



(11) (21) (C) **2,026,655**
(22) 1990/10/01
(43) 1991/04/03
(45) 2000/12/05

(72) Bernard, Jean-Marie, FR

(72) Bouzid, Kamel, FR

(72) Gervais, Christian, FR

(73) Rhone-Poulenc Chimie, FR

(51) Int.Cl.⁶ C07K 1/06

(30) 1989/10/02 (89 13 054) FR

(54) **PROCEDE DE SOLUBILISATION DE PEPTIDES ET PROCEDE
DE SYNTHESE DE PEPTIDES**

(54) **PROCESS FOR THE SOLUBILISATION OF PEPTIDES AND
PROCESS FOR THE SYNTHESIS OF PEPTIDES**

(57) Procédé de solubilisation de peptide dans un solvant organique non miscible à l'eau, consistant à lier au groupe carboxylique terminal dudit peptide un groupe lipophile par une liaison amide ou ester: ce groupe lipophile est caractérisé par le fait que lorsqu'il est lié à la L-sérine, on obtient une molécule dont la solubilité dans l'eau à 25°C est inférieure à 30 g/litre. Ce groupe lipophile est chimiquement défini et non polymérique. La présente invention concerne aussi un procédé de synthèse de peptides éventuellement protégés, en milieu liquide, caractérisé en ce que l'on part d'un aminoacide ou d'un peptide solubilisé en milieu organique par un groupe A-L lipophile lié à la fonction carboxylique de l'acide ou du peptide de départ et que l'on ajoute les aminoacides ou les peptides à condenser activés sur leur fonction acide et protégés sur leur fonction amine et éventuellement sur leur chaîne latérale. Les peptides issus de la synthèse sont utilisés éventuellement pour la synthèse de médicaments, vaccins, produits agro-alimentaires ou phytosanitaires.

PRECIS DE LA DIVULGATION:

Procédé de solubilisation de peptide dans un solvant organique non miscible à l'eau, consistant à lier au groupe carboxylique terminal dudit peptide un groupe lipophile par une liaison amide ou ester; ce groupe lipophile est caractérisé par le fait que lorsqu'il est lié à la L-sérine, on obtient une molécule dont la solubilité dans l'eau à 25°C est inférieure à 30 g/litre. Ce groupe lipophile est chimiquement défini et non polymérique. La présente invention concerne aussi un procédé de synthèse de peptides éventuellement protégés, en milieu liquide, caractérisé en ce que l'on part d'un aminoacide ou d'un peptide solubilisé en milieu organique par un groupe A-L lipophile lié à la fonction carboxylique de l'acide ou du peptide de départ et que l'on ajoute les aminoacides ou les peptides à condenser activés sur leur fonction acide et protégés sur leur fonction amine et éventuellement sur leur chaîne latérale. Les peptides issus de la synthèse sont utilisés éventuellement pour la synthèse de médicaments, vaccins, produits agro-alimentaires ou phytosanitaires.

PROCEDE DE SOLUBILISATION DE PEPTIDES
ET PROCEDE DE SYNTHESE DE PEPTIDES

La présente invention a pour objet un procédé de
05 solubilisation de peptides. Elle a aussi pour objet un procédé de
synthèse de peptides en phase liquide.

Il existe un grand nombre de méthodes de synthèse de peptides
décrites dans la littérature. Elles ont toutes des points communs de
base qui consistent :

- 10 - à protéger la fonction de la chaîne latérale d'un
aminoacide par un groupe protecteur clivable en fin de
synthèse du peptide,
- à protéger la fonction amide ($N\alpha$) dudit aminoacide par un
groupement protecteur clivable après la condensation de
15 l'aminoacide,
- à activer la fonction acide carboxylique dudit aminoacide
protégé puis à le condenser avec un acide aminé ou un
peptide dont la fonction C terminale est protégée et dont
la fonction amine est libre,
- 20 - le peptide est obtenu par déprotection totale des groupes
protecteurs après la condensation de tous les acides
aminés.

Les diverses méthodes de synthèse se distinguent par l'état
physique de la phase où a lieu la synthèse : phase liquide ou phase
25 solide.

Les méthodes de synthèse dites en phase liquide consistent à
réaliser toutes les réactions en phase homogène.

Dans la méthode décrite par Bodansky et du Vigneaud dans le
Journal of American Chemical Society 81, 5688-5691 (1959) l'aminoacide
30 de départ est protégé par un groupe méthylque et les aminoacides
successifs sont condensés "pas à pas" après protection de leur fonction
amine par un groupe benzyl oxycarbonyl et activation de leur fonction
carboxylique par un ester nitrophénylique. Les intermédiaires

successifs sont purifiés par précipitation ou lavages. Cette technique requiert un nombre élevé d'étapes de synthèse délicates ou longues qui entraînent inévitablement une perte importante de produits ; c'est ainsi que Schwyzer et Sieber (Helvetica Chemica Acta, 49, 134-158, 05 1966) obtiennent par cette technique un rendement pour l'ACTH de seulement 6,85 %.

La synthèse décrite par Beyermann et Coll (Rec. Trav. Chim. Pays Bas 92,481, 1973) consiste à appliquer la même méthode que précédemment, à partir d'un aminoacide ou d'un peptide dont le 10 groupement carboxylique est protégé par un groupe benzylique et à réaliser les couplages en présence d'un excès d'anhydride d'acide protégé, de façon à augmenter les rendements. Le nombre d'opérations est aussi élevé que dans le procédé précédent et le peptide formé perd souvent sa solubilité en milieu organique dès que le nombre 15 d'acides dépasse quatre ou cinq.

Certaines méthodes de synthèse en phase liquide utilisent des agents protecteurs solubilisants de l'acide ou du peptide de départ plus sophistiqués ; ainsi le brevet européen n° 0 017 536 mentionne comme groupe protecteur le groupe phénylazobenzyl 20 sulfonylethoxy (OPSE). Ce groupe permet la solubilisation des peptides formés dans le diméthyl formamide et leur insolubilisation, tant dans l'eau que dans les autres solvants organiques. La synthèse se fait toujours "pas à pas" avec précipitation de chaque intermédiaire peptidique formé avant l'ajout d'un nouvel acide, ce qui pose des 25 problèmes au niveau de la filtration des solides. Ce procédé comme l'ensemble des procédés précédemment évoqués ne permet pas de maintenir en solution des peptides ayant un grand nombre d'acides.

Parmi les procédés en phase liquide, on peut encore citer les procédés dans lesquels l'acide est maintenu en solution par 30 l'usage d'un polymère linéaire non réticulé, tel que le polyéthylène-glycol (Mutter et Bayer, Nature 237, 512 (1972), les sous-produits étant éliminés par ultracentrifugation ou par précipitation.

Parmi les méthodes de synthèse dites en phase solide, on peut citer la technique décrite par Merrifield en 1963 dans le Journal of American Chemical Society 85, 2149-2154, qui consiste à fixer la fonction carboxylique C-terminale du premier aminoacide ou du premier groupe peptidique sur un support insoluble. Les couplages et les lavages peuvent être standardisés de façon à rendre le procédé automatisable. Cette technique reste à ce jour encore fort coûteuse, car il est nécessaire d'utiliser les réactifs en grand excès de façon à convertir toutes les chaînes peptidiques en cours de synthèse dans un temps raisonnable. La pureté et l'homogénéité des peptides formés est encore loin d'être idéale, les sous-produits constitués de chaînes peptidiques non complètes doivent être éliminés en fin de réaction. En effet, la purification au stade intermédiaire est impossible, tandis qu'au stade final elle est difficile, car elle demande un appareillage compliqué et une technique sophistiquée, donc coûteuse telle que la chromatographie liquide haute pression préparative.

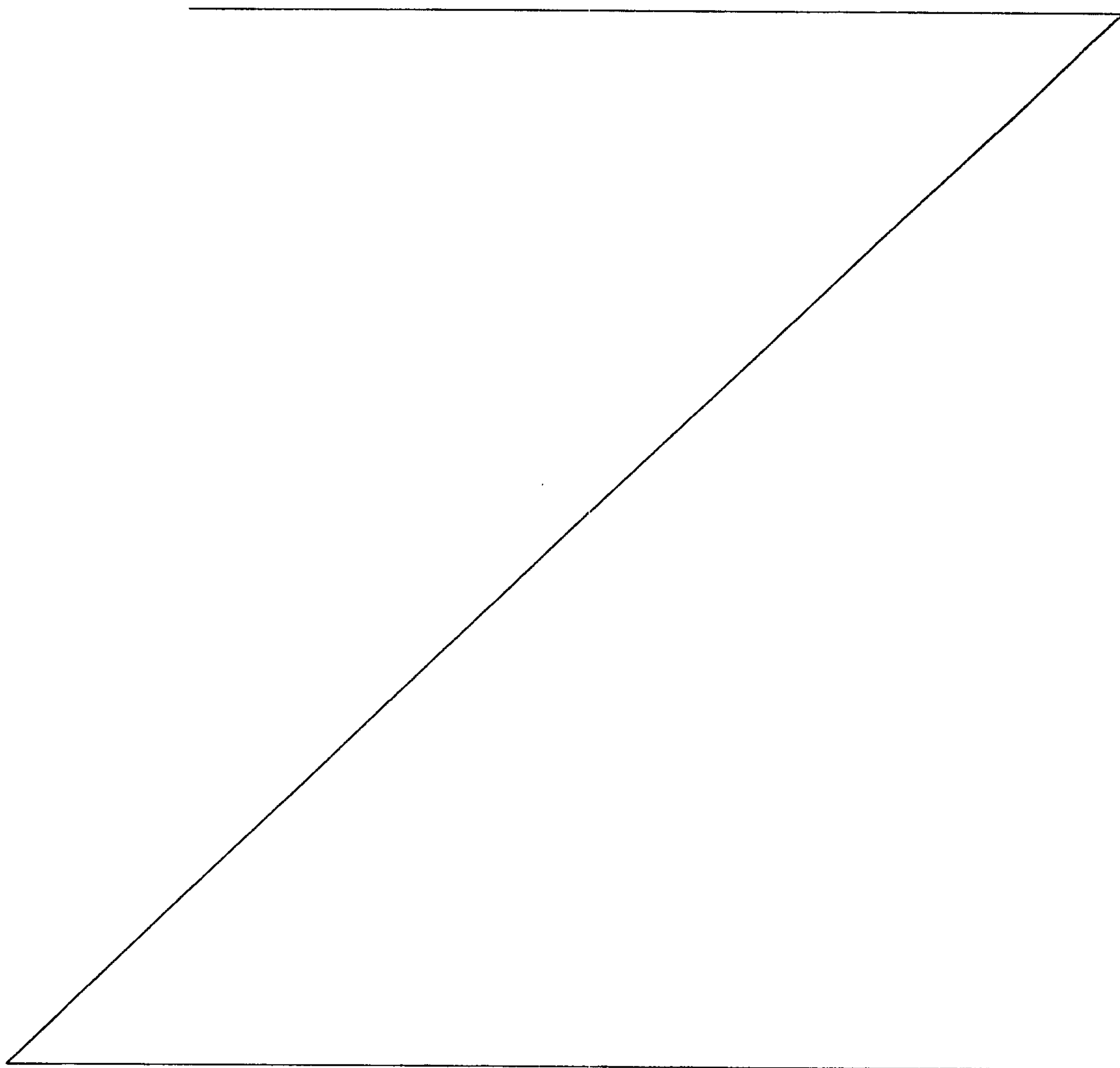
L'extrapolation de cette technologie au stade industriel reste un problème non résolu à ce jour, en raison des difficultés de mise en oeuvre de fortes quantités de résines, soit en réacteur agité, soit en lit fixe.

La présente invention a permis de résoudre une grande partie des problèmes laissés en suspens dans l'art antérieur.

Il a maintenant été trouvé un procédé de solubilisation de peptides qui peut permettre leur synthèse en phase liquide non aqueuse et leur purification.

Le procédé de solubilisation de peptides éventuellement protégés ou salifiés, dans un solvant organique non miscible à l'eau, est caractérisé en ce que le groupe C-terminal d'un peptide ou d'un aminoacide est lié par l'intermédiaire d'une liaison amide ou ester à un groupe lipophile, ce dernier lorsqu'il est lié à la L-sérine donnant une molécule dont la solubilité dans l'eau à 25°C est inférieure à 30 g/litre, ce groupe lipophile étant chimiquement défini et non polymérique.

10



Le groupe lipophile, qui va permettre la synthèse peptidique en phase liquide organique non miscible à l'eau, est de préférence composé de deux entités A et L liées entre elles par une liaison covalente et liées au peptide de façon covalente par l'intermédiaire de
05 l'entité A :



L'entité - A - représente un bras d'ancrage bifonctionnel entre le peptide en cours de synthèse et le groupe L.

Le groupe L représente la partie lipophile de l'entité A - L.

10 Ce groupe L n'est en aucun cas polymérique. C'est de préférence un groupe hydrocarboné comportant éventuellement des halogènes ; il répond à la formule générale :

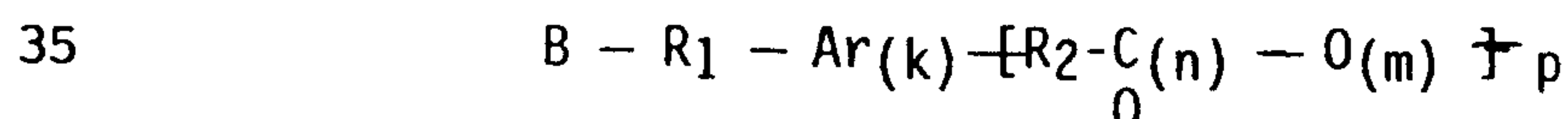


dans laquelle:

- 15 - a est un nombre entier compris de 1 à 50
 - b est un nombre entier compris de 3 à 101
 - c est un nombre entier compris de 0 à 6
 - d est un nombre entier compris de 0 à 2
 - e est un nombre entier compris de 0 à 2
 20 - f est un nombre entier compris de 0 à 2
 - g est un nombre entier compris de 0 à 20
 - X représente un halogène choisi parmi le fluor, le chlore et le brome.

On préfère parmi l'ensemble des composés pouvant représenter
25 le groupe L ceux pour lesquels (a) représente un nombre entier supérieur à 6 et encore plus préférentiellement supérieur à 12, ainsi que ceux pour lesquels (g) représente un nombre entier supérieur à 2.

Le groupe A qui, comme précisé précédemment représente le bras d'ancrage bifonctionnel, comporte à une de ses extrémités au moins
30 une fonction alcool ou amine (B) et à l'autre extrémité une fonction carbonyle ou une fonction éther. Il peut être représenté par la formule générale suivante :



dans laquelle :

- B représente un groupe hydroxyle ou amino
- Ar représente un radical aromatique mono ou polycyclique
- R₁ représente une liaison covalente, un radical alkylène contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué par un radical phényle, un groupe alkylènegcarbonyle
- R₂ représente une liaison covalente, un radical alkylène contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué, un groupe oxyalkylène contenant 1 à 4 atomes de carbone dans la chaîne alkylène, un atome d'oxygène
- k, m et n sont des nombres entiers égaux à 0 ou 1
- p est un nombre entier égal à 1 ou 2.

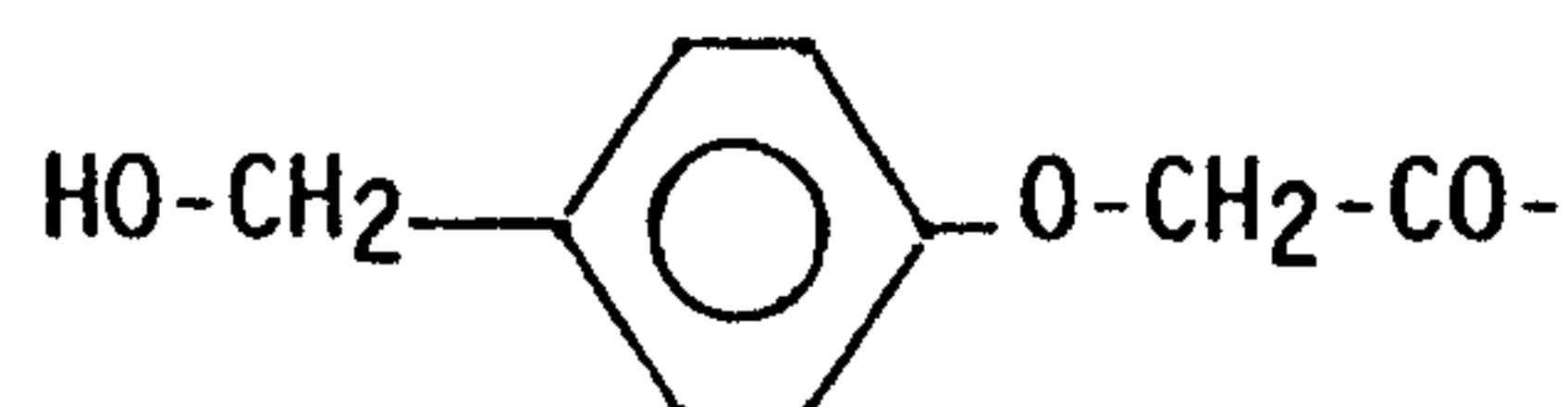
Il est évident à la lecture de la présente description que les deux entités A et L peuvent former un seul groupe répondant aux formules :

