'analyse des acides aminés, après hydrolyse dans du HCL 6N dans des tubes scellés sous vide pendant 24 heures.

25 On lave la Résine-FmocVal (1,1 g) avec de l'eau (4 fois, 2 mn) et le groupement Fmoc est clivé par traitement à la pipéridine ou à la diéthylamine (10 %) en solution dans de l'eau (2 fois, 2 mn). La résine est ensuite lavée avec de l'isopropanol (2 fois, 2 mn) et avec de l'eau (4 fois, 2 mn).

30 On ajoute au support de l'anhydride symétrique de FmocGlyOH en solution dans 15 ml de DMF. La solution d'anhydride symétrique est préparée de la manière suivante :

On dissout le FmocGlyOH (0,981 g, 3,3 mmol) dans 15 ml de DCM, la solution est refroidie à 0°C et on ajoute du dicyclohexylcarbodiimide (0,339 g, 1,65 mmol) en solution dans 10 ml de DCM. Le mélange opaque obtenu est mis sous agitation pendant 20 mn à 0°C et le précipité de dicyclohexylurée est éliminé par filtration. Le filtrat est concentré sous vide à température ambiante. Le résidu huileux est dissous dans 15 ml de DMF et la solution obtenue est ajoutée à la résine. Le mélange est mis sous agitation à température ambiante pendant 45 mn après quoi on contrôle que le test qualitatif à la ninhydrine de Kaiser et al. (Anal. Biochem. 1970, 34, 575) se révèle négatif. Le DMF est éliminé par filtration et le support est lavé avec du DMF (2 fois, 2 mn) et ensuite avec de l'eau (6 fois, 2 mn).

Ce protocole est utilisé pour introduire les acides aminés Leu et Ala. Les anhydrides symétriques sont préparées à partir de 1,16 g (3,3 mmol) de FmocLeuOH et 1,02 g (3,3 mmol) de FmocAlaOH. Après la synthèse, l'ensemble peptide-résine est lavé avec de l'isopropanol (4 fois, 2 mn), avec de l'eau (4 fois, 2 mn) et, enfin avec un mélange isopropanol/eau (70/30) (4 fois, 2 mn).

Le peptide-résine est ensuite mis en suspension dans un mélange isopropanol/eau (70/30) auquel on ajoute 1,1 ml de NaOH 1N. Après avoir mis sous agitation le mélange à température ambiante pendant 5 heures, on sépare le mélange isopropanol-eau contenant le Leu-Ala-Gly-Val et on lave le support avec de l'eau (4 fois, 2 mn), du méthanol (4 fois, 2 mn) et avec de l'eau (4 fois, 2 mn). Les filtrats sont rassemblés et le pH est porté à 4 avec du HCl 1N ; la solution est concentrée sous vide à température ambiante. Le résidu est purifié par traitement CLHP sur une colonne (250 x 20 mm) de Lichrosorb RP 18 (10 µm) avec du TFA (0,1 %) en solution dans l'eau et de l'acétonitrile comme éluants.

- 13 -

Rendement : 54 % (basé sur les groupements aminés du support initial).

Analyse d'acides aminés : Leu 1,02 (1), Ala 0,99 (1), Gly 1,1 (1), Val 1,0 (1).

- 5 On utilise la même méthode pour la synthèse des peptides suivants :
- Peptide de Dorman : Leu Ala Gly ValOH
Rendement = 46,6 %
Gly = 0,93, Ala = 0,91, Val = 1,01, Leu = 1.
 - 10 - Laminine : Tyr Ile Gly Ser ArgNH₂
Rendement = 46,3 %
Ser = 0,79, Gly = 1,01, Ile = 0,96, Tyr = 0,89, Arg = 0,93
 - 15 - CDC 28 protéine kinase du cycle cellulaire de levure "Pombee".
Rendement = 48,6 % (peptide à l'état brut)
Tyr Lys Ala Leu Asp Leu Arg Pro GlyOH
Asp = 0,97, Gly = 1,02, Ala = 0,98, Leu = 1,02 x 2,
Tyr = 0,98, Arg = 0,96, Lys = 1, Pro = 0,97.
 - 20 - Tyrosine phosphatase
Rendement = 61,6 % (peptide à l'état brut)
Cys Ser Asp Ser Glu Lys Leu Asn Leu Asp Ser IleOH
Asp = 0,99 x 3, Ser = 0,63 x 3, Glu = 0,73, Ile = 1,03, Leu = 1.
 - 25 - Oncogène : Phe Arg Gly Thr Leu Arg
Rendement = 49,2 %
Phe = 1, Arg = 2 x 1,04, Gly = 1, Thr = 0,96, Leu = 0,98.