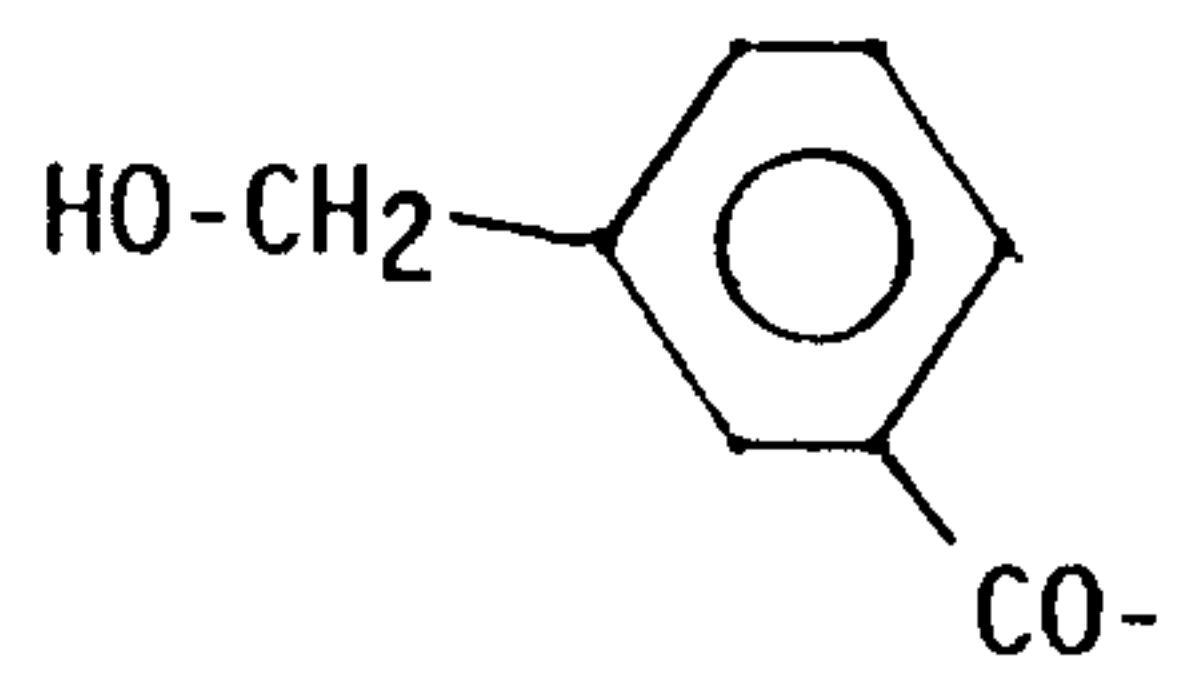
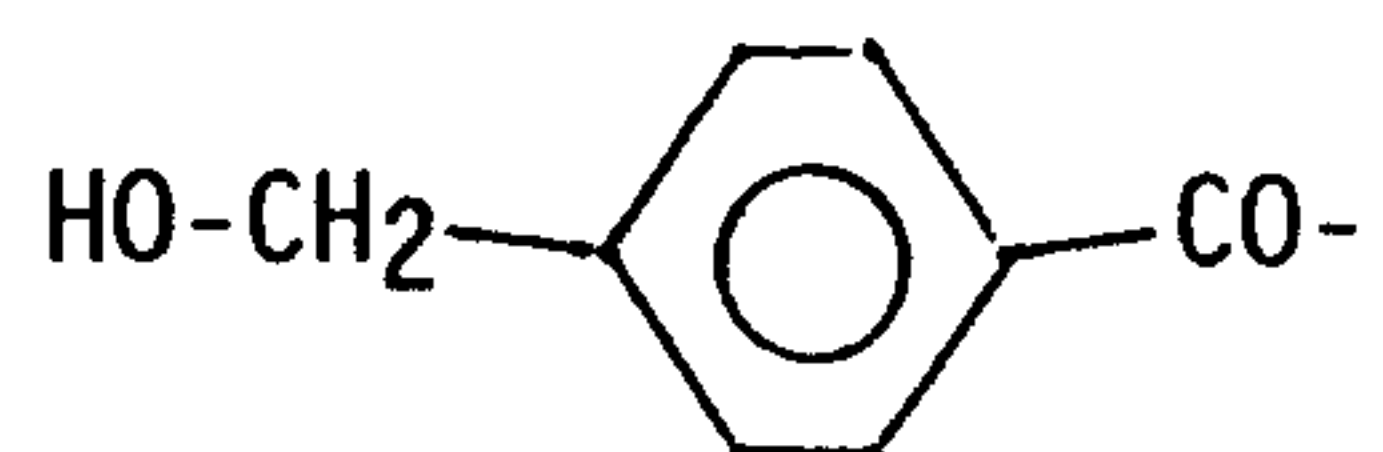
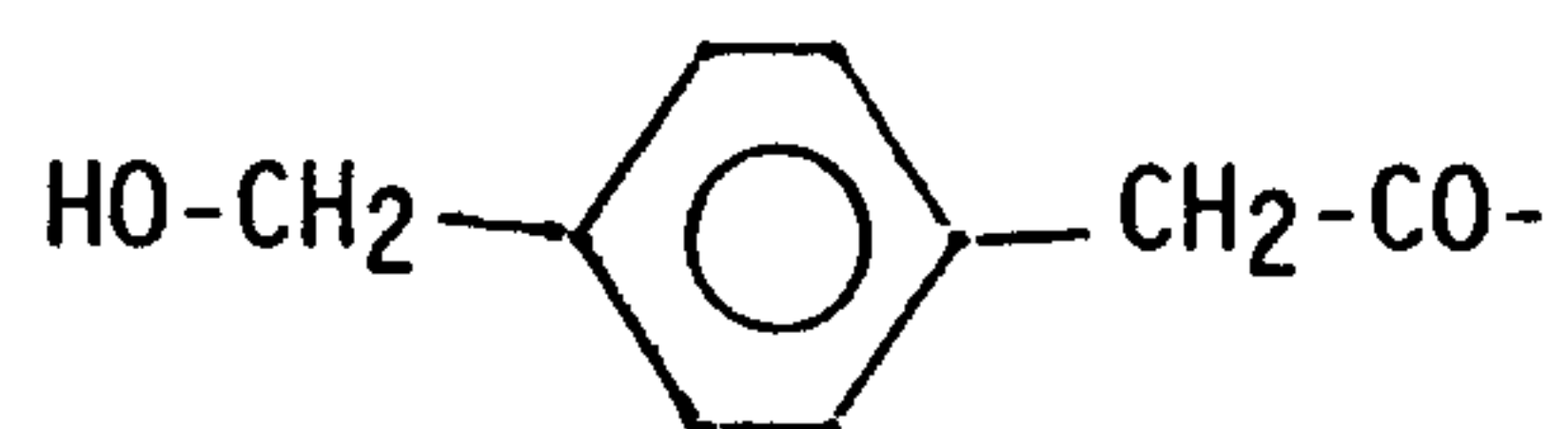
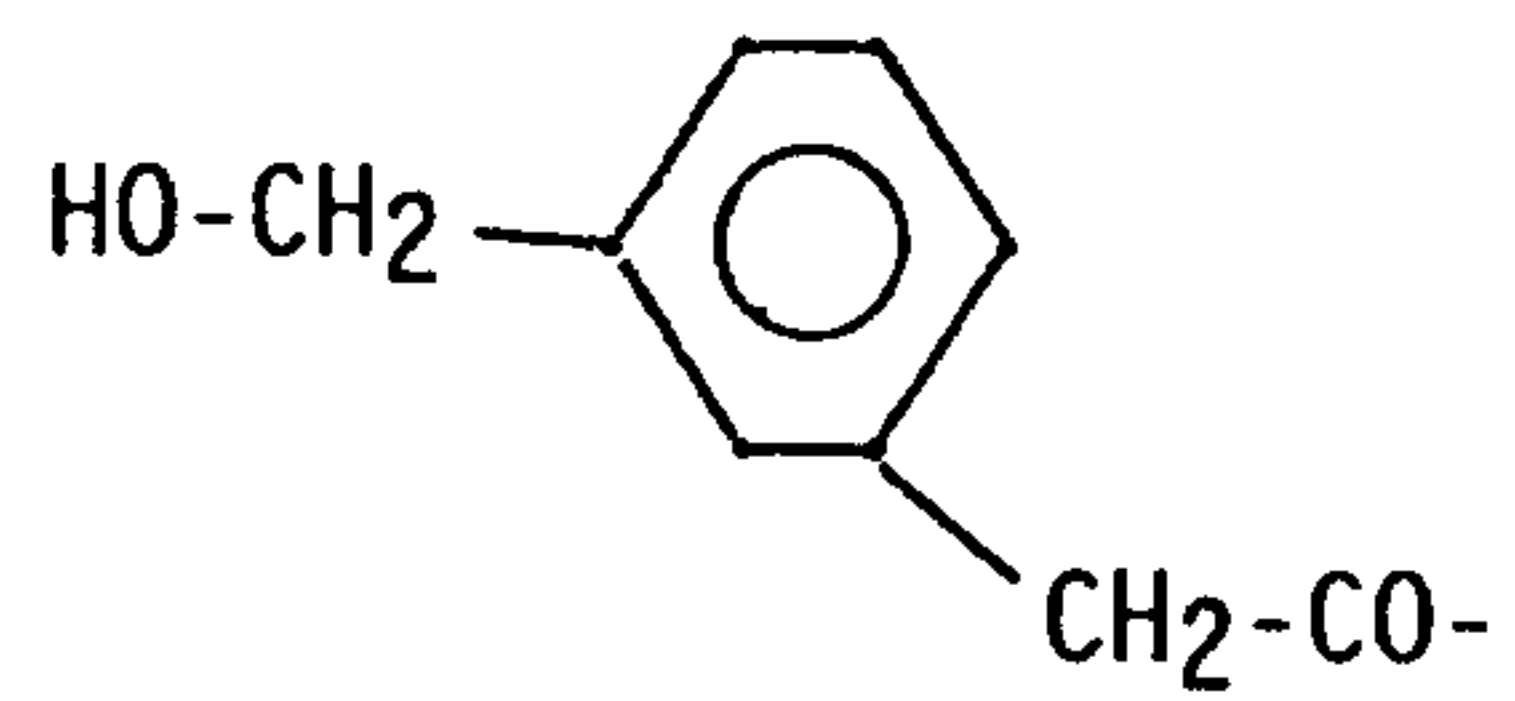
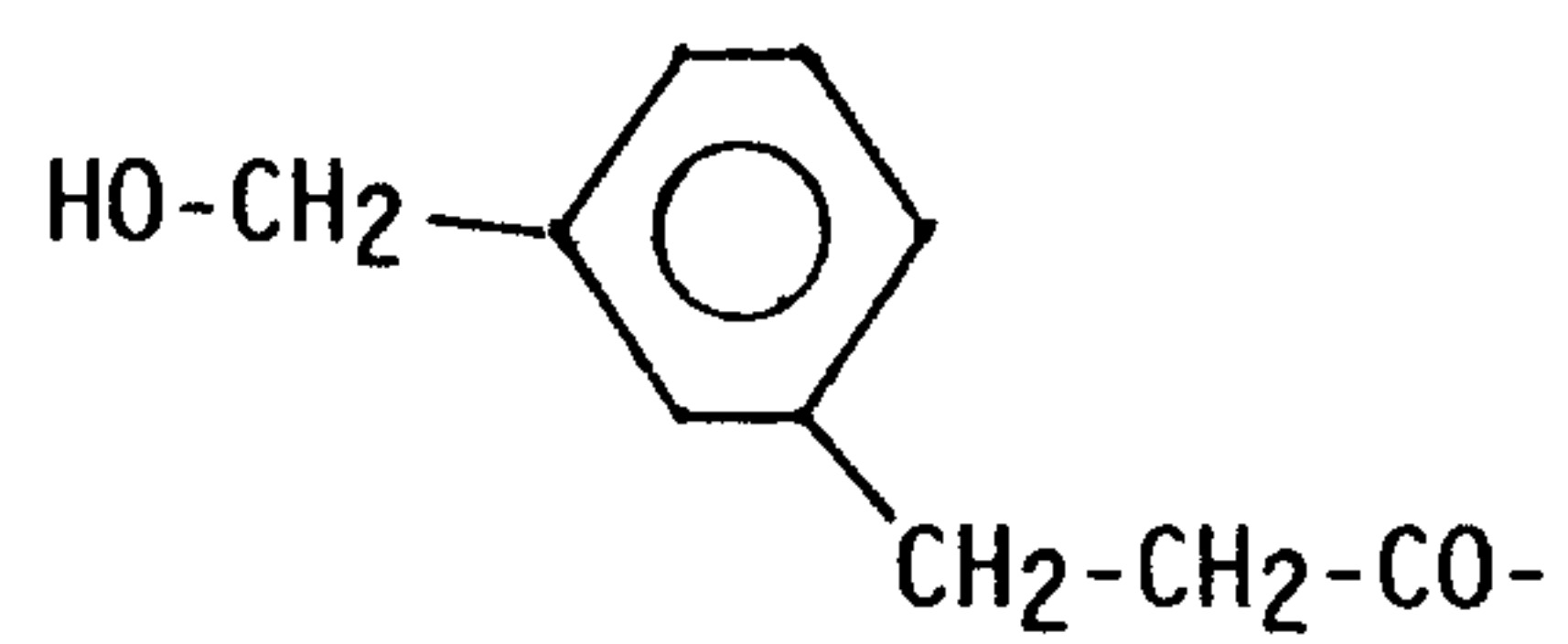
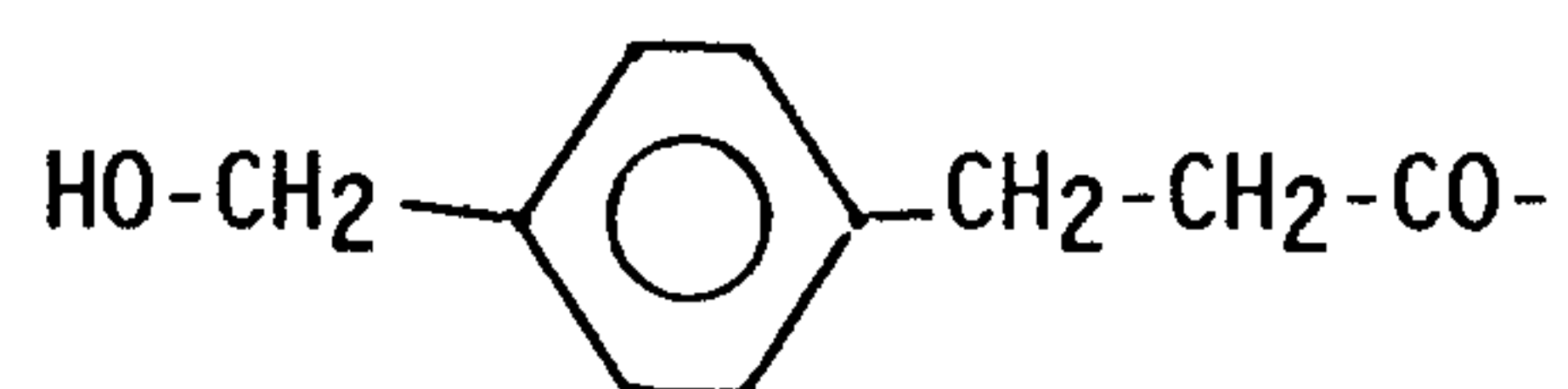
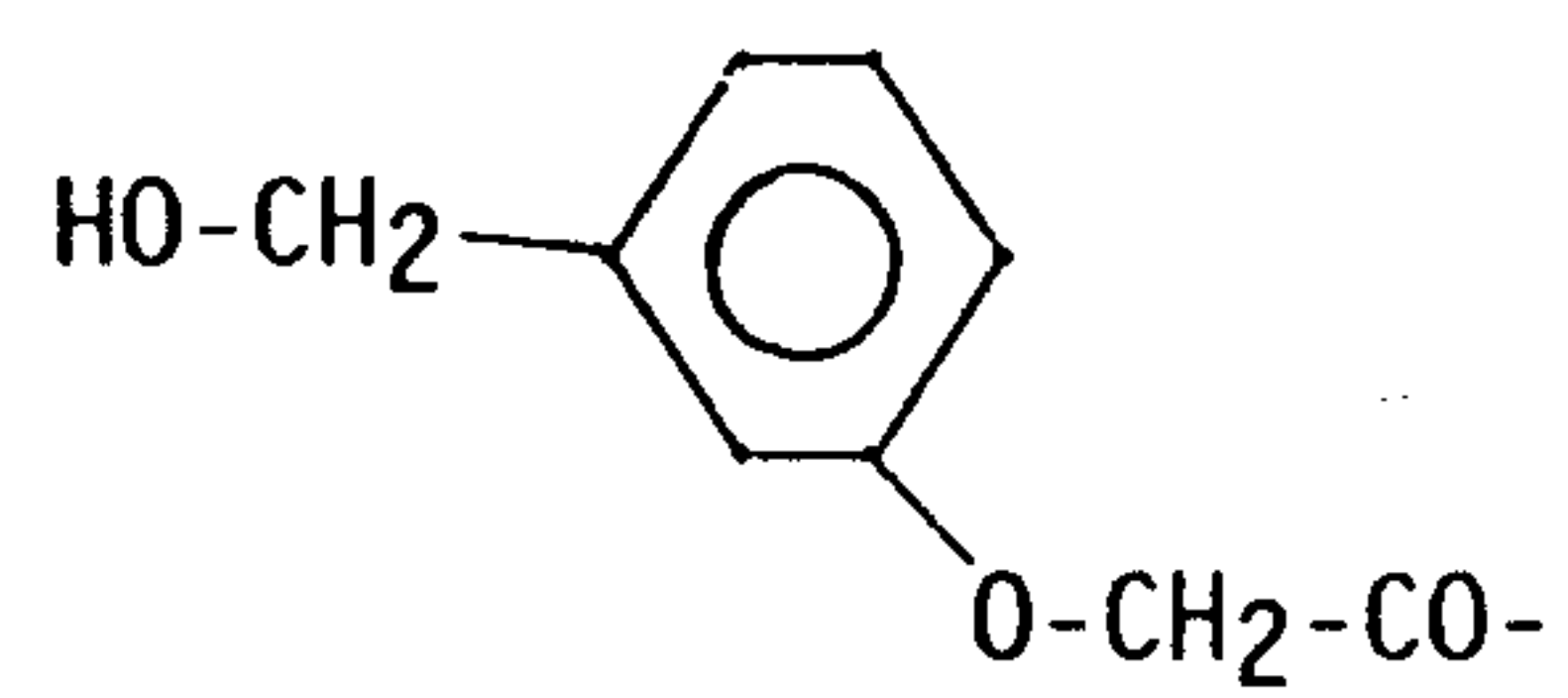


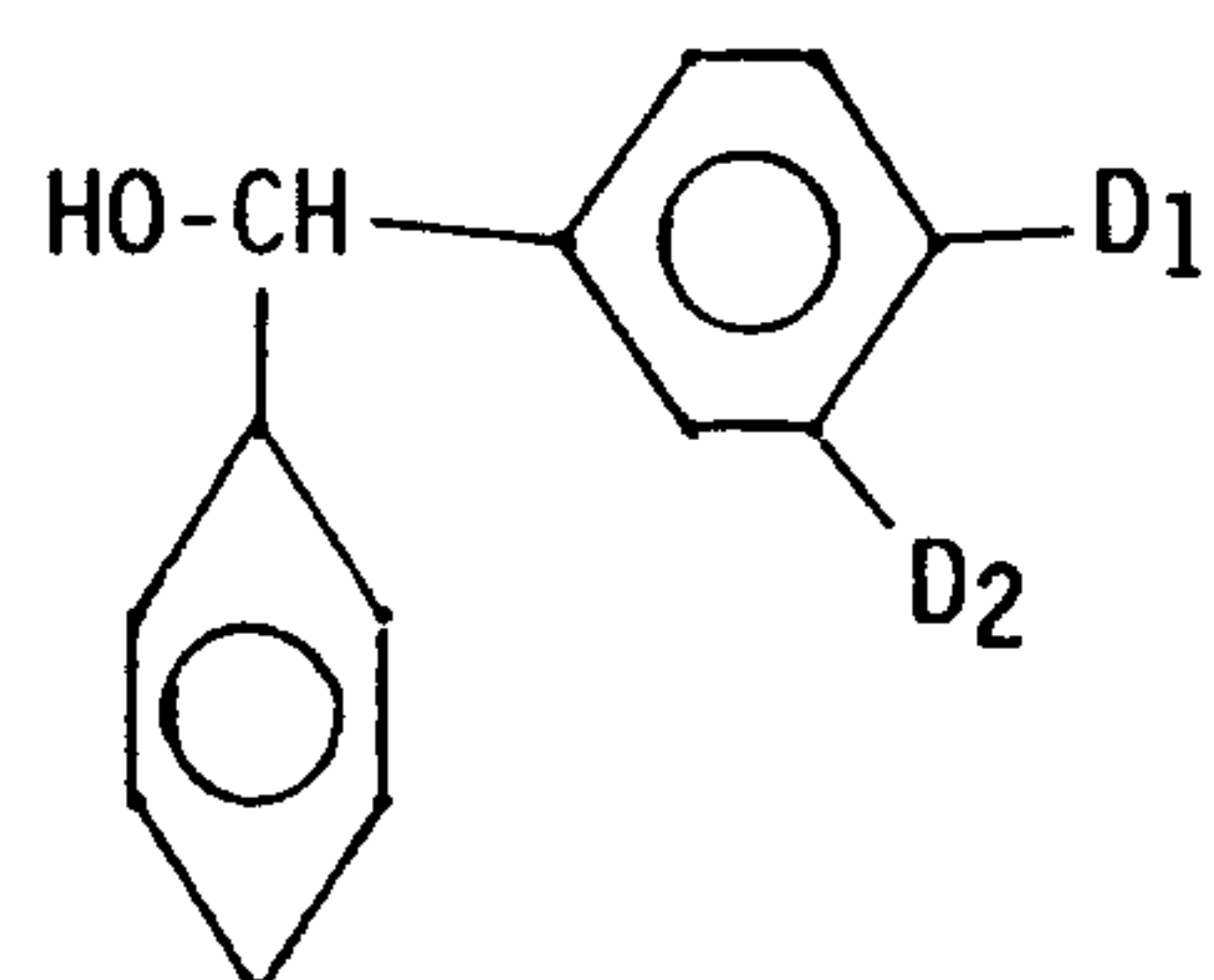
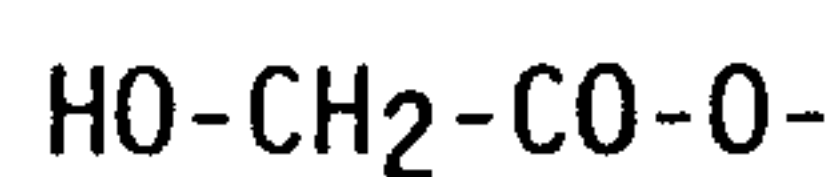
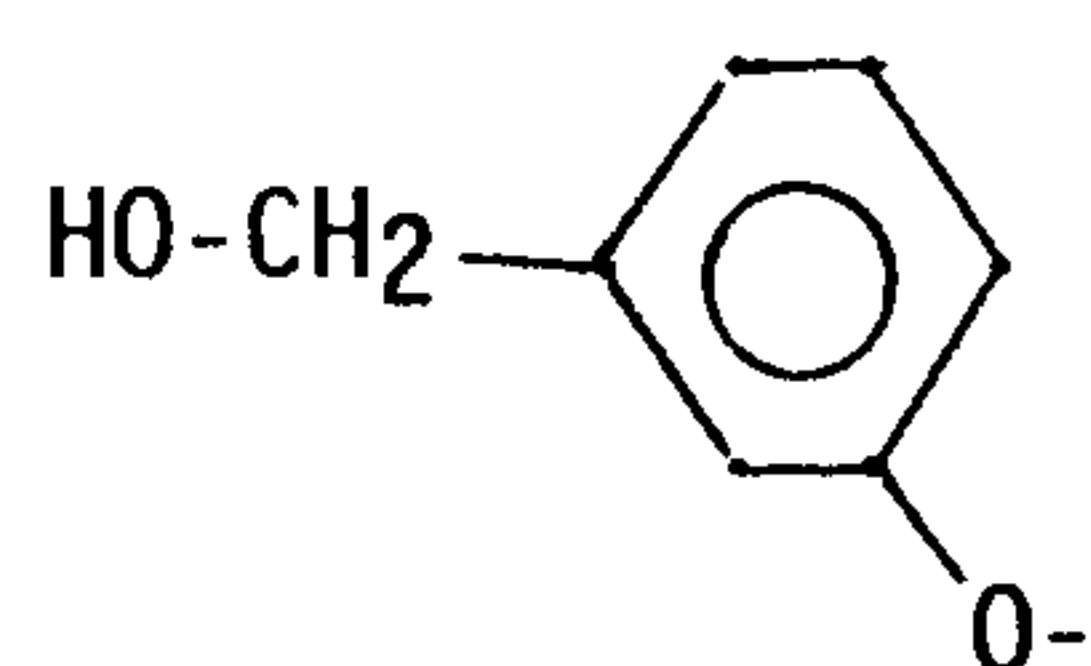
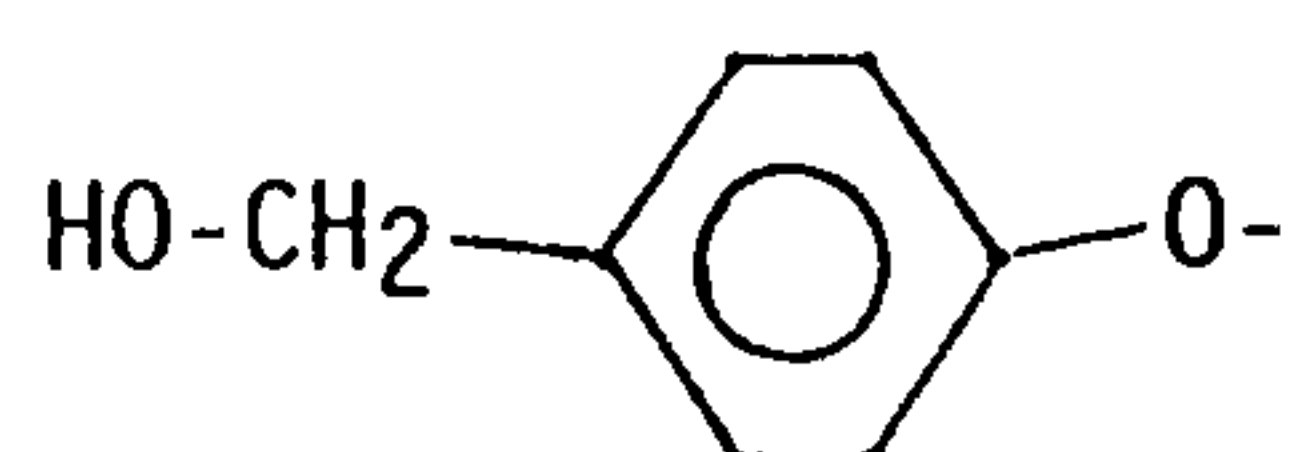
dans lesquelles :

- B et R₁ ont les mêmes significations que précédemment
- Ar' représente un radical aromatique polycyclique
- Ar'' représente un radical benzénique et q est un nombre entier égal à 2 ou 3.

On peut citer parmi les groupes A - les groupes de formules suivantes :

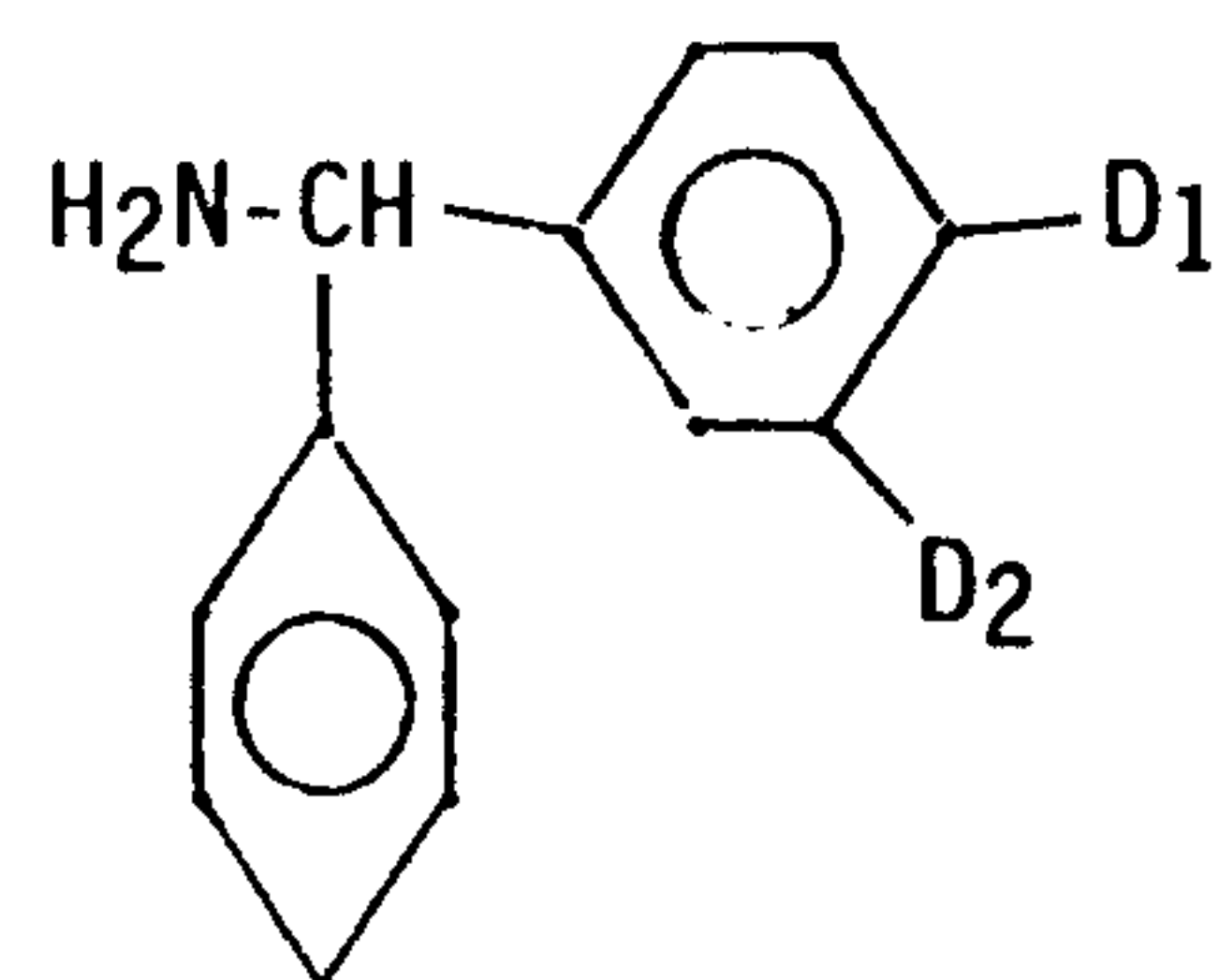




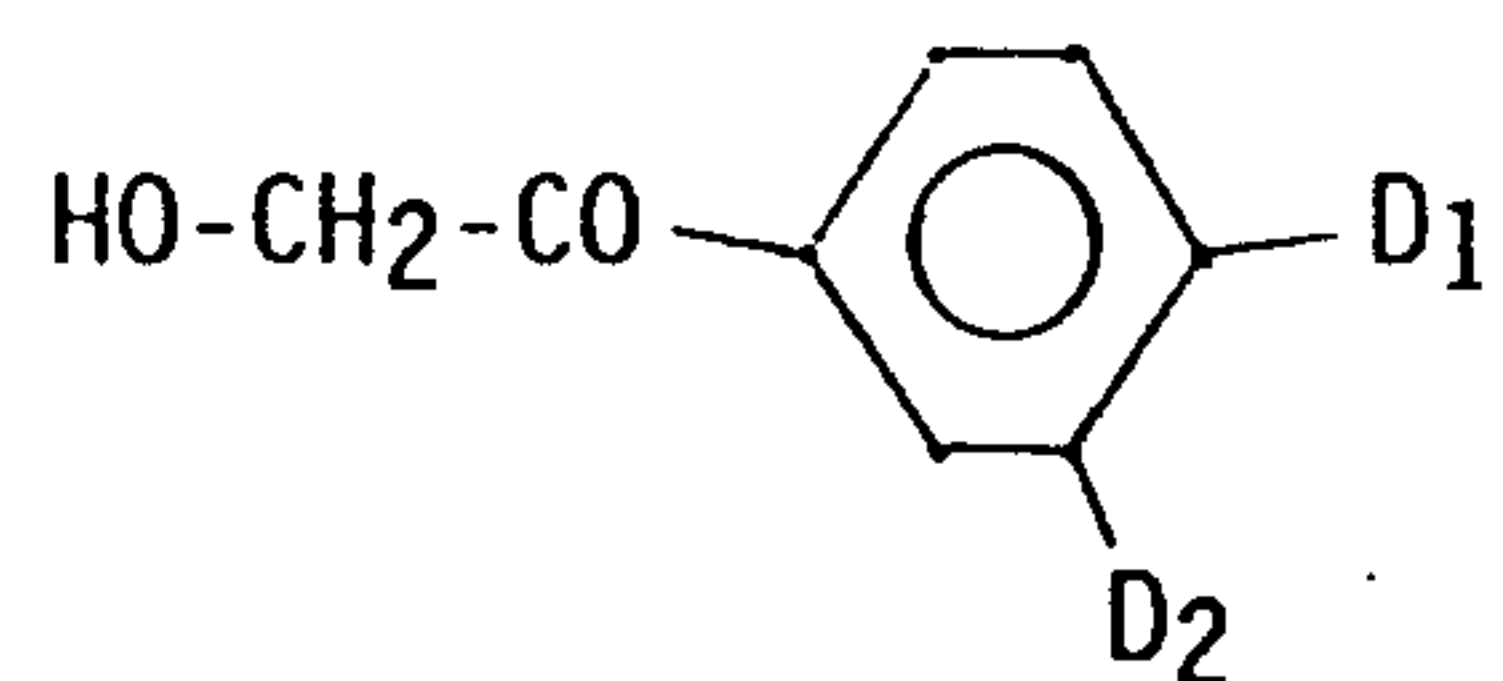


dans laquelle :

- D₁ et D₂ représentent chacun un groupe identique ou différent choisi parmi les radicaux ou atomes O ; CO ; CH₂O ; CH₂CO ; OCO
- D₁ ou D₂ représente H ;

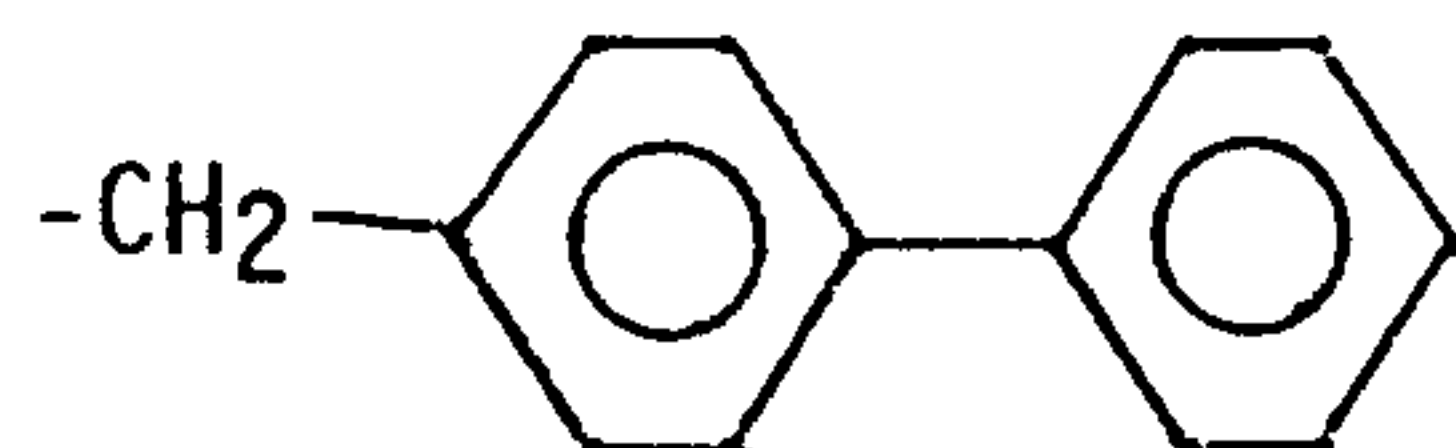
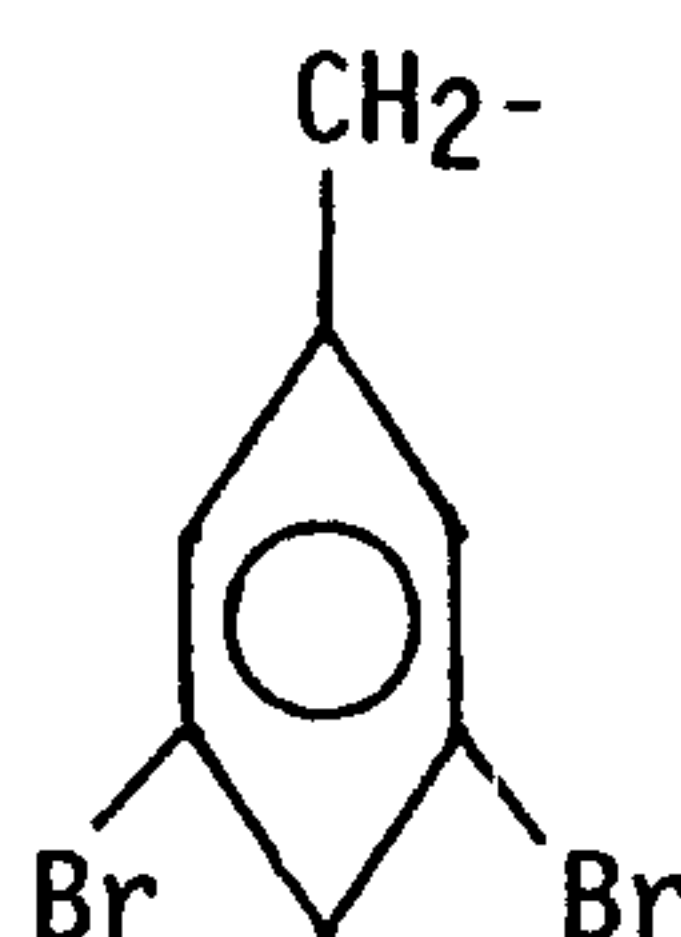
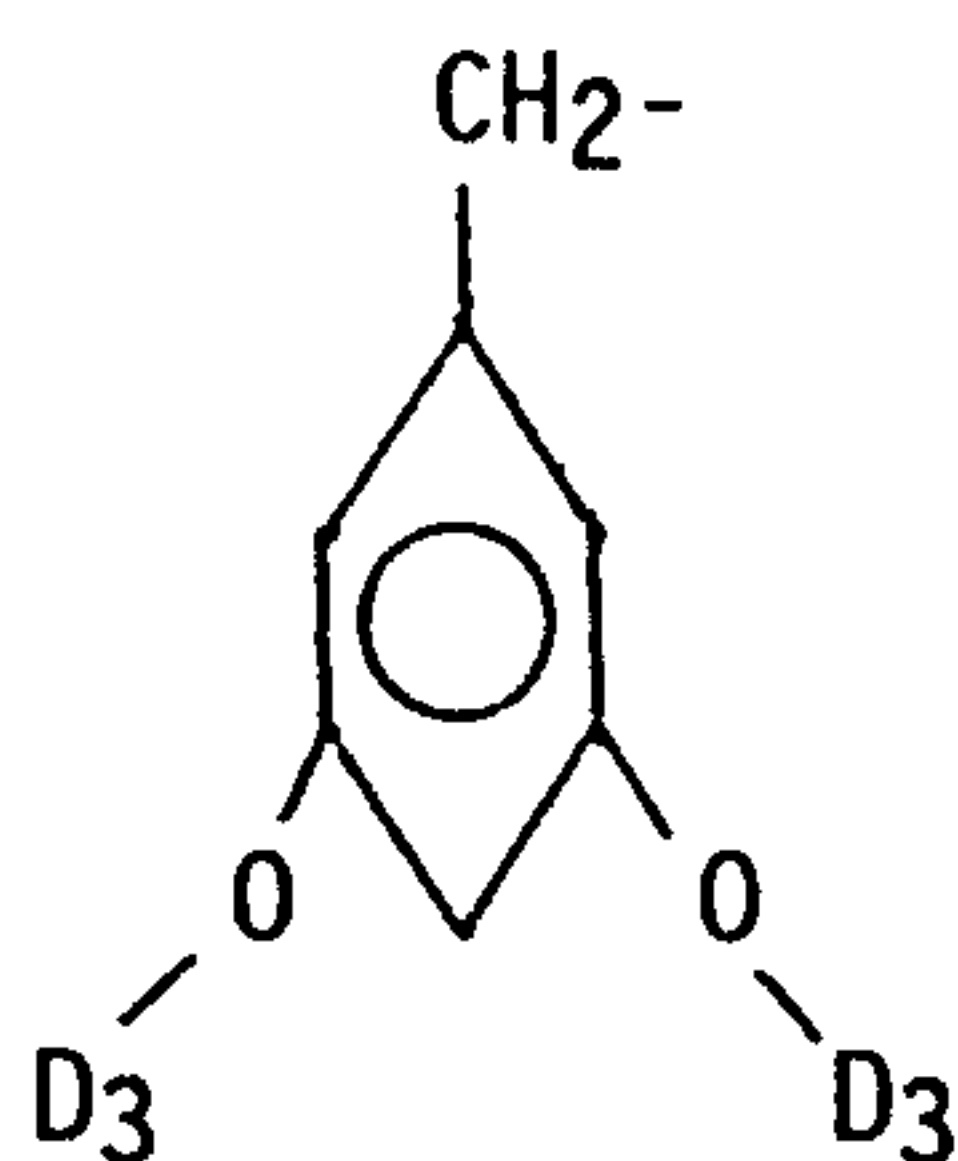
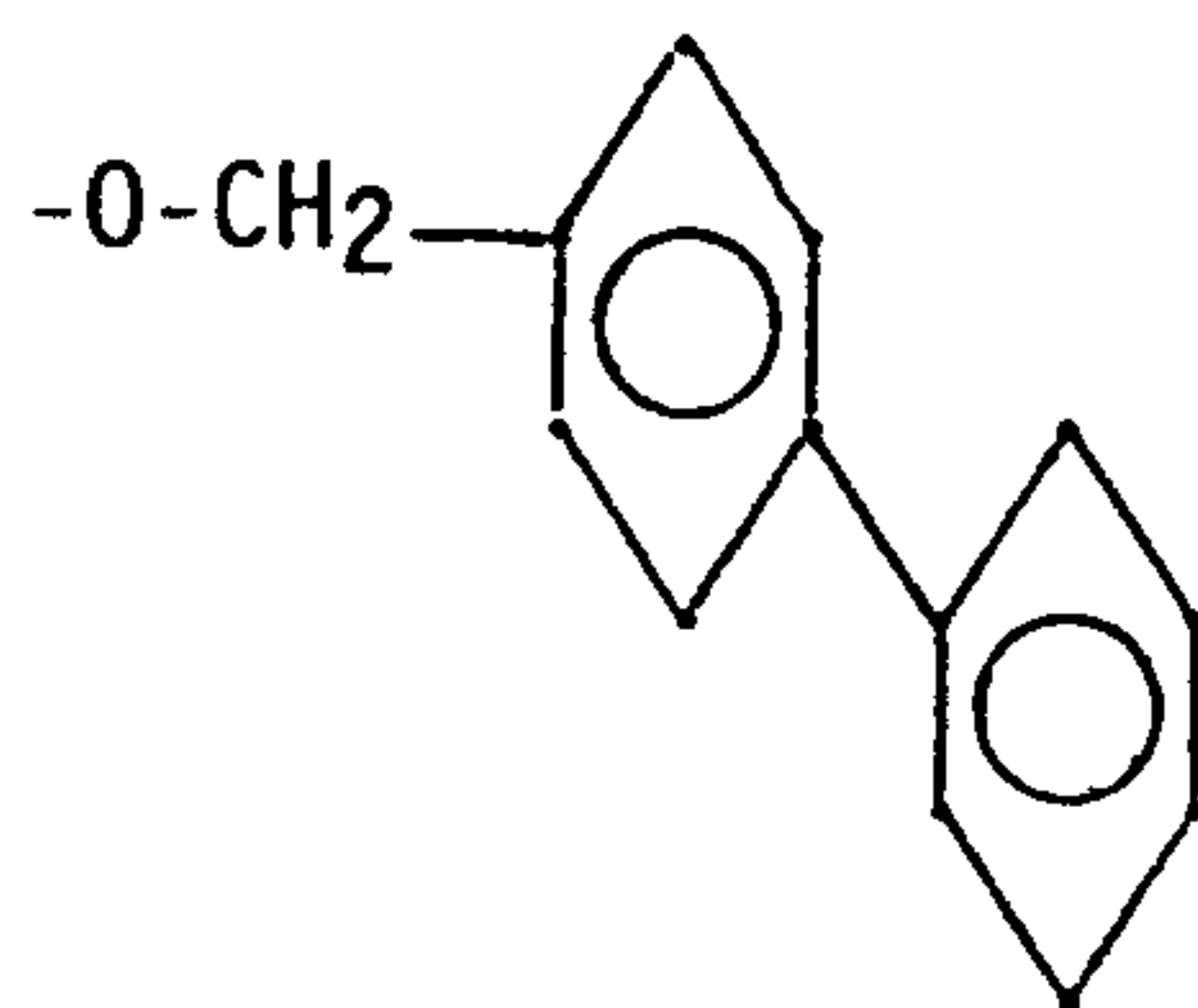