REVENDEICATIONS

5 1. Procédé pour la synthèse peptidique en phase solide, comprenant la fixation d'un premier reste d'acide aminé à une résine polyacrylique, le couplage d'un ou plusieurs autres restes d'acides aminés pour obtenir le peptide voulu et la séparation du peptide de la résine, caractérisé en ce que le protocole de couplage englobe des étapes de lavage de la résine dans l'eau et/ou une solution aqueuse.

10 2. Procédé selon la revendication 1 dans lequel la résine polyacrylique est un copolymère des trois monomères définis comme suit :

(i) un premier monomère constituant la matrice du copolymère et choisi parmi les corps suivants :

15 (meth)acryloyl-1-pyrrolidine,
(meth)acryloyl-1-pipéridine,
(meth)acryloyl-1-perhydroazépine,
(meth)acryloyl-1-méthyl-4-pipérazine,
(meth)acryloyl-4-morpholine,
20 N,N-diméthyl-(meth)acrylamide and,
N,N-diéthyl-(meth)acrylamide

(ii) un second monomère constituant l'agent de réticulation du copolymère et choisi parmi les corps suivants :

25 N,N'-di(meth)acryloyl-diamino-1,2-méthane et
N,N'-di(meth)acryloyl-diamino-1,2-éthane-2, et

(iii) un troisième monomère activant le copolymère et choisi parmi les acides suivants :

acide (meth) acrylamido-2 acétique,
acide (meth) acrylamido-3 propionique,
acide (meth) acrylamido-4 butyrique,
acide (meth) acrylamido-6 hexanoïque,
5 N-(meth)acryloyl-L-alanine,
N-(meth)acryloyl-L-valine,
N-(meth)acryloyl-L-leucine,
N-(meth)acryloyl-L-phénylalanine,
N-(meth)acryloyl-L-tyrosine,
10 N-(meth)acryloyl-L-méthionine,
N-(meth)acryloyl-L-lysine, and
N-(meth)acryloyl-L-proline
ou l'ester méthylique d'un de ces acides.

15 3. Procédé selon la revendication 1 dans lequel la
résine polyacrylique est un copolymère selon la
revendication 2, amidifié avec de l'éthylène diamine.

20 4. Procédé selon l'une des revendications précédentes
dans lequel le groupement N- protégé, utilisé dans le
couplage d'acides aminés est Boc et le protocole de
couplage est :

1. - Lavage : eau distillée - 2 à 4 fois, 2 mn ;
2. - Déprotection : HCl (6N) en solution dans l'eau -
1 fois, 2 mn et une autre fois, 30 mn ;
3. - Lavage : eau distillée - 4 à 6 fois, 2 mn ;
- 25 4. - Neutralisation : 1 équivalent de tampon borate
12,5 mM pH 8,5 - 9,0 - 1 fois, 1 à 2 mn et une
autre fois, 1 à 2 mn ;
5. - Lavage : eau distillée - 4 à 6 fois, 1 à 2 mn ;
6. - Lavage : DMF - 2 fois, 1 à 2 mn ;
- 30 7. - Couplage : anhydride symétrique (2 équivalents,
2 fois dans le DMF) ;
8. - Lavage : DMF ou NMP - 2 fois, 2 mn ; et
9. - Lavage : eau distillée - 4 fois, 2 mn.

5. Procédé selon l'une des revendications de 1 à 3 dans lequel le groupement N- protégé utilisé dans le couplage d'acides aminés est Fmoc et le protocole de couplage est :

- 5
 - 1. - Lavage : eau distillée - 4 à 6 fois, 2 mn ;
 - 2. - Déprotection : Pipéridine ou diéthylamine dans l'eau ;
 - 3. - Lavage : isopropanol - 2 fois, 2 mn ; eau distillée - 4 à 6 fois, 2 mn ;
- 10
 - 4. - Lavage facultatif : DMF - 1 fois, 2 mn
 - 5. - Couplage : anhydride symétrique (3 fois en excès dans le DMF) et
 - 6. - Lavage : DMF (2 fois, 2 mn) ; eau distillée - 6 fois, 2 mn.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BE 8901003

B0 1892

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
A	FR-A-2 243 183 (PFAENDER et al.) * Le document en entier, surtout l'exemple 1, pages 15-16 * -----	1	C 07 K 1/04
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
			C 07 K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
07-03-1990		MASTURZO P.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

BE 8901003
BO 1892

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 23/03/90.
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A- 2243183	04-04-75	DE-A- 2334930	13-02-75
		DE-A- 2416941	09-10-75
		US-A- 3951741	20-04-76