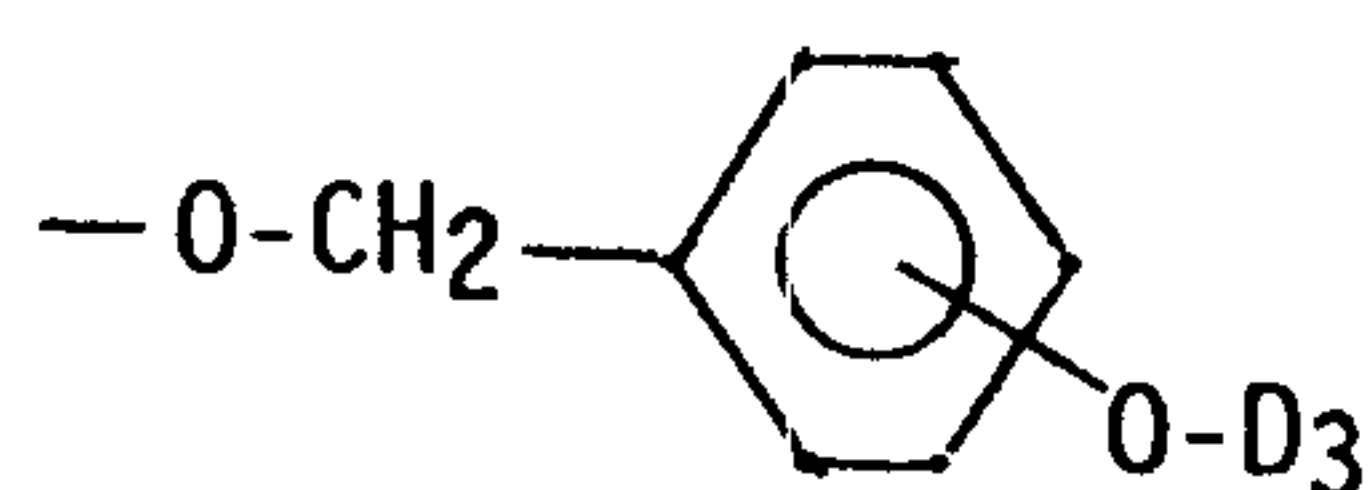
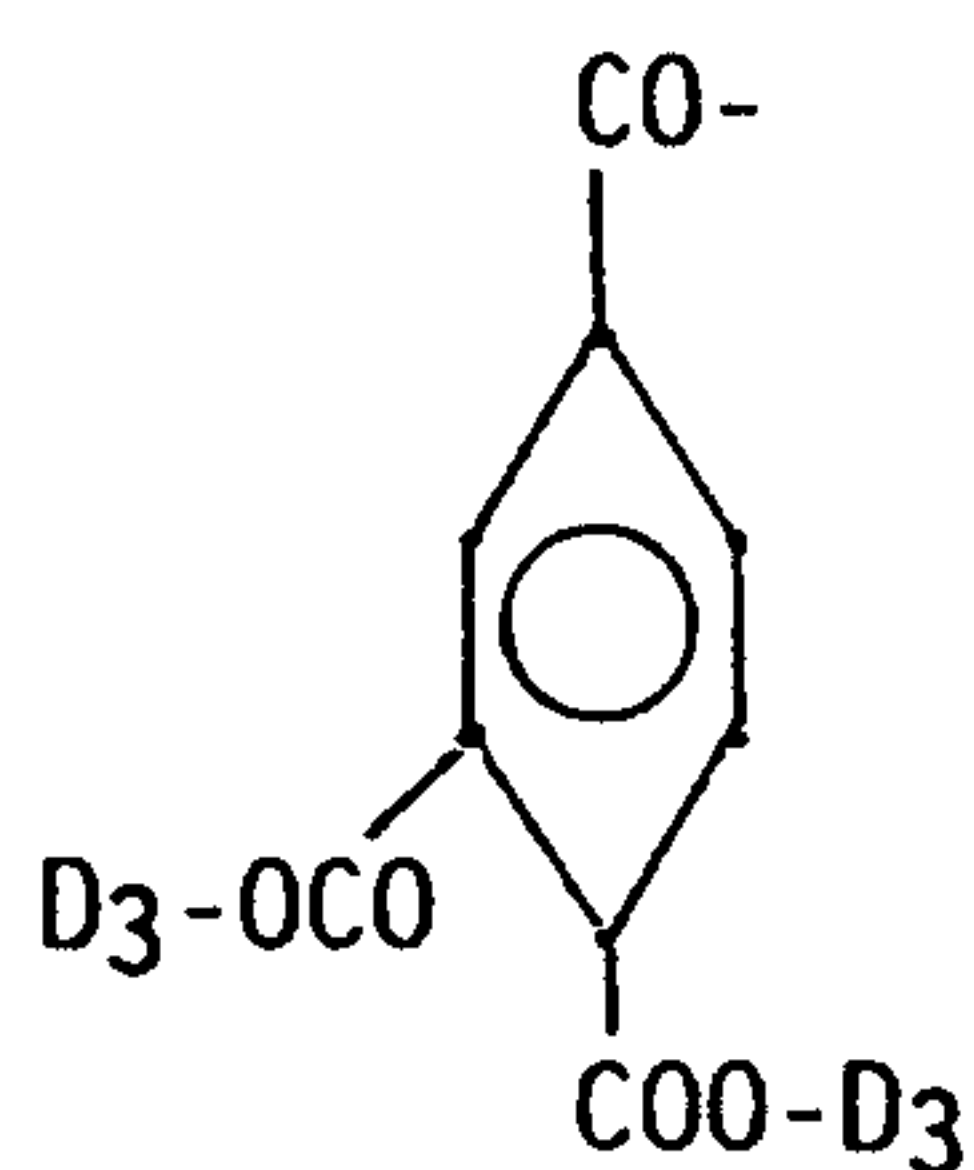
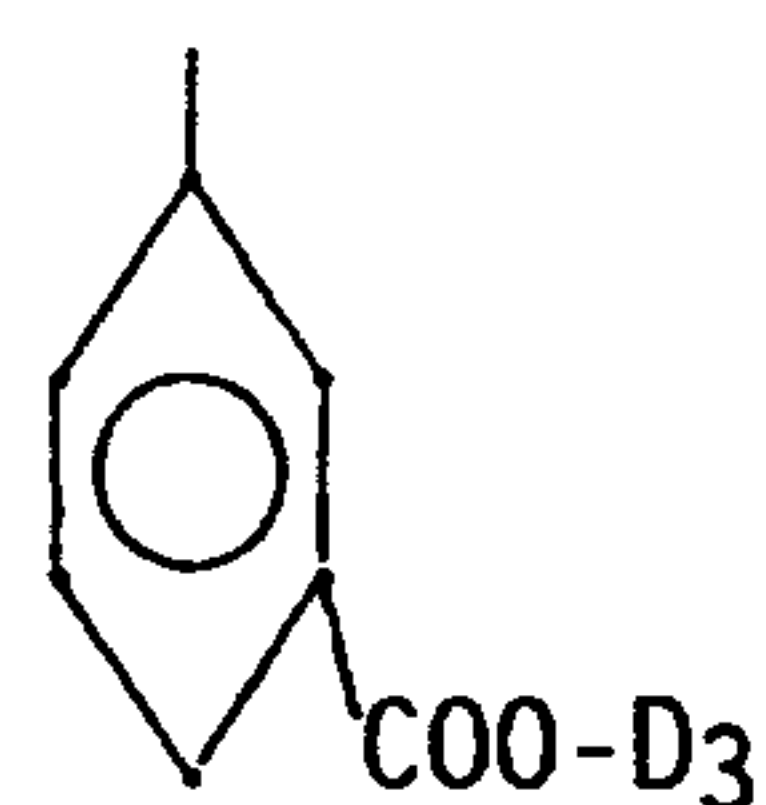
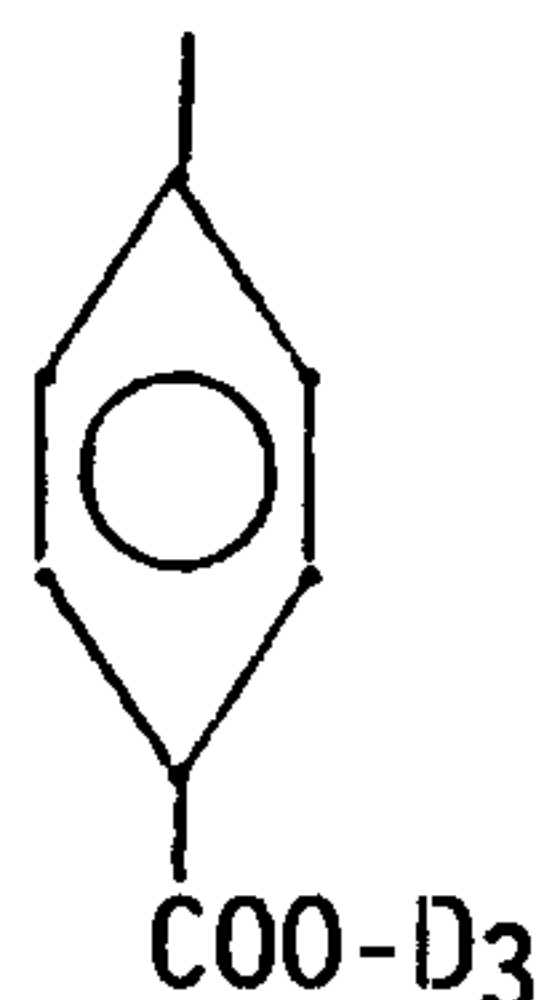
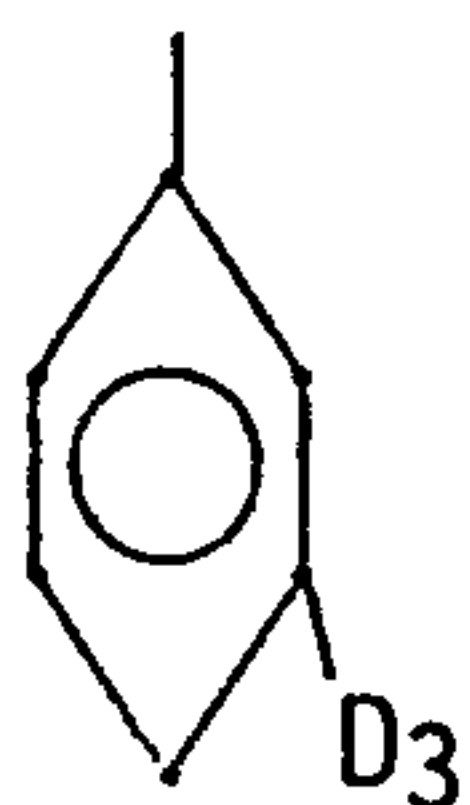
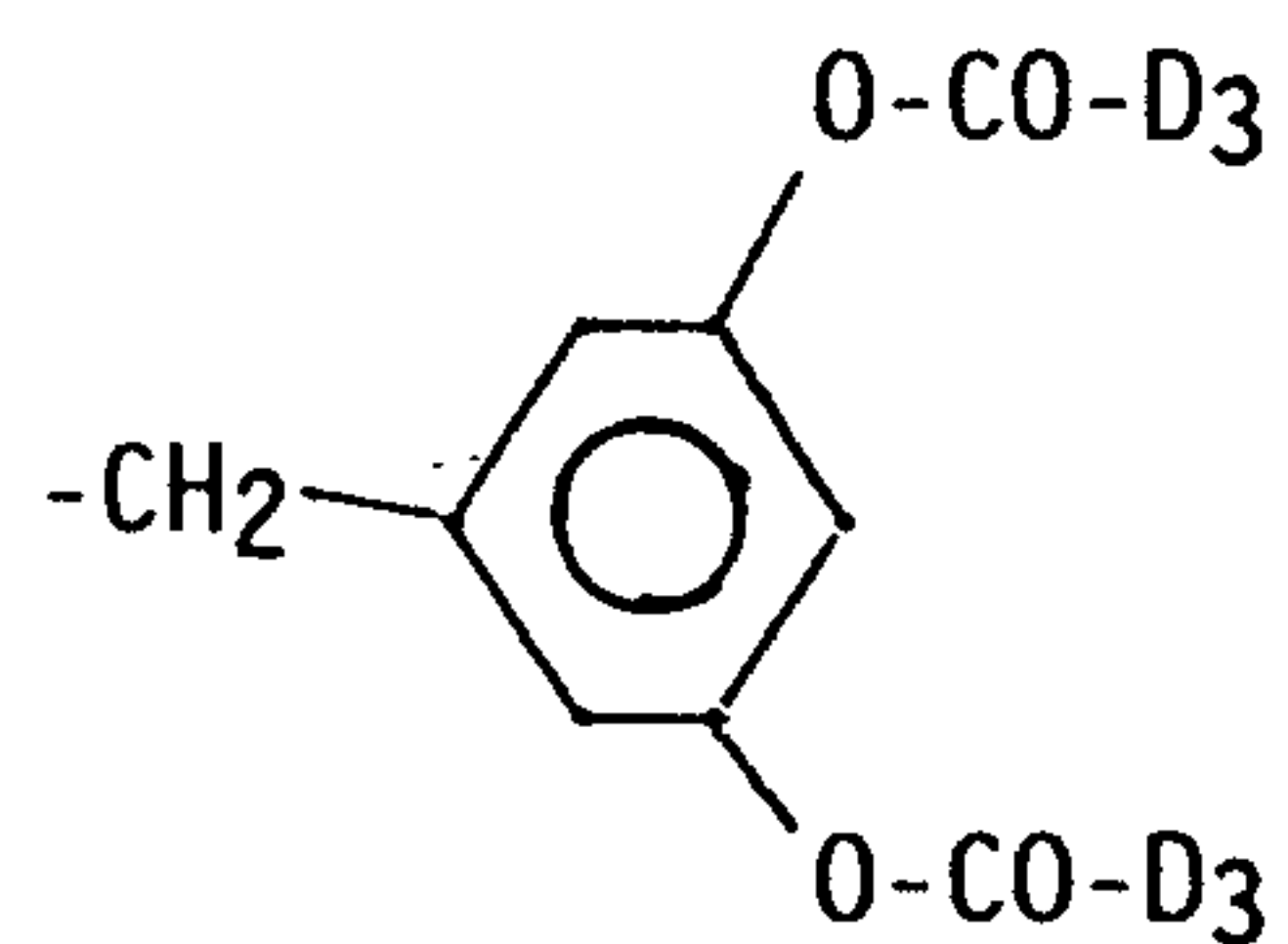
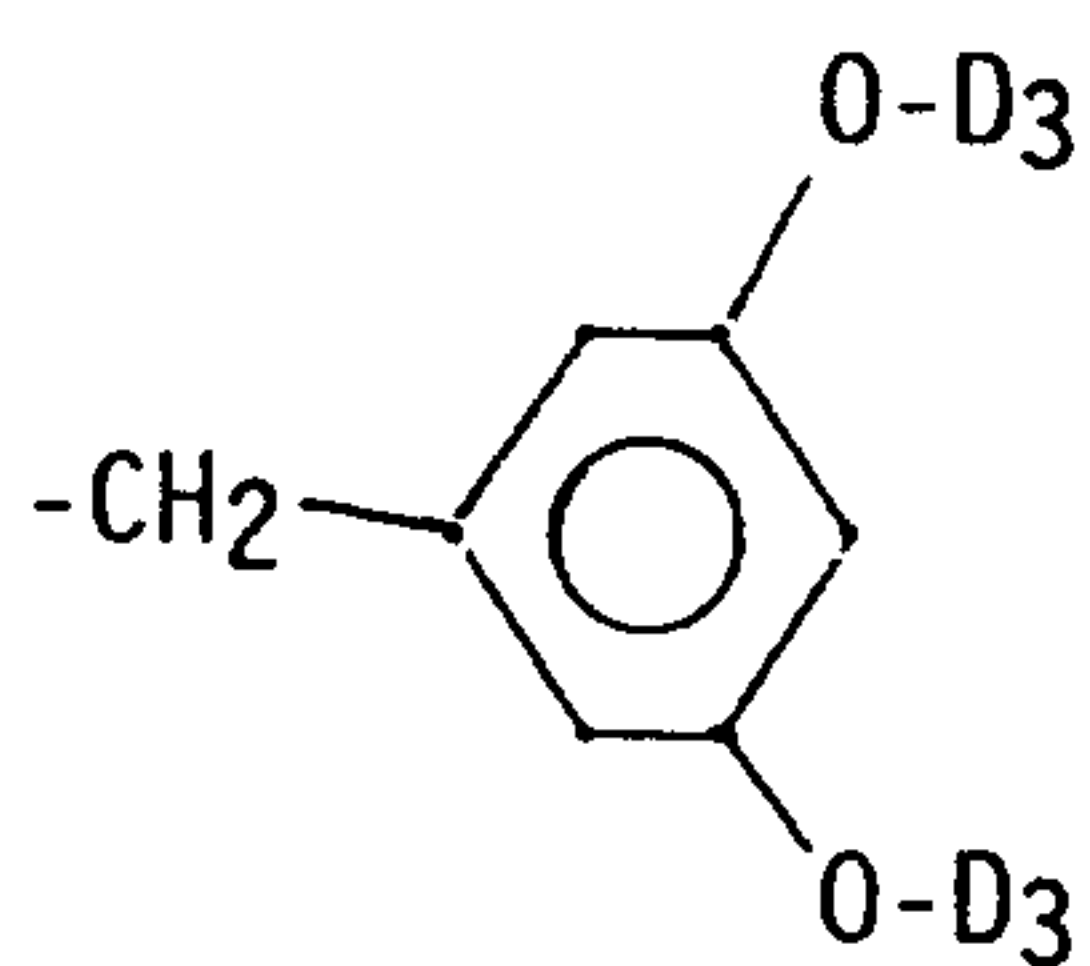
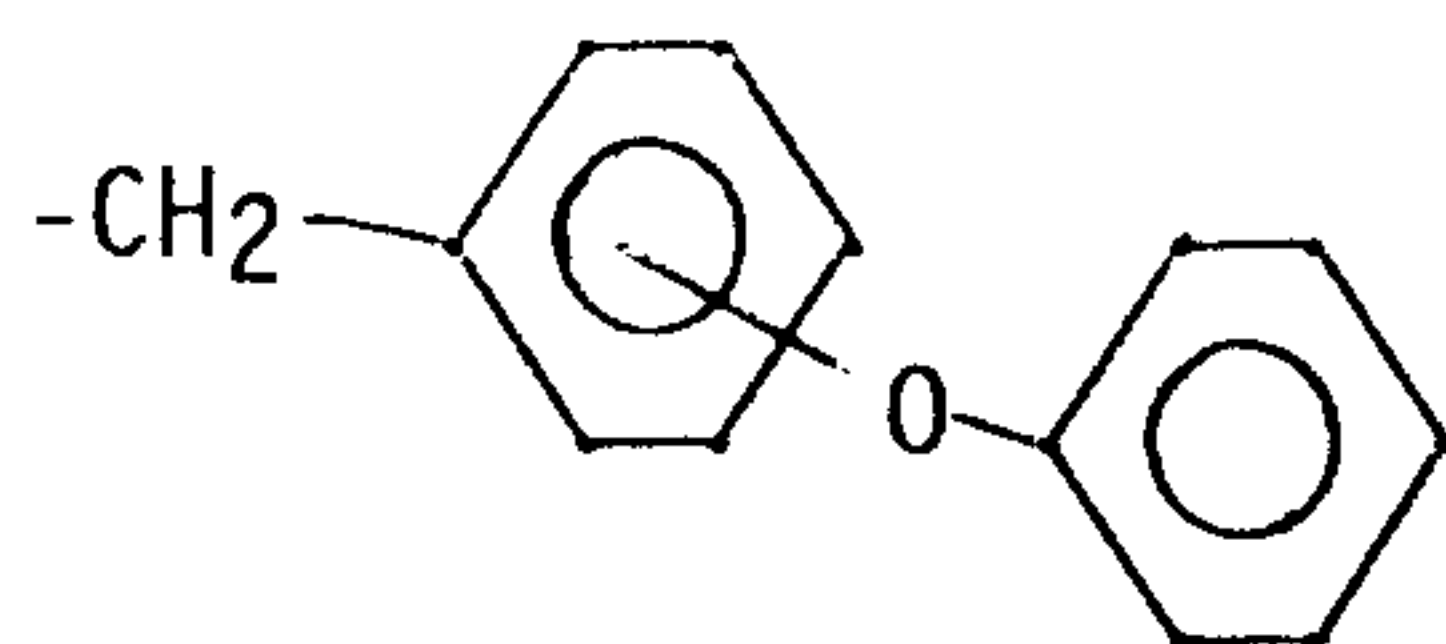
dans laquelle D₁ et D₂ ont les mêmes significations que précédemment ;



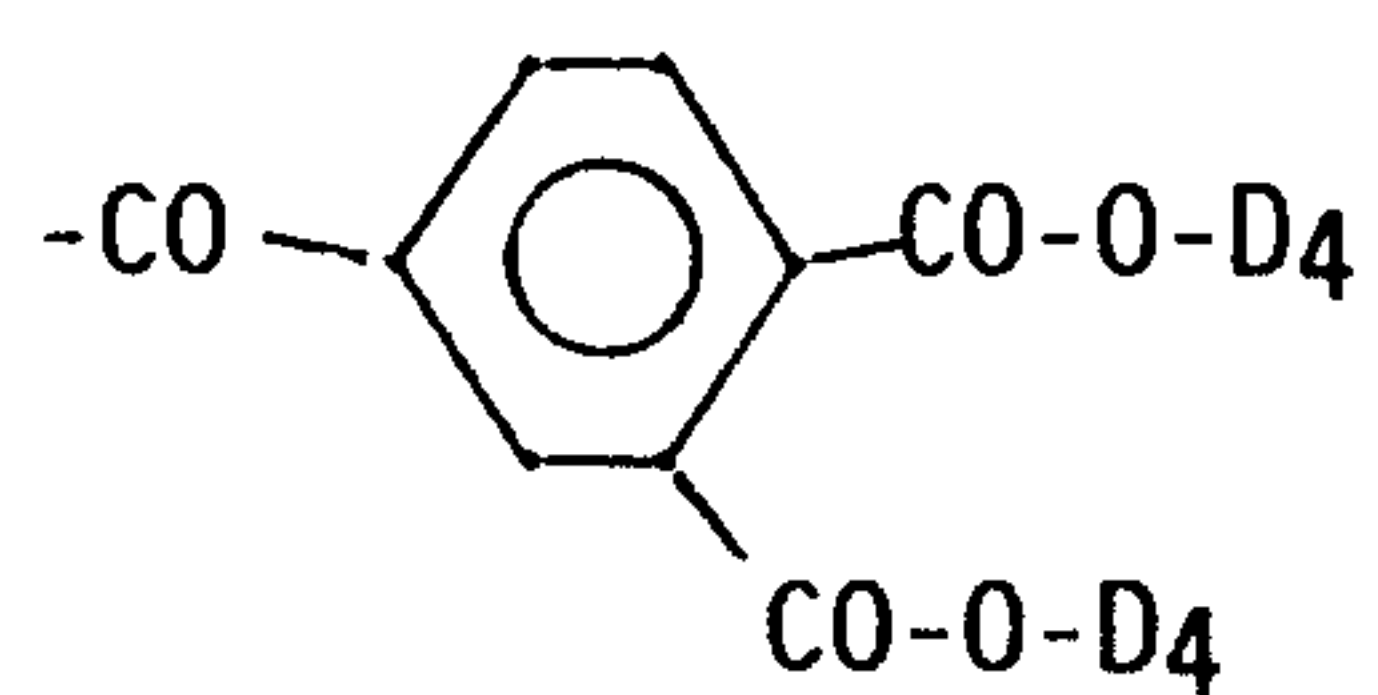
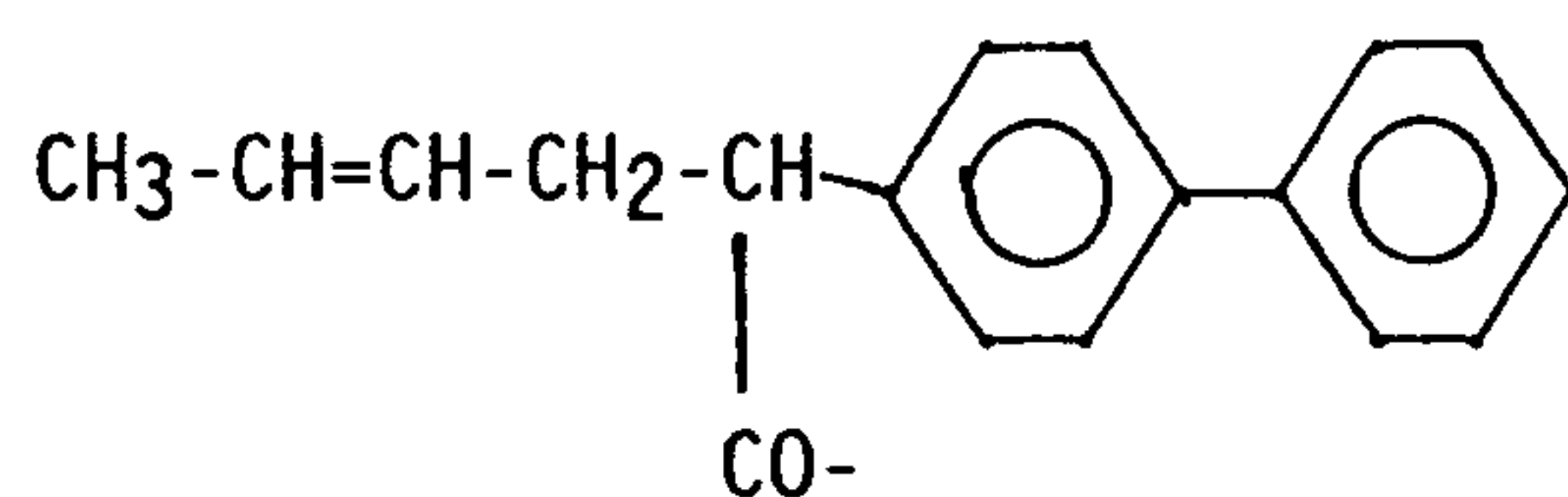
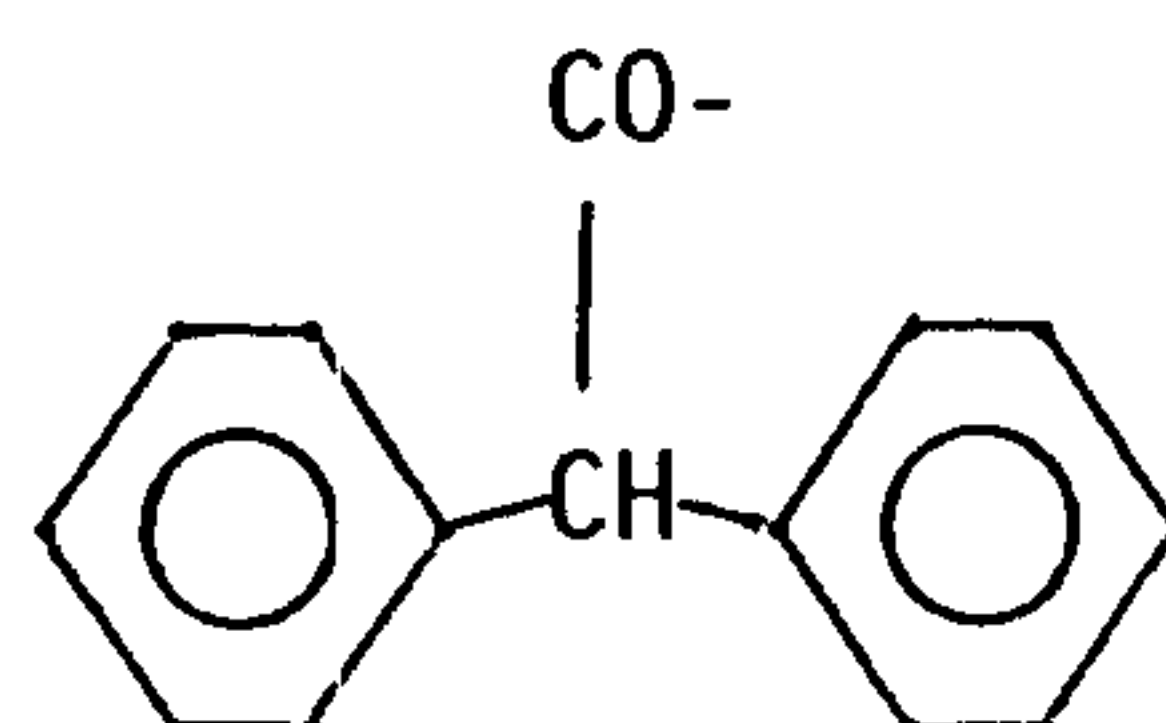
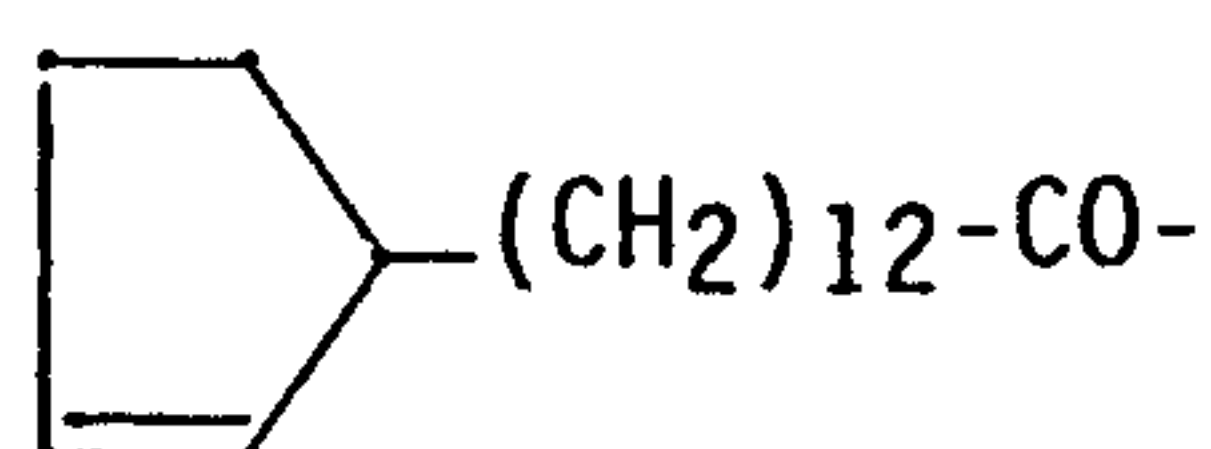
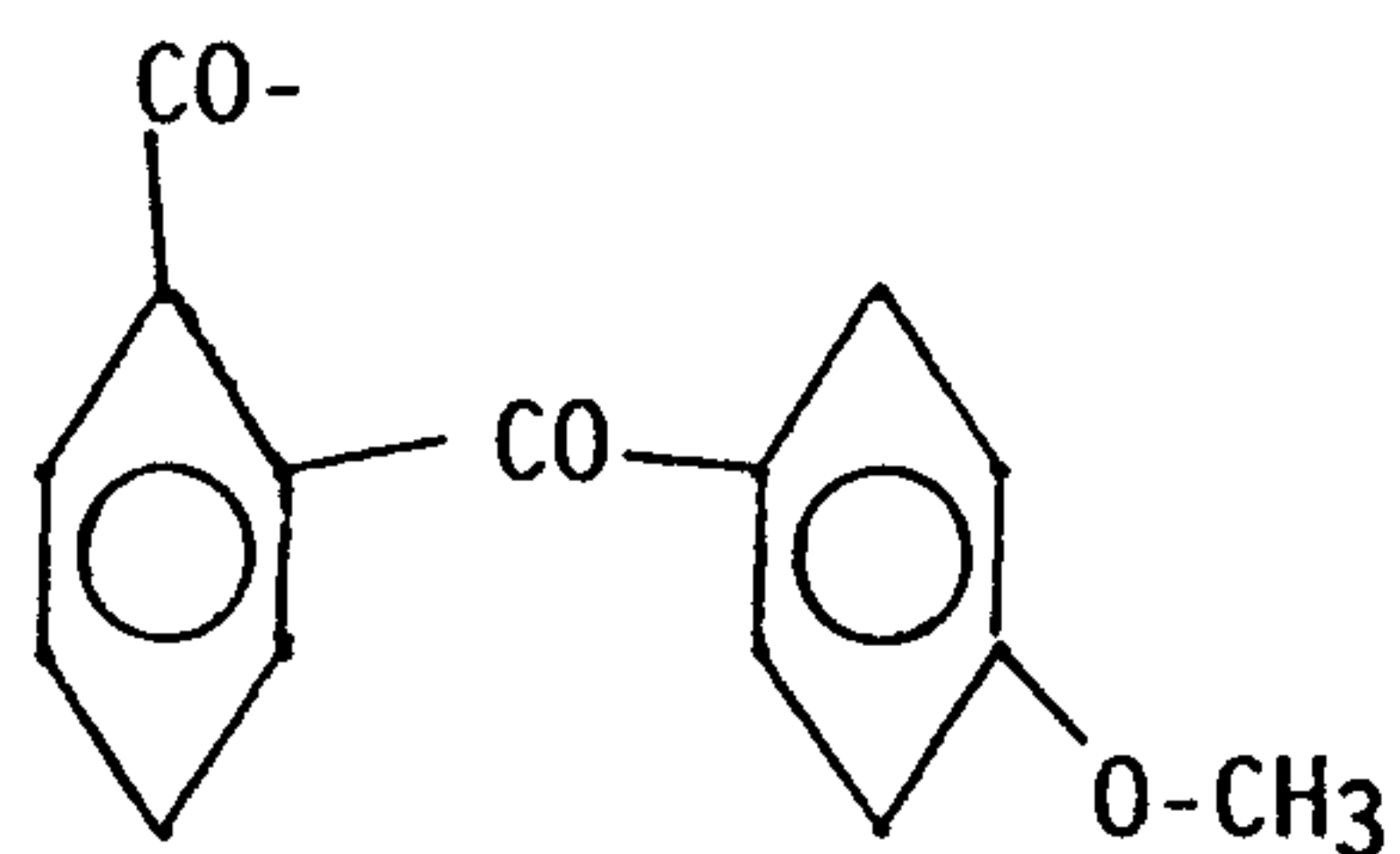
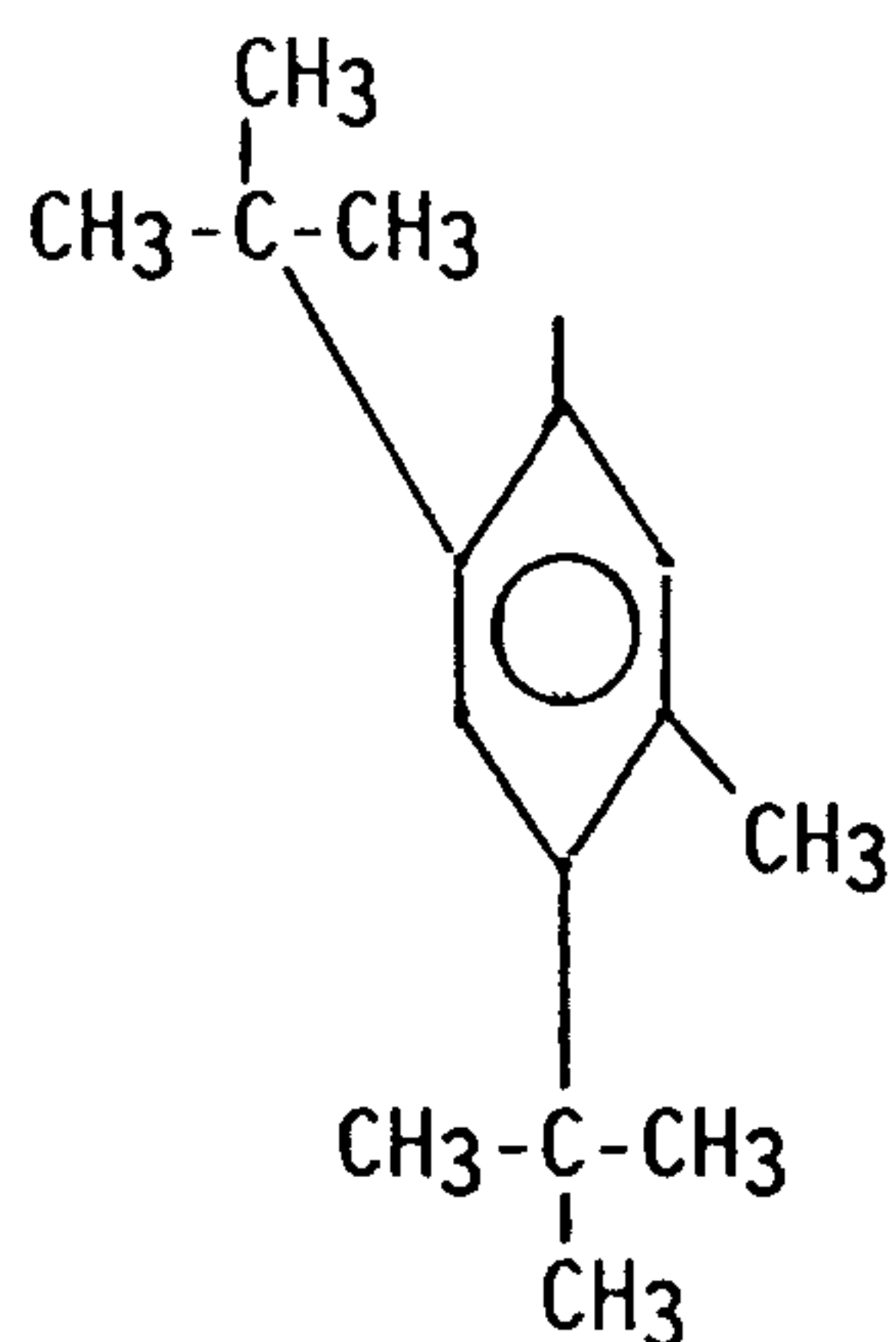
dans laquelle D₁ et D₂ ont les mêmes significations que précédemment.

On peut citer parmi les groupes lipophiles - L les groupes de formules suivantes :

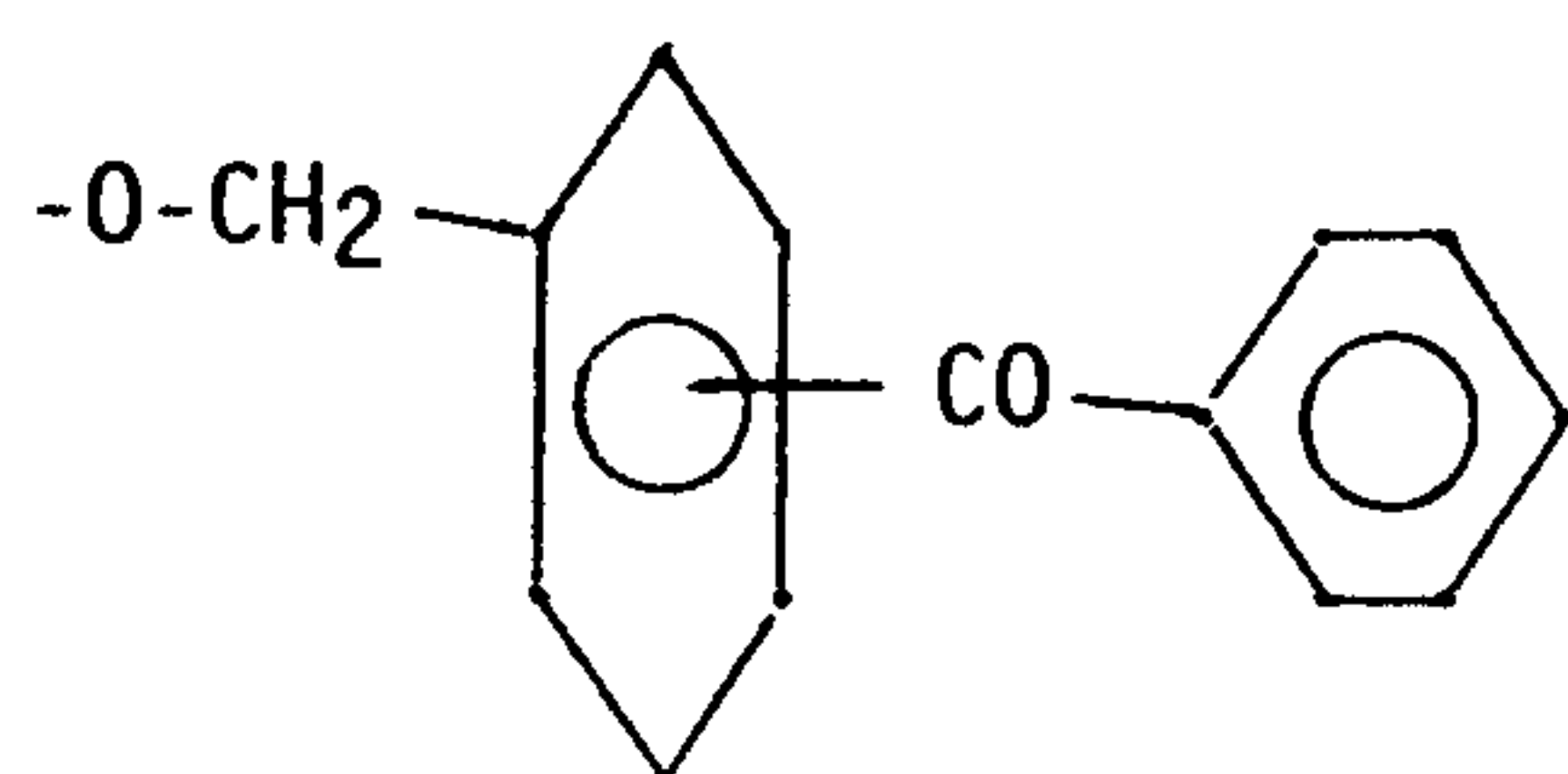
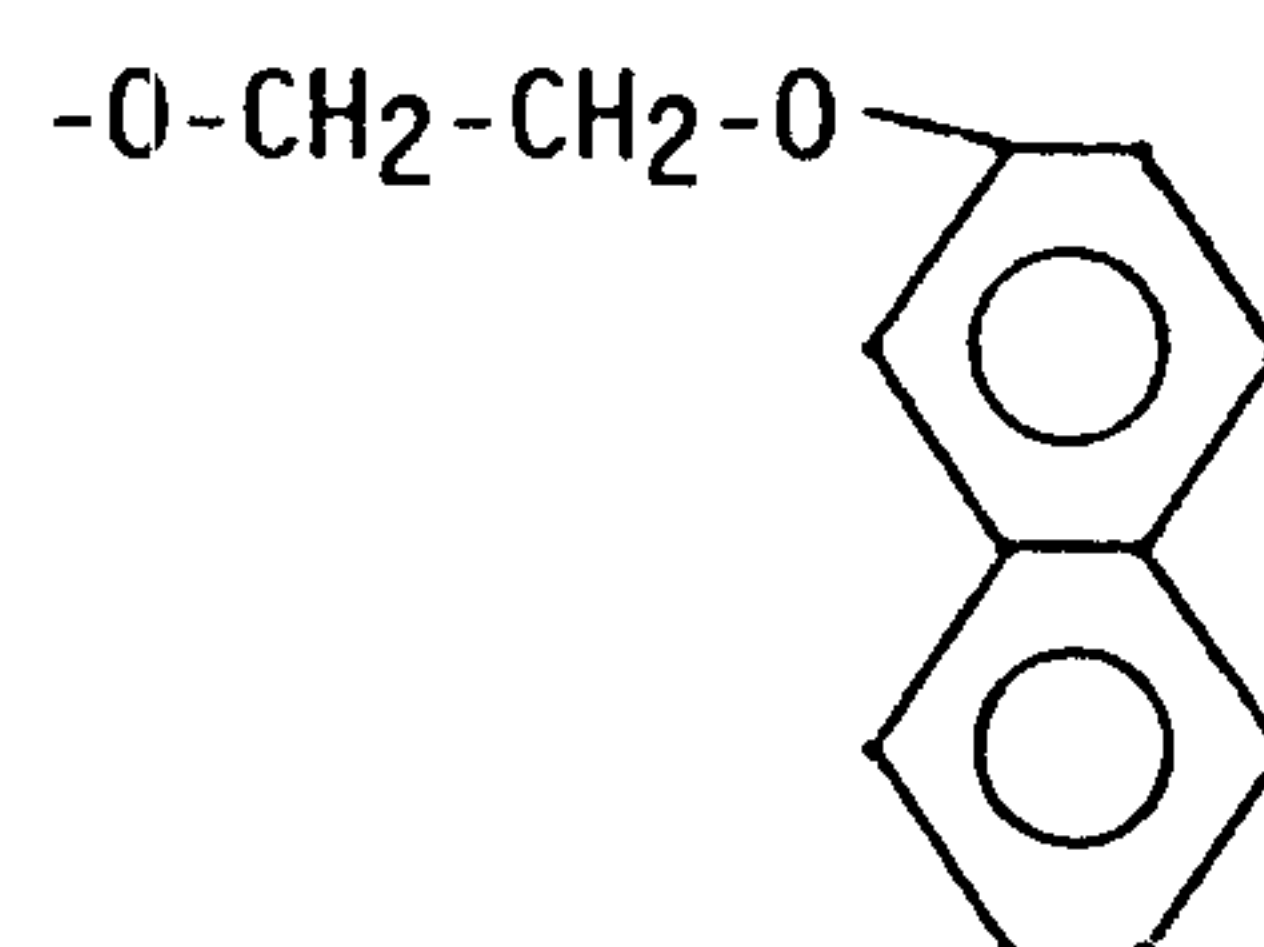
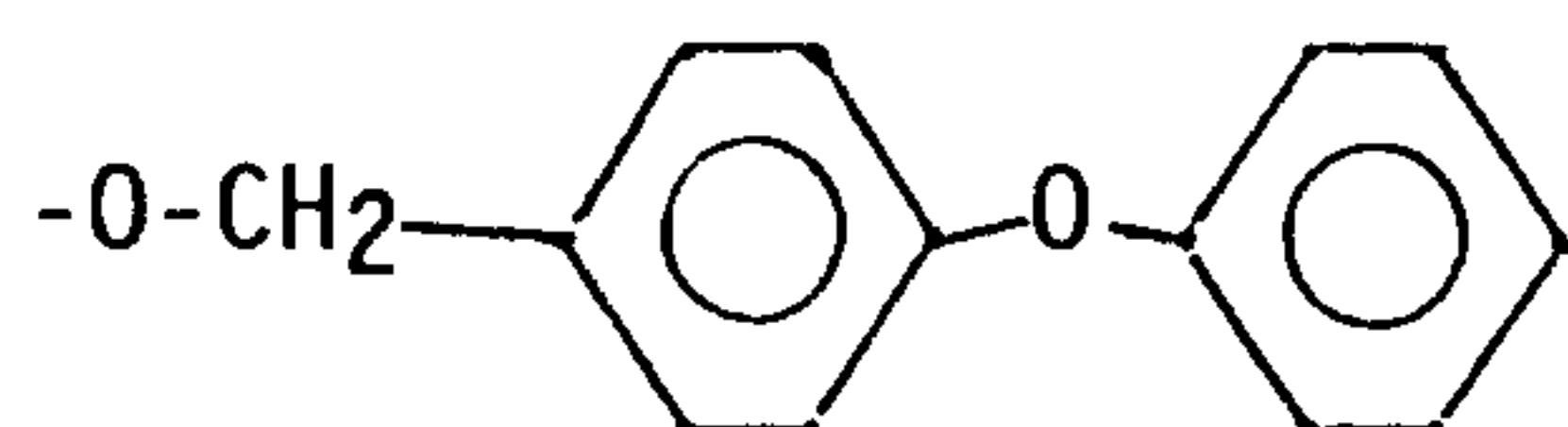
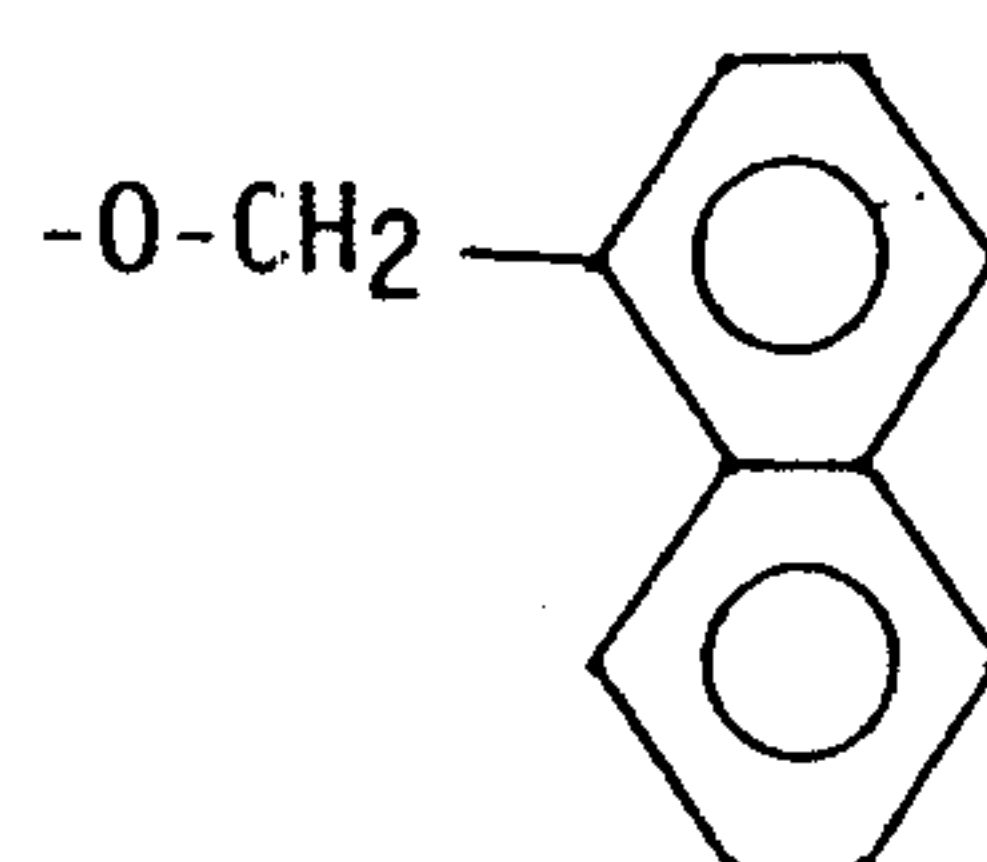
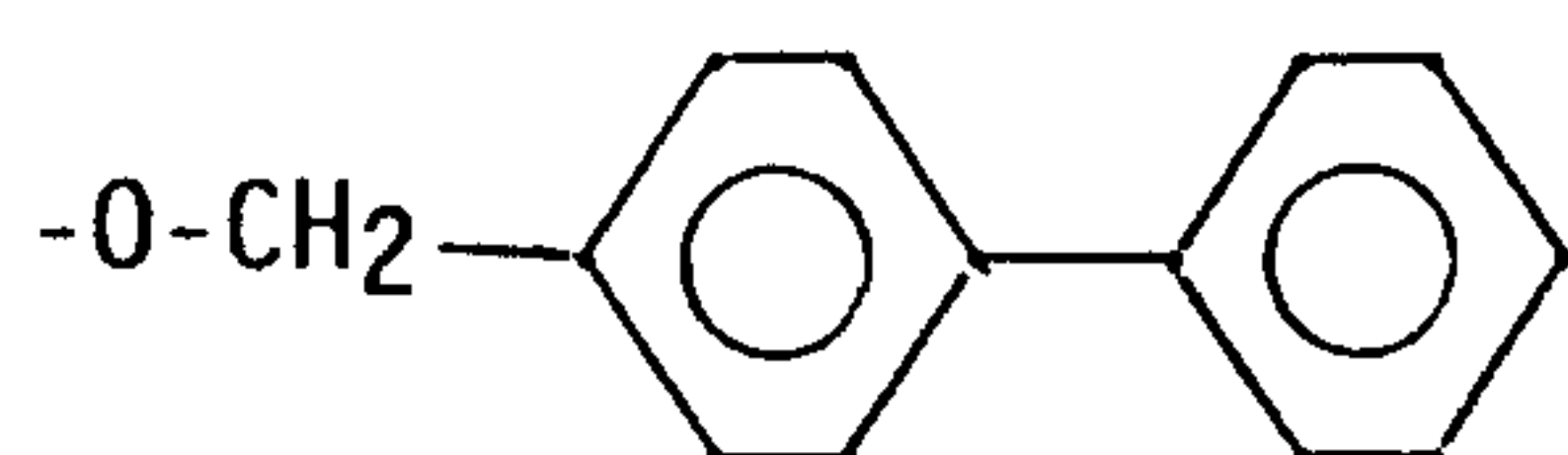
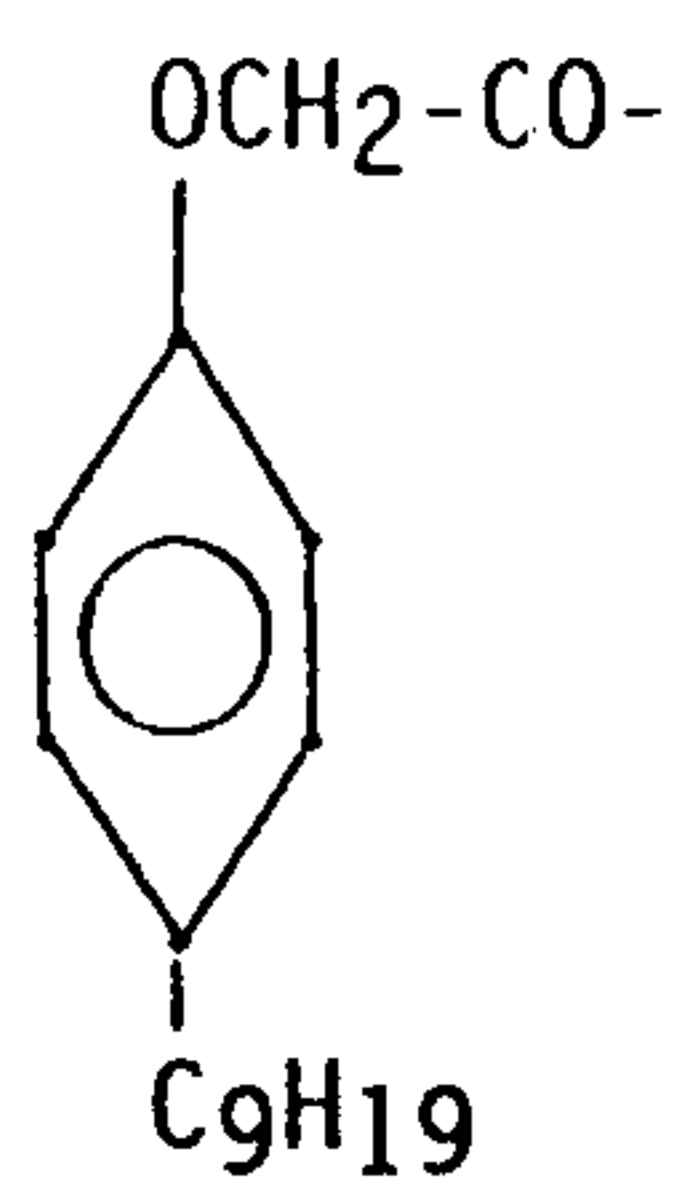
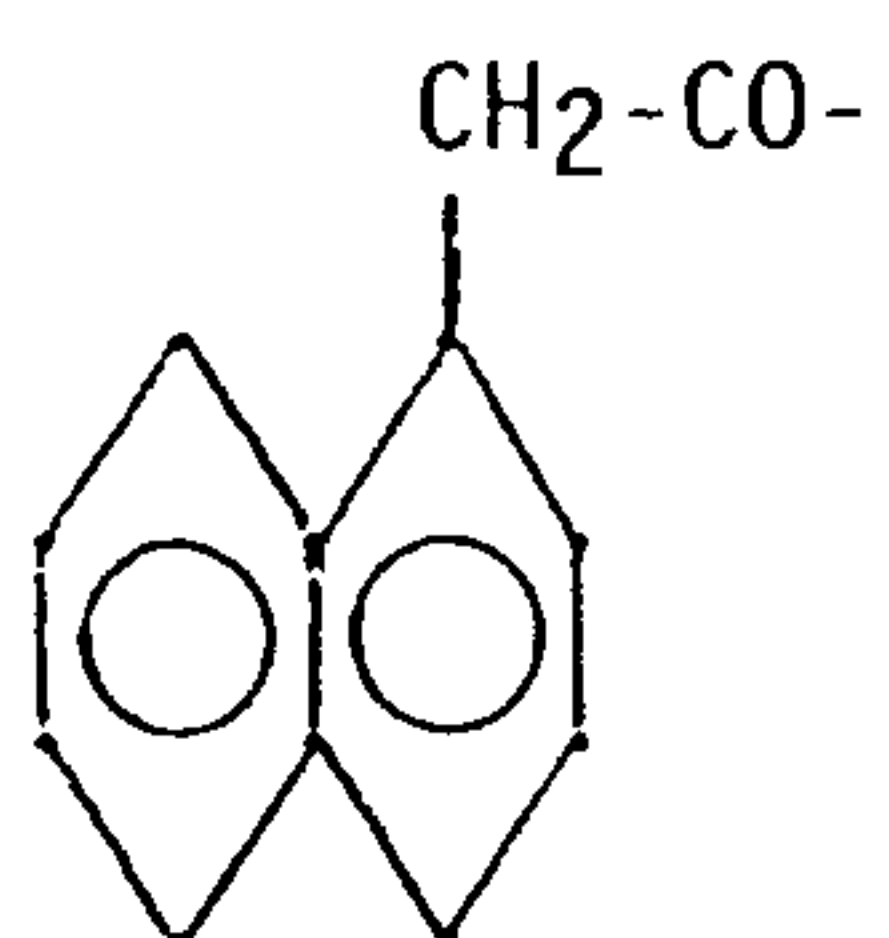




dans lesquelles D_3 représente un radical alkyle ayant 1 à 12 atomes de carbone ;



dans laquelle D₄ représente un groupe aryle ou aralkyle ;



Les solvants dans lesquels les peptides sont solubilisés grâce à leur liaison au groupe lipophile sont des solvants organiques non miscibles à l'eau, tels que les dérivés aliphatiques halogénés en particulier le chlorure de méthylène, les dérivés aromatiques tels que
05 l'anisole ou le chlorobenzène, les esters tels que l'acétate d'éthyle.

Le procédé de solubilisation permet d'augmenter notablement la solubilité des peptides en phase organique. Il permet par exemple d'obtenir des solutions homogènes de concentration supérieure ou égale à 50 g/litre.

10 Un autre avantage du présent procédé provient de ce que les peptides liés aux groupements A - L définis précédemment ont un coefficient de partage élevé en faveur de la phase organique lors de la décantation en présence d'eau.

Cette propriété peut être mise à profit pour purifier les
15 peptides par des lavages aqueux.

La présente invention concerne aussi un procédé de synthèse de peptides éventuellement protégés, en milieu liquide, caractérisé en ce que l'on part d'un aminoacide ou d'un peptide solubilisé en milieu organique par un groupe A - L tel que défini précédemment, lié à la
20 fonction carboxylique de l'acide ou du peptide de départ et que l'on ajoute les aminoacides ou les peptides à condenser activés sur leur fonction acide et protégés sur leur fonction amine et éventuellement sur leur chaîne latérale.

La protection de la fonction amine des aminoacides peut
25 s'effectuer par remplacement d'un atome d'hydrogène de cette fonction par un groupe tel que le tertibutyloxycarbonyle ou par la formation de sels de DANE, par exemple par réaction de la fonction amine avec un composé bêta-dicarbonylé.

L'activation du peptide ou de l'acide N-protégé est
30 réalisée par formation, soit d'un anhydride mixte au moyen d'un chlorure d'acide, soit d'un anhydride mixte au moyen de chloroformiate d'alkyle, soit d'un anhydride symétrique au moyen d'un carbodiimide, soit d'un ester activé selon une technique classique de synthèse, soit
35 par toute autre technique d'activation d'un aminoacide N-protégé.

Un avantage du présent procédé est qu'il permet une synthèse productive et répétitive, en milieu organique, où le peptide lié à la molécule lipophile A - L définie précédemment, est toujours maintenu en solution. Chaque intermédiaire peptide-A - L, N-protégé ou non est
05 maintenu soluble dans le milieu organique.

Un autre avantage important du procédé est qu'il permet d'éliminer de la phase organique les réactifs en excès et les co-produits de la synthèse, par simple lavage à l'eau :

- après l'étape de condensation, les produits tels que les
10 excès d'acides aminés ou de peptides activés, les sels, les acides ou alcools ou tous les autres co-produits de la réaction qui ne sont pas liés à la chaîne peptidique synthétisée ;
- après l'étape de déprotection, les agents de déblocage des
15 fonctions désirées et les co-produits de la réaction de coupure du groupe N-protecteur.

Ce procédé évite ainsi toutes les étapes de purification par précipitation nécessaires dans l'art antérieur.

Le suivi de la pureté du peptide en cours de synthèse est
20 possible à tout moment, par simple prélèvement et analyse par toute technique telle que la chromatographie liquide haute performance, la résonance magnétique nucléaire du proton ou du carbone, la potentiométrie, la spectrométrie de masse ...

Du fait de la similitude des opérations de condensation et de
25 déprotection, lors de l'addition de chacun des acides aminés, le procédé de la présente invention permet la synthèse des peptides selon un mode opératoire répétitif.

Du fait de la répétitivité de la synthèse, le procédé peut être avantageusement mis en oeuvre sous une forme automatisée.

30 Enfin, lorsque la synthèse de la séquence initiale du peptide est terminée, le peptide est libéré de ses groupes protecteurs et du groupe solubilisant A - L par hydrolyse, hydrogénolyse ou par toute autre méthode de déprotection utilisée en synthèse peptidique.

Ce procédé est particulier intéressant pour la synthèse de peptides hydrophiles ou porteurs de groupes hydrophiles, comme par exemple ceux qui comportent dans leur chaîne les acides aminés suivants : l'arginine, la glutamine, l'asparagine, la sérine, la
05 thréonine, la glycine.

Les peptides issus de la synthèse sont utilisés éventuellement pour la synthèse de médicaments, vaccins, produits agro-alimentaires ou phytosanitaires.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide
10 des exemples suivants qui ne doivent pas être considérés comme limitatifs de l'invention.

I - SYNTHESE DES REACTIFS PERMETTANT D'OBTENIR LES GROUPES
15 SOLUBILISANTS A-L

EXEMPLE 1 : Préparation du chlorométhyl-3 benzoate de phényl-4 benzyle
Dans un ballon tricol de 500 cm³, on introduit
successivement :

- 20 - 40 g (0,217 mol) de biphénylméthanol
- 150 cm³ de toluène
- 42,9 g (0,227 mol) de chlorure de chlorométhyl-3 benzoyle.
Le mélange est agité et chauffé à 40°C.
On ajoute alors en 10 minutes 25 cm³ de N-méthylmorpholine
25 (0,227 mol).

La température du milieu réactionnel s'élève spontanément à 60°C, puis on le chauffe à 80°C pendant 2 heures 30 minutes.

Le mélange réactionnel final est versé dans une ampoule à décanter, dilué à 1 litre par addition d'acétate d'éthyle, puis lavé
30 successivement par 450 cm³ d'acide chlorhydrique normal, 400 cm³ d'une solution aqueuse normale d'hydrogénocarbonate de sodium, puis par de l'eau jusqu'à neutralité.

La distillation des solvants conduit à un résidu solide qui
35 est cristallisé de chaud à froid dans 1,6 litre de méthanol.

Le chlorométhyl-3 benzoate de phényl-4 benzyle est obtenu avec un rendement de 81 % (59,5 g), sous la forme d'un solide blanc ayant un point de fusion de 102°C.

05 Sa structure a été établie par spectrométrie de masse et de RMN du proton (360 MHz).

L'analyse par chromatographie en couche mince (CCM) sur plaque de silice Merck*60F 254 révèle une seule tache dans chacun des deux systèmes d'éluants essayés :

10 acétate d'éthyle/cyclohexane (2/5) $R_f = 0,7$
hexane/acétone (4/1) $R_f = 0,6$.

EXEMPLES 2 à 14

En opérant selon le même mode opératoire que dans l'exemple 1, on prépare les composés suivants.

15

Exemple 2

Chlorométhyl-3 benzoate de phénoxy-3 benzyle

Aspect : huile

Rendement : 94 %

20

Exemple 3

Chlorométhyl-3 benzoate de méthylène-9 anthracyle

Aspect : solide ayant un point de fusion de 148°C
(recristallisation dans le méthanol)

25

Rendement : 82 %

Exemple 4

Bromométhyl-3 benzoate de phényl-4 benzyle

Aspect : solide ayant un point de fusion de 63-65°C

30

Rendement : 26 %

35

* (marque de commerce)

Exemple 5

Chlorométhyl-3 benzoate de tertiobutyl-4 benzyle

Aspect : huile

Rendement : 47 %

05

Exemple 6

Chlorométhyl-3 benzoate de dichloro-2,4 benzyle

Aspect : solide ayant un point de fusion de 75°C

(recristallisation dans acétone + eau)

10

Rendement : 75 %

Exemple 7

Chlorométhyl-3 benzoate de cholestéryle

Aspect : solide ayant un point de fusion de 122°C

15

(recristallisation dans dichlorométhane + méthanol)

Rendement : 78 %

Exemple 8

Chlorométhyl-3 benzoate de phytyle

20

Aspect : huile

Rendement : 53 %

Exemple 9

Chlorométhyl-3 benzoate d'heptafluoro-2,2,3,3,4,4,4 butyle

25

Aspect : huile

Rendement : 79 %

Exemple 10

Chlorométhyl-3 benzoate de

30

pentadécafluoro-2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8

octyle

Aspect : huile

Rendement : 81 %

35

Exemple 11

Chloroacétate de cholestéryle

Aspect : cristaux

Rendement : 72 %

05

Exemple 12

Chloroacétate d'heptafluoro-2,2,3,3,4,4,4 butyle

Aspect : liquide de point d'ébullition 80°C (sous 2660 Pa)

Rendement : 20 %

10

Exemple 13

Chloroacétate de pentadécafluoro-2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8 octyle

Aspect : huile

Rendement : 72 %

15

Exemple 14

Chloroacétate de (dichloro-3',5' phénoxy)-4 benzyle

Aspect : huile

Rendement : 97 %

20

II - SYNTHÈSE DE DIFFÉRENTS AMINOACYL-A-L OU PEPTIDE-A-L N-PROTÉGÉSExemple 15

- 25 Synthèse de l'ester de (méthyl-3 benzoate d'hydroxyméthyl-4 biphényle)
de la N-tertiobutyloxycarbonyl-L-leucine.

Dans un ballon tricol de 500 cm³, on introduit
successivement :

- 30 - 15 g du sel de potassium de la N-tertiobutyloxycarbonyl-
L-leucine (soit 0,056 mole),
- 180 cm³ de DMF sec,

35

- 14,905 g (soit 0,044 mol) de chlorométhyl-3-benzoate d'hydroxyméthyl-4-biphényle en solution dans 100 cm³ de DMF sec et
- 1,5 g de iodure de sodium.

05 Le mélange est porté, sous agitation, à 75°C.
Après 2 heures de réaction, il est ajouté 490 cm³ d'acétate d'éthyle.

La solution organique est lavée par successivement deux fois 100 cm³ d'eau, 200 cm³ d'une solution diluée de KHCO₃ (pH 8,5), 200 cm³
10 d'eau, 200 cm³ d'une solution de KHSO₄ (pH 2), 200 cm³ d'eau.

La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, puis filtrée et évaporée pour donner une huile avec un rendement égal à 100 %.

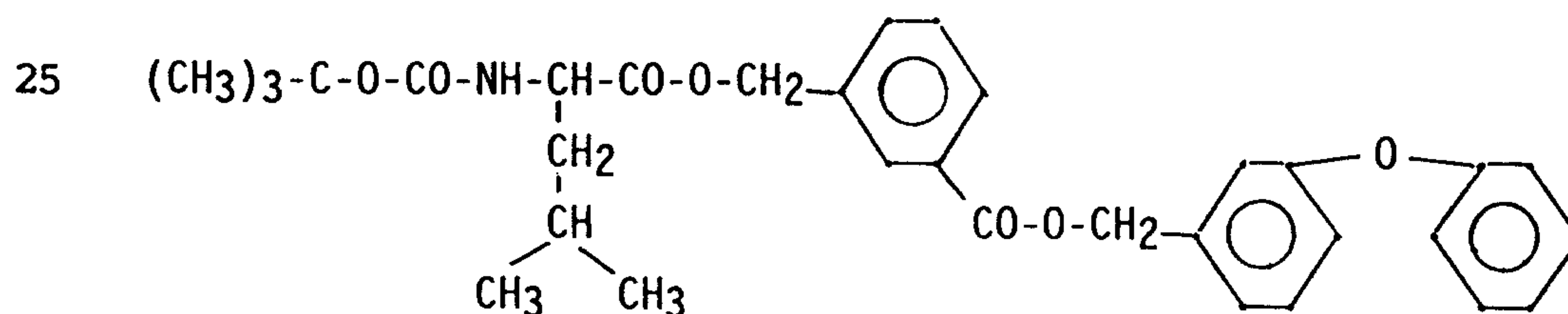
La structure du produit a été confirmée par spectrométrie de masse et par RMN du proton (360 MHz)

15 L'analyse par chromatographie sur couche mince sur plaque de silice révèle une seule tache dans le système d'élution suivant : acétate d'éthyle/hexane (2/5) R_f = 0,66.

EXEMPLES 16 à 22

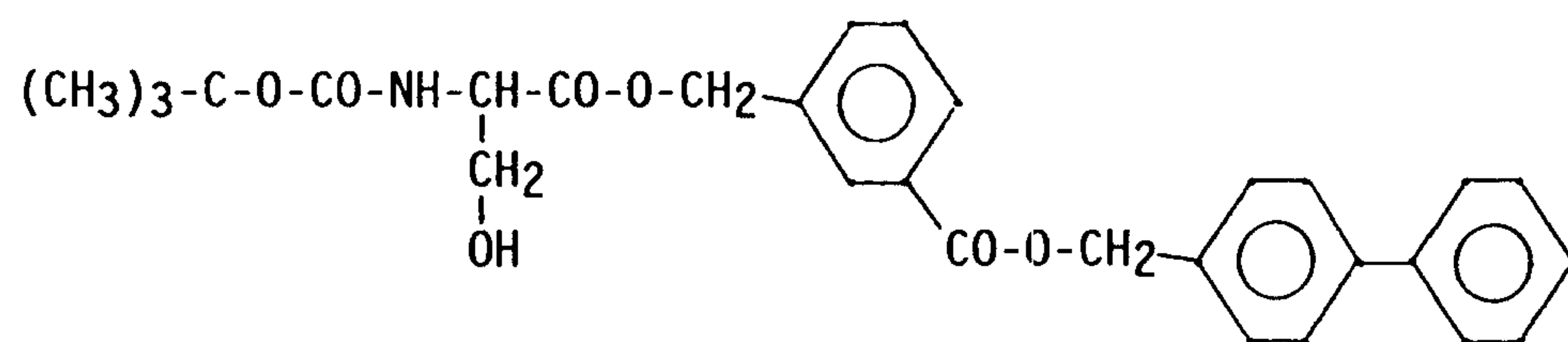
20 En opérant selon le même mode opératoire que dans l'exemple 15, on prépare les composés suivants.

Exemple 16



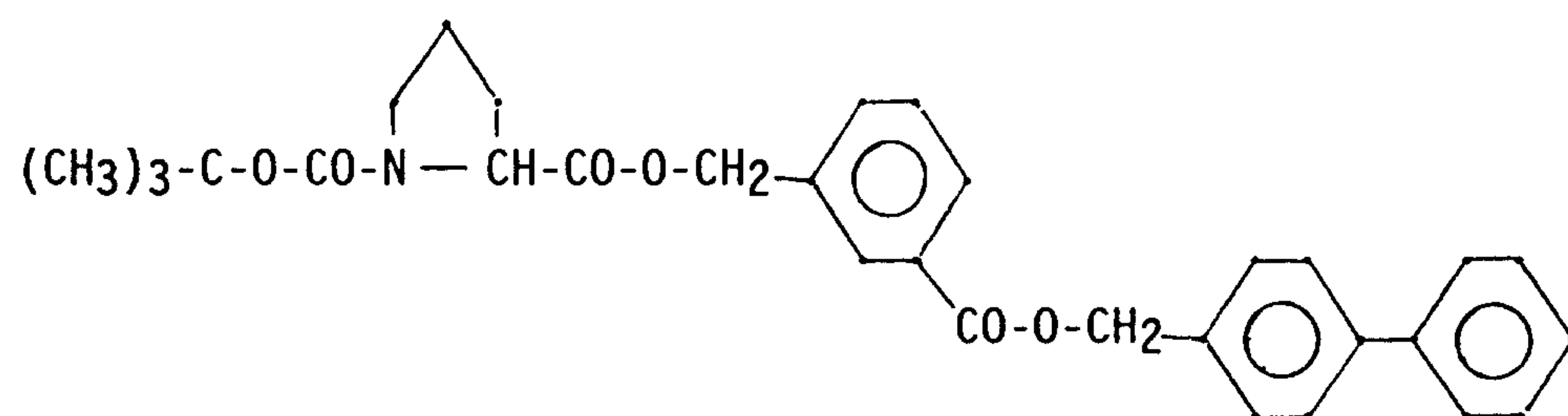
30 Aspect : huile
Rendement : 98 %

35

Exemple 17

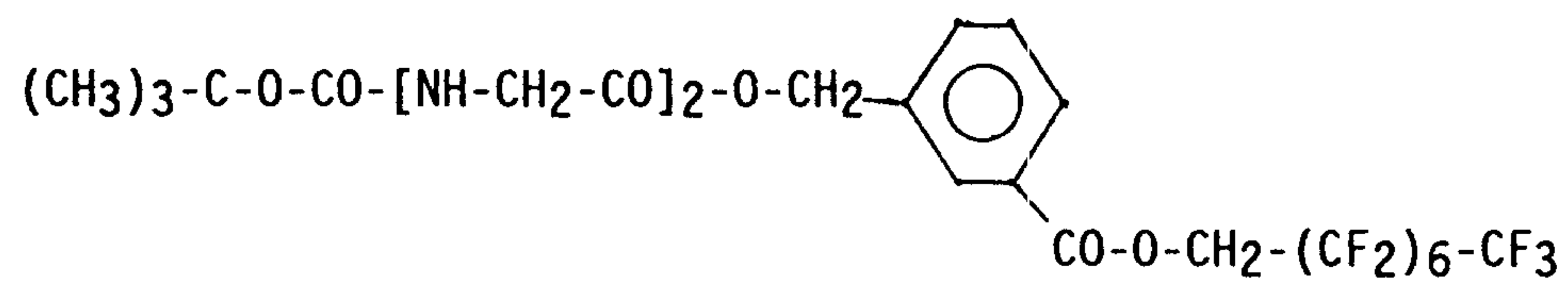
Aspect : huile

Rendement : 95 %

Exemple 18

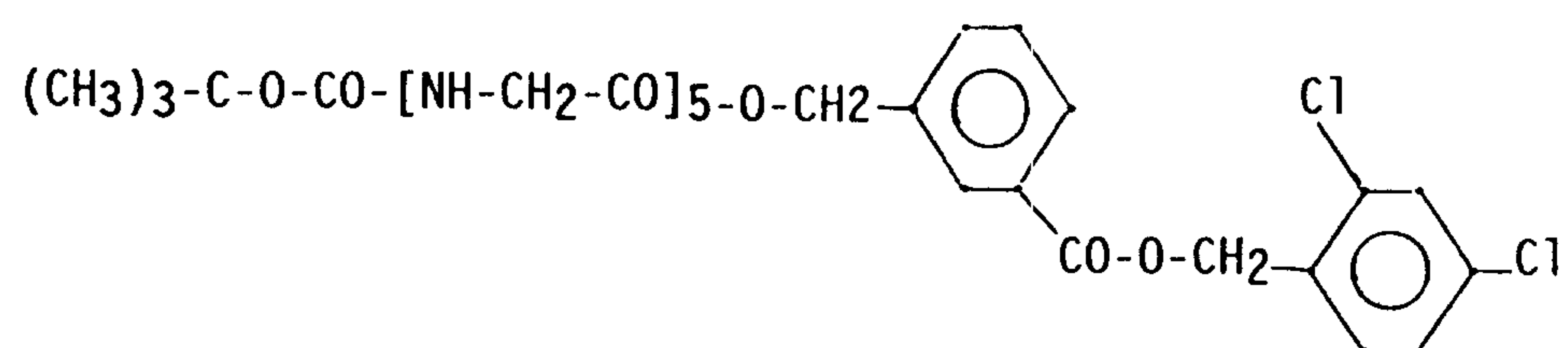
Aspect : huile

Rendement : 100 %

Exemple 19

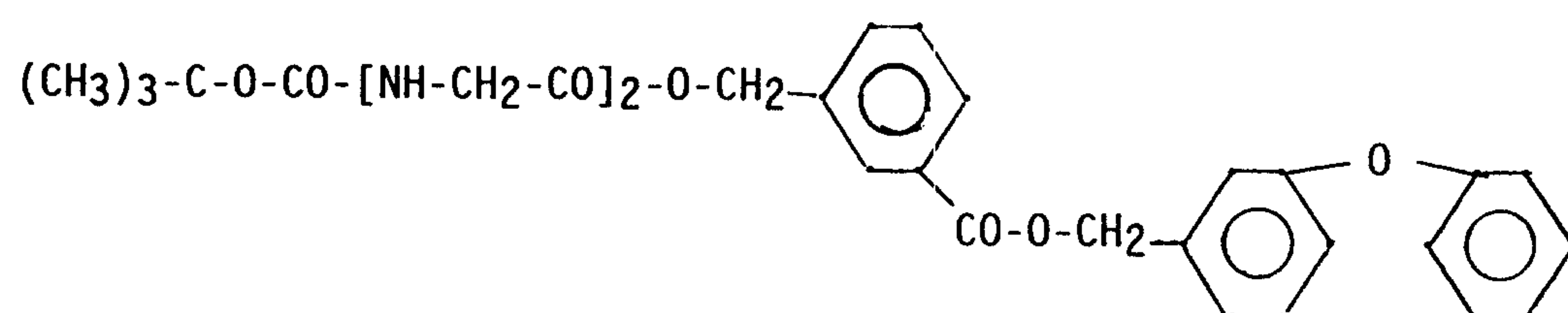
Aspect : poudre blanche

Rendement : 100 %

Exemple 20

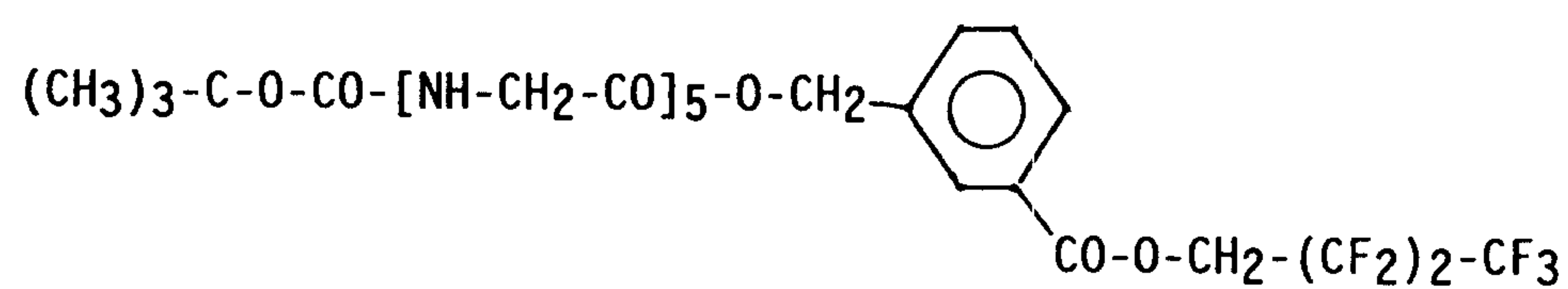
Aspect : poudre blanche

Rendement : 77,5 %

Exemple 21

Aspect : huile

Rendement : 100 %

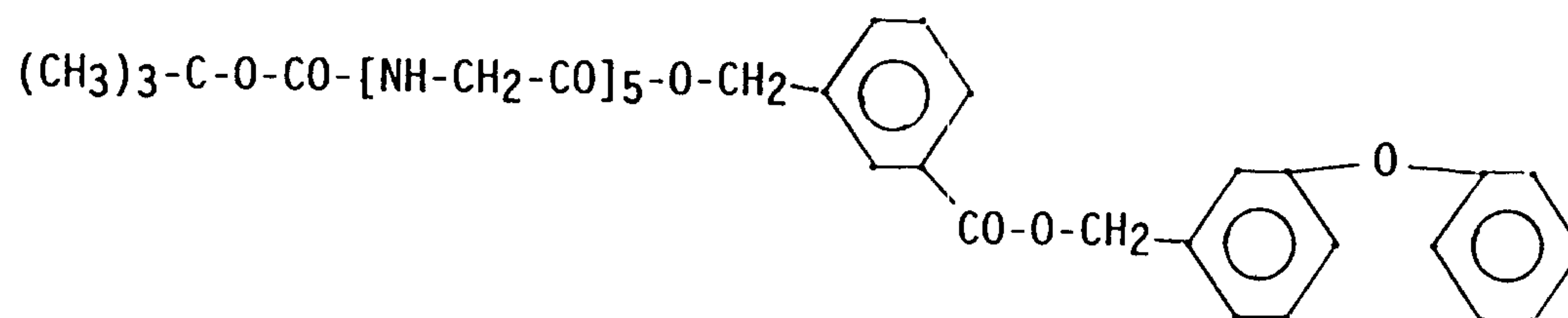
Exemple 22

Aspect : poudre

Rendement : 70 %

Exemple 23

05

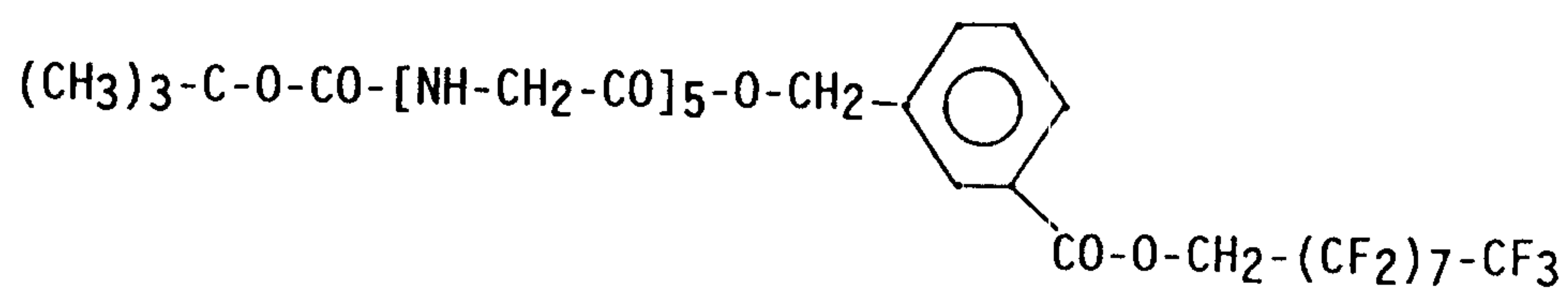


Aspect : poudre blanche

Point de fusion : 215°C

10 Exemple 24

15

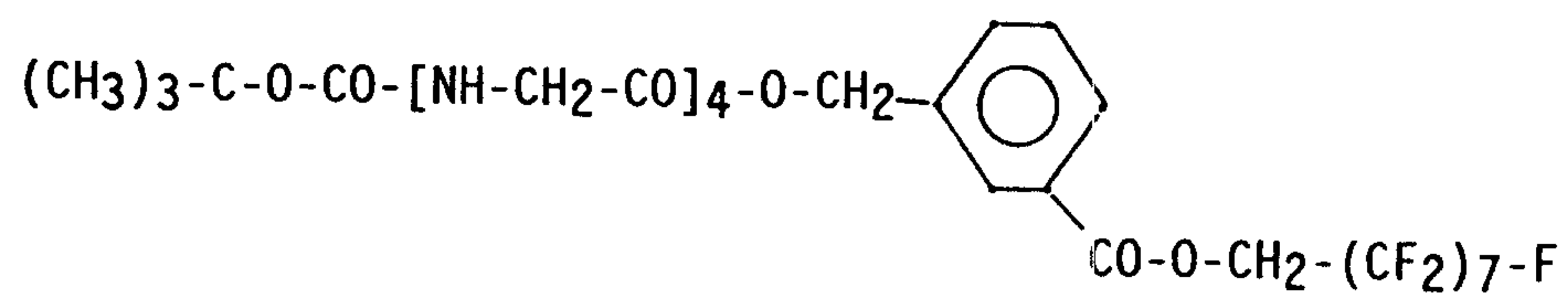


Aspect : poudre blanche

Point de fusion : 240°C

Exemple 25

20



25

Aspect : poudre blanche

30

35

III - SYNTHESE DE DIFFERENTS AMINOACYL-A-LExemple 26

05 Synthèse du chlorhydrate de l'ester de (méthyl-3 benzoate
d'hydroxyméthyl-4 biphényle) de la L-leucine.

Dans un ballon tricol de 250 cm³, on introduit
successivement :

- 10 - 24,6 g (soit 0,044 mol) de l'ester de méthyl-3-benzoate
d'hydroxyméthyl-4-biphényle de la N-tertiobutyloxycar-
bonyl-L-leucine,
- 100 g de dichlorométhane.

15 Puis on fait barboter un courant d'acide chlorhydrique sec
dans le mélange agité pendant 1 heure 30 minutes à température
ambiante.

La solution est ensuite dégazée sous courant d'azote pendant
20 minutes.

Le mélange réactionnel est ensuite évaporé jusqu'à un volume
de 50 cm³, puis on précipite par addition de 200 cm³ d'éther éthylique.

20 Le produit obtenu après filtration pèse 19,3 g (0,0413 mol)
(rendement 94 %). C'est une poudre blanche ayant un point de fusion de
121°C - 122°C.

La structure du produit a été confirmée par spectrométrie de
masse et par RMN du proton (360 MHz)

25 L'analyse par chromatographie sur couche mince sur plaque de
silice révèle une seule tache dans le système d'éluants suivant :
dichlorométhane/méthanol/acide acétique (90/10/5) R_f = 0,55.

30

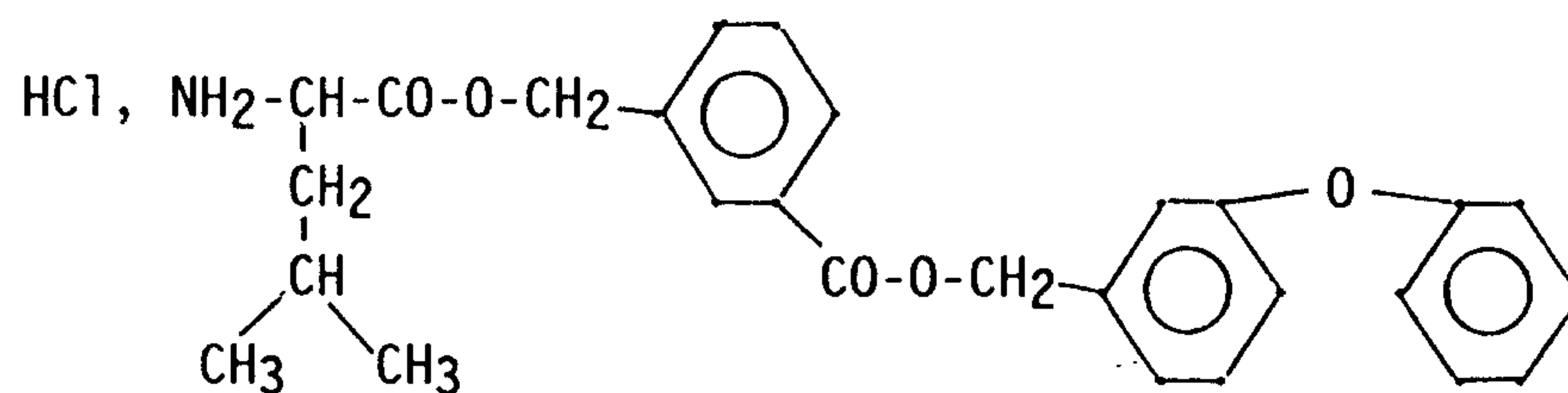
35

EXEMPLES 27 à 29

En opérant selon le même mode opératoire que dans l'exemple 26, on prépare les composés suivants.

05 Exemple 27

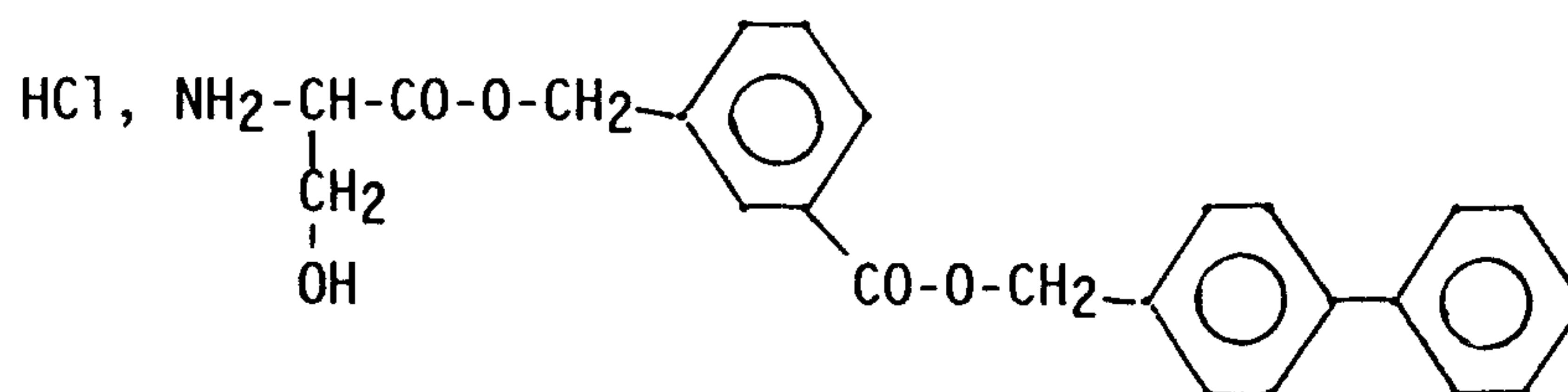
10



Aspect : huile
Rendement : 98 %

15 Exemple 28

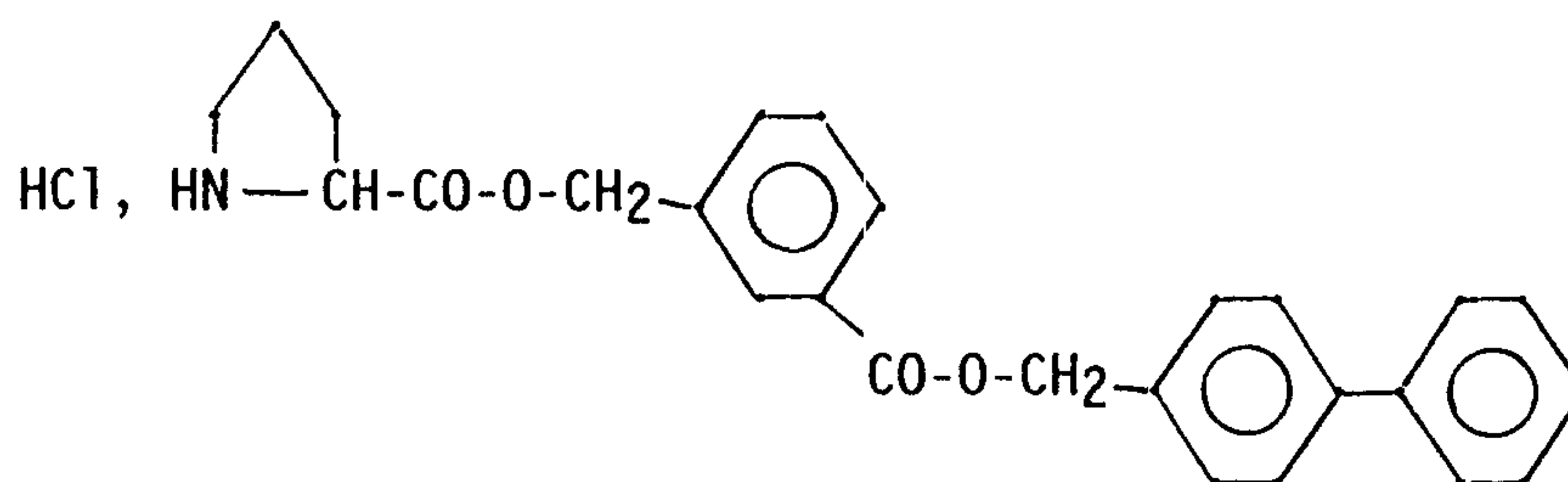
20



Aspect : poudre blanche
Rendement : 98 %

25 Exemple 29

30



Aspect : poudre blanche
Rendement : 80 %

35

IV - MESURE DES SOLUBILITES DES MOLECULES DE FORMULE (L)-SERYL-A-L
DANS L'EAU

Exemple 30

05 Les groupes lipophiles A-L lorsqu'ils sont liés à la L-sérine donnent une molécule dont la solubilité dans l'eau est inférieure à 30 g/l à température ambiante.

Synthèse des molécules de formule (L)-séryl-A-L

10 Les chlorhydrates de formule HCl, (L)-séryl-A-L obtenus selon la méthode décrite dans les exemples 26 à 29, sont mis en solution dans le dichlorométhane. On fait passer du gaz ammoniac dans cette solution à température ambiante. Le précipité de chlorure d'ammonium obtenu est rapidement filtré. Le filtrat est ensuite concentré sous pression très réduite. Le produit obtenu après concentration est immédiatement
15 trituré dans l'eau pendant 15 min à température ambiante, puis filtré.

La solubilité du produit de formule (L)-séryl-A-L est mesurée dans le filtrat.

Solubilité des molécules de formule (L)-séryl-A-L

- 20 . Ester de l'hydroxyméthyl-3 benzoate d'hydroxyméthyl-4 biphényle de la L-sérine :
solubilité dans l'eau à 25°C : 0 g/l (insoluble)
- . Ester de l'hydroxyméthyl-3 benzoate de benzyle de la L-sérine :
solubilité dans l'eau à 25°C : 0,2 g/l
- 25 . Ester de l'hydroxyméthyl-3 benzoate de phénoxy-3 benzyle de la L-sérine :
solubilité dans l'eau à 25°C : 0,75 g/l

A titre de comparaison :

- 30 . Ester méthylique de la L-sérine :
solubilité dans l'eau à 25°C : > 100 g/l
- . Ester benzylique de la L-sérine :
solubilité dans l'eau à 25°C : > 100 g/l

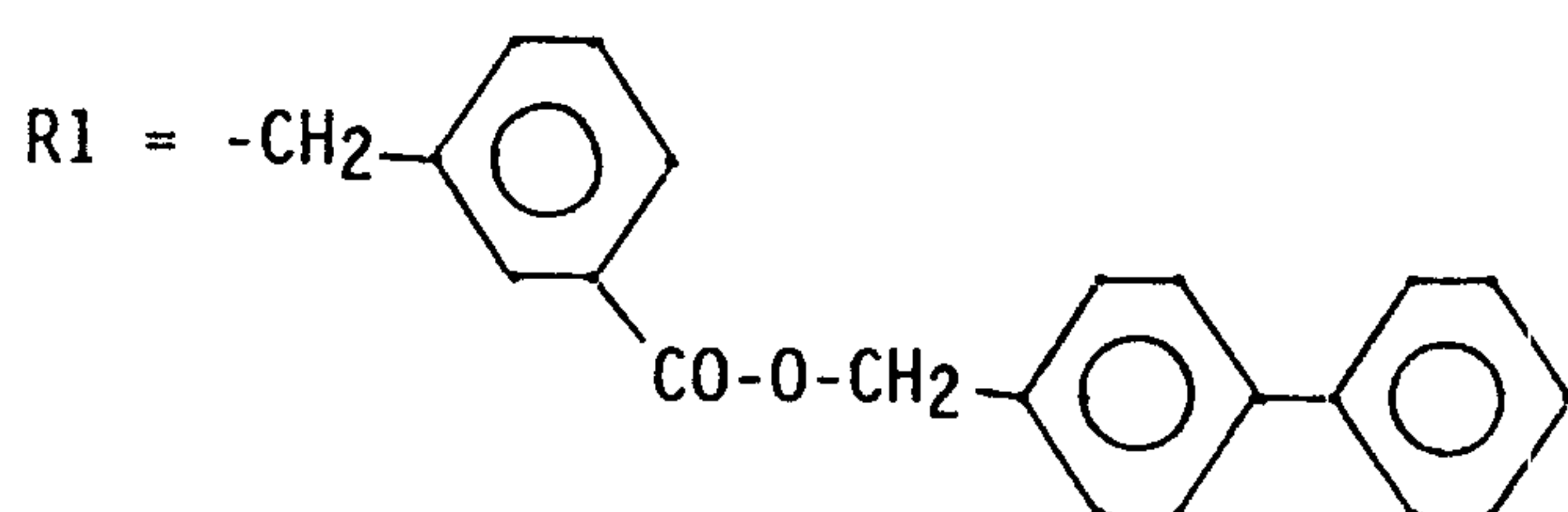
V - EFFETS SOLUBILISANTS DANS LES SOLVANTS ORGANIQUES DU GROUPE
LIPOPHILE PROTECTEUR DE LA FONCTION CARBOXYLIQUE DES PEPTIDES

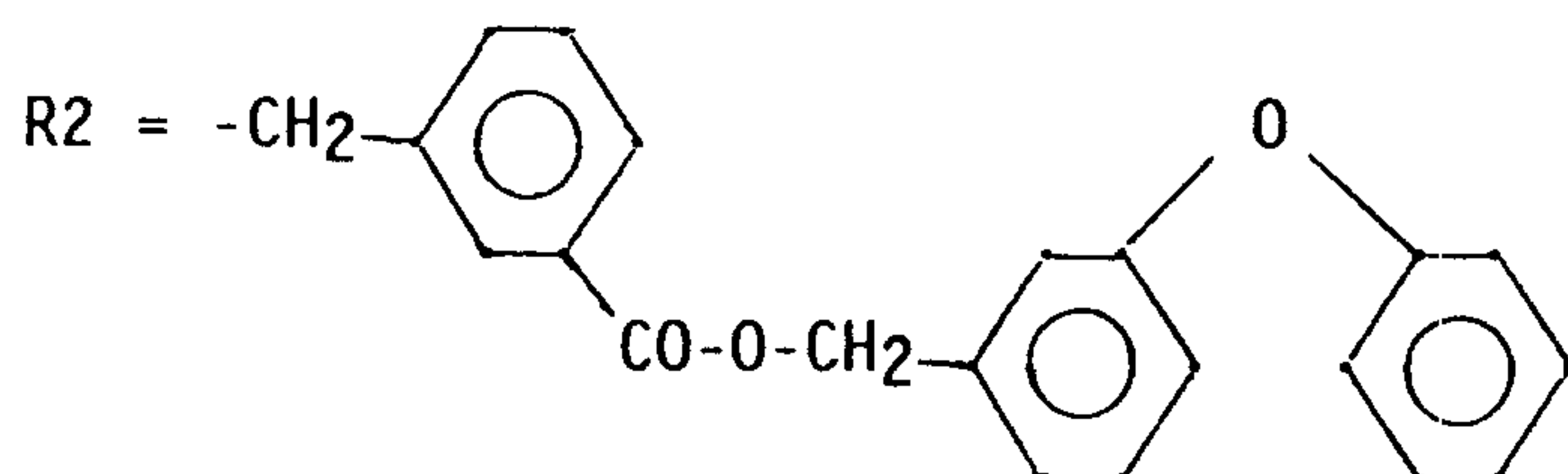
L'effet solubilisant du groupe lipophile est mis en évidence par les mesures de solubilité décrites ci-après, où le peptide modèle est un peptide particulièrement hydrophile : la N-tertiobutyloxy-carbonyl-pentaglycine



R	Solubilité en g/100 cm ³			Coefficient de partage entre CH ₂ CL ₂ et H ₂ O
	anisole	CH ₂ CL ₂	H ₂ O	
R1	5	> 10	0,0016	> 1.000
R2	5	> 10	0,0008	> 2.000
-CH ₃ *	insoluble	0,33	0,50	0,66
benzyle *	insoluble	0,070	0,017	4,1

* à titre de comparaison





VI - SYNTHESE PEPTIDIQUE EN MILIEU ORGANIQUE CONCENTRE AU MOYEN DE GROUPES LIPOPHILES A-L

On synthétise le pentapeptide leucine encéphaline L-tyrosyl glycyglycyl-L-phénylalanine :

- avec comme groupe lipophile A-L l'ester de méthyl-3 benzoate d'hydroxyméthyl-4 biphényle ;
- avec comme groupe protecteur de la fonction amine des acides aminés constitutifs le groupe tertibutyloxycarbonyl.

Exemple 31

Exemple 31 a : Synthèse de l'ester de l'hydroxyméthyl-3 benzoate d'hydroxyméthyl-4 biphényle de la N-tertibutyloxycarbonyl-L-phénylalanine.

Dans un réacteur tricol de 500 cm³, on introduit successivement :

- 10,33 g (0,039 mol) de N-tertibutyloxycarbonyl-L-phénylalanine,
- 75 cm³ de dichlorométhane.

Après dissolution, la température du milieu réactionnel est abaissée à -5°C et on ajoute successivement, sous agitation, 4,29 cm³ de N-méthylmorpholine (0,039 mol), 4,46 cm³ de chlorure de pivaloyl (0,036 mol).

Après 4 heures de réaction, on ajoute 14,018 g (0,030 mol) de chlorhydrate de l'ester de l'hydroxyméthyl-3 benzoate d'hydroxyméthyl-4 biphényle de la L-leucine, puis 3,3 cm³ de N-méthylmorpholine (0,030 mol).

05 Après 2 heures de réaction, le mélange réactionnel est lavé successivement par :

2 x 25 cm³ d'eau (pH 5,8 - 6,44),
3 x 30 cm³ de KHCO₃ dilué (pH 8,2 - 8,3),
2 x 30 cm³ d'eau (pH 7,3 - 7,2),
10 2 x 30 cm³ de H₂SO₄ (pH 3,89 - 3,35),
2 x 30 cm³ de NaCl dilué (pH 6,7 - 6,5).

Le rendement en produit dosé par rapport à un étalon est de 100 %.

15 L'analyse par chromatographie sur couche mince sur plaque de silice révèle une seule tache dans le système d'éluant suivant : acétate d'éthyle/hexane (2/5) R_f = 0,38.

La structure du produit a été vérifiée par spectrométrie de masse et par RMN du proton (360 MHz) et sa pureté a été confirmée par analyse par chromatographie liquide haute performance (CLHP).

20

Exemple 31 b : Synthèse du chlorhydrate de l'ester de l'hydroxyméthyl-3 benzoate d'hydroxyméthyl-4 biphényle de la L-phénylalanine-L-leucine.

25 La solution obtenue après extraction dans l'exemple 31 a est séchée par distillation sous vide du dichlorométhane. Le volume final est ramené à 150 cm³.

30 A température ambiante, on fait barboter dans la solution un courant d'acide chlorhydrique sec pendant 1 heure 45 minutes. Ensuite le mélange réactionnel est dégazé par bullage d'azote sec pendant 1 heure dans la solution.

Le mélange réactionnel est concentré sous vide jusqu'à un volume de 75 cm³.

35

Une chromatographie en couche mince sur plaque de silice confirme la pureté du produit : $R_f = 0,8$ dans le système d'éluants dichlorométhane/méthanol (90/10).

Une analyse par CLHP confirme que la coupure du groupe
05 N-tertiobutyloxycarbonyl est quantitative (100 %).

Un échantillon de produit précipité dans le système acétate d'éthyle/éther éthylique présente un point de fusion de 167/169°C.

10 Exemple 31 c : Synthèse de l'ester de l'hydroxyméthyl-3 benzoate d'hydroxyméthyl-4 biphenyle de la N-tertiobutyloxycarbonyl glycyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-leucine.

Dans un réacteur tricol de 500 cm³, on introduit successivement :

- 15 - 5,1 g (0,022 mol) de N-tertiobutyloxycarbonyl-glycyl-glycine,
- 75 cm³ de dichlorométhane.

Après dissolution, la température du milieu réactionnel est abaissée à -5°C et on ajoute successivement, sous agitation, 2,4 cm³ de
20 N-méthylmorpholine (0,022 mol), 2,7 cm³ de chlorure de pivaloyl (0,0176 mol).

Après 2 heures de réaction, sous agitation à -5°C, on ajoute la moitié de la solution obtenue dans l'exemple 31 b de chlorhydrate de l'ester de l'hydroxyméthyl-3 benzoate d'hydroxyméthyl-4 biphenyle de la
25 L-phénylalanyl-L-leucine (0,0147 mol dans 40 cm³ de dichlorométhane), puis 1,62 cm³ de N-méthylmorpholine (0,0147 mol).

Après 2 heures 30 minutes de réaction, sous agitation, le mélange réactionnel est lavé successivement par :

- 30 30 cm³ de H₂SO₄ dilué (pH 3,5),
2 x 30 cm³ d'eau (pH 4,5 - 3,6),
2 x 30 cm³ de NaOH diluée (pH 8,6 - 7,3),
2 x 30 cm³ d'eau (pH 6,8 - 6,1),

L'analyse par chromatographie sur couche mince sur plaque de silice révèle un seul produit dans le système d'éluants suivant : dichlorométhane/méthanol (90/10) $R_f = 0,6$.

La structure du produit a été vérifiée par spectrométrie de masse et par RMN du proton (360 MHz) et sa pureté a été confirmée par analyse par chromatographie liquide haute performance (CLHP).

Exemple 31 d : Synthèse du chlorhydrate de l'ester de méthyl-3 benzoate d'hydroxyméthyl-4 biphenyle de la glycyglycy-L-phénylalanine.

La solution obtenue après extraction dans l'exemple 31 c est séchée par distillation sous vide du dichlorométhane. Le volume final est ramené à 75 cm³.

A température ambiante, on fait barboter dans la solution un courant d'acide chlorhydrique sec pendant 1 heure 30 minutes. Ensuite le mélange réactionnel est dégazé par bullage d'azote sec pendant 1 heure dans la solution.

Le rendement en produit dosé de la solution ainsi obtenue est de 100 %.

La pureté du produit est vérifiée par chromatographie en couche mince sur plaque de silice et par CLHP.

Exemple 31 e : Synthèse de l'ester de (méthyl-3 benzoate d'hydroxyméthyl-4 biphenyle) de la N-tertiobutyloxycarbonyl L-tyrosyl-glycyglycy-L-phénylalanine.

Dans un réacteur tricol de 250 cm³, on introduit successivement :

- 5,26 g de N-tertiobutyloxycarbonyl-L-tyrosine,
- 40 cm³ de dichlorométhane.

Après dissolution, la température du milieu réactionnel est abaissée à -15°C et on ajoute successivement, sous agitation, 2,23 cm³ de N-méthylmorpholine (0,02 mol), 2,5 cm³ de chloroformiate d'isobutyle (0,019 mol).

Après 10 minutes de réaction, cette solution est ajoutée à la solution obtenue dans l'exemple 31 d de chlorhydrate de l'ester de méthyl-3 benzoate d'hydroxyméthyl-4 biphenyle de la glycyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-leucine (0,0135 mol dans 40 cm³ de dichlorométhane),
05 sous agitation à -15°C ; puis on rajoute 1,5 cm³ de N-méthylmorpholine (0,0135 mol).

Après 4 heures de réaction, sous agitation, le mélange réactionnel est lavé successivement par :
50 cm³ de H₂SO₄ dilué (pH 6,6),
10 25 cm³ de H₂SO₄ dilué (pH 2,2),
2 x 40 cm³ d'eau (pH 4,3 - 3,8),
40 cm³ de KHCO₃ dilué (pH 8,1),
2 x 40 cm³ d'eau (pH 7,9 - 6,9),

La phase organique est séchée par évaporation à sec pour
15 donner 14,4 g d'un solide blanc d'aspect meringué.

L'analyse par chromatographie sur couche mince sur plaque de silice révèle un seul produit.

La structure du produit a été vérifiée par spectrométrie de masse et par RMN du proton (360 MHz) et sa pureté a été confirmée par
20 analyse par chromatographie liquide haute performance (CLHP).

Exemple 31 f : Synthèse de la N-tertiobutyloxycarbonyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-leucine.

Dans un ballon tricol de 100 cm³, 5 g de l'ester de méthyl-3
25 benzoate d'hydroxyméthyl-4 biphenyle de la N-tertiobutyloxycarbonyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-leucine sont mis en suspension dans 15 cm³ de méthanol.

On rajoute 15,7 cm³ de soude N et 15 cm³ d'acétonitrile.

Après 4 heures de réaction, on rajoute 20 cm³ d'éther
30 éthylique.

La phase aqueuse est décantée et lavée par 2 x 20 cm³ d'éther éthylique, puis est acidifiée jusqu'à pH 3 par une solution de KHSO₄ à 5 %.

On extrait le N-tertiobutyloxycarbonylpentapeptide par le mélange acétate d'éthyle/éther éthylique 75/5.

La phase organique (75 cm³) est lavée par 2 x 30 cm³ d'eau (pH 4,0 - 5,0).

05 La phase organique finale est diluée à 100 cm³ en fiole jaugée pour dosage par CLHP par rapport à un étalon de référence pur.

Le rendement dosé, après extraction et saponification, est de 94,5 % par rapport au chlorhydrate de l'ester de méthyl-3 benzoate d'hydroxyméthyl-4 biphényle de L-leucine, ce qui signifie que l'on a un
10 rendement supérieur à 99 % pour chaque étape.

Après dosage la solution organique est concentrée et séchée sous très faible pression. Le résidu obtenu (3,5 g soit un rendement de 100 %) est dissous dans l'alcool isopropylique, puis est précipité par addition d'éther diisopropylique.

15 Cette opération est répétée une deuxième fois pour donner finalement 2,42 g d'une poudre, soit un rendement en produit isolé pur de 71 %.

La pureté du produit est vérifiée par analyse par CLHP, par spectrométrie RMN du proton (360 MHz) et par spectrométrie de masse.

20

Exemple 31 g : obtention du trifluoroacétate de la
L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phénylalaninyl-L-leucine.

Dans un ballon tricol de 50 cm³, on dissout à température ambiante 2,12 g (2,78 mmol) de N-tertiobutyloxycarbonyl-L-tyrosyl-
25 glycyl-glycyl-L-phénylalaninyl-L-leucine préparée dans l'exemple 31 f, dans 10 cm³ d'un mélange 50/50 en volume de dichlorométhane/anisole et 5 cm³ d'acide trifluoroacétique.

Après 1 heure de réaction sous agitation, la solution est concentrée sous pression réduite.

30 Le produit est dosé par rapport à un étalon de référence pur à 100 %.

Le rendement après coupure est de 100 % (2,78 mmol en produit dosé).

35

La solution dosée est ensuite lyophilisée pour donner 1,72 g d'une poudre blanche : rendement final en produit récupéré de 92,5 % par rapport à la N-tertiobutyloxycarbonyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phénylalaninyl-L-leucine.

05 La pureté du produit est vérifiée par analyse par CLHP, par spectrométrie RMN du proton (360 MHz) et par spectrométrie de masse.

L'analyse élémentaire du produit final donne :

C = 53,1 %

H = 5,7 %

10 N = 9,9 %

F = 8,1 %

pour une formule brute :

$C_{28} H_{37} O_7 N_5, CF_3 COOH, 2H_2O$

15

20

25

30

35

Les réalisations de l'invention, au sujet des-
quelles un droit exclusif de propriété ou de privilège est
revendiqué, sont définies comme il suit:

1. Procédé de solubilisation pour la synthèse
de peptides, de peptides protégés ou de peptides salifiés,
dans un solvant organique non miscible à l'eau, caractérisé
en ce que le groupe C-terminal d'un peptide ou d'un
10 aminoacide est lié par l'intermédiaire d'une liaison amide
ou ester à un groupe lipophile ayant de 13 - 50 C, ce
dernier lorsqu'il est lié à la L-sérine donnant une
molécule dont la solubilité dans l'eau à 25°C est
inférieure à 30 g/litre, ce groupe lipophile étant
chimiquement défini et non polymérique.

2. Procédé selon la revendication 1, caracté-
risé en ce que le groupe lipophile est composé de deux
entités chimiques A et L liées entre elles par une liaison
covalente dans lesquelles:

20 - A représente un bras d'ancrage entre le peptide et
le groupe L, caractérisé en ce que A comporte au moins une
fonction (B) alcool ou amine,

- L représente un groupe hydrocarboné lipophile.

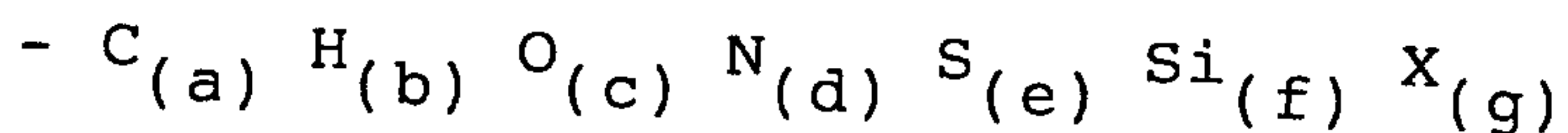
3. Procédé selon la revendication 2, caracté-
risé en ce que le groupe A est un bras d'ancrage
bifonctionnel, comportant à une extrémité autre que la
fonction (B) une fonction carbonyle ou éther, et représenté
par la formule générale:

30
$$B-R_1-Ar(k)-[R_2-CO(n)-O(m)]-p$$

dans laquelle:

- B représente un groupe hydroxyle ou amino
- Ar représente un radical aromatique mono ou polycyclique
- R_1 représente une liaison covalente, un radical alkylène contenant 1 à 4 atomes de carbone non-substitué ou substitué par un radical phényle, un groupe alkylèncarbonyle
- R_2 représente une liaison covalente, un radical alkylène contenant 1 à 4 atomes de carbone non-substitué ou substitué, un groupe oxyalkylène contenant 1 à 4 atomes de carbone dans la chaîne alkylène, un atome d'oxygène
- k, m et n sont des nombres entiers égaux à 0 ou 1
- p est un nombre entier égal à 1 ou 2.

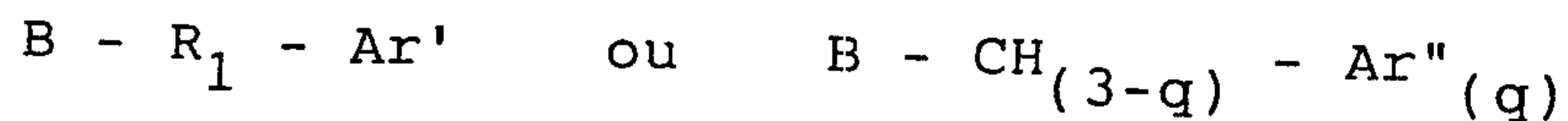
4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le groupe lipophile L répond à la formule:



dans laquelle:

- X représente un halogène choisi dans le groupe constitué par le fluor, le chlore et le brome
- a est un nombre entier allant de 13 à 50
- b est un nombre entier allant de 3 à 101
- c est un nombre entier allant de 0 à 6
- d est un nombre entier allant de 0 à 2
- e est un nombre entier allant de 0 à 2
- f est un nombre entier allant de 0 à 2
- g est un nombre entier allant de 0 à 20.

5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les deux entités A et L peuvent former un seul groupe répondant à l'une des formules:



dans lesquelles:

- B représente un groupe hydroxyle ou amino
- R_1 représente une liaison covalente, un radical alkylène contenant 1 à 4 atomes de carbone non-substitué ou substitué par un radical phényle, un groupe alkylène-carbonyle
- Ar' représente un radical aromatique polycyclique
- Ar'' représente un radical benzénique
- et q est un nombre entier égal à 2 ou 3.

10 6. Procédé de synthèse de peptides ou de peptides protégés en milieu liquide, caractérisé en ce que l'on part d'un peptide ou d'un aminoacide initial solubilisé selon le procédé défini à la revendication 1, et en ce que l'on ajoute successivement, après avoir déprotégé la fonction amine, un à un les aminoacides activés sur la fonction acide et protégés sur la fonction amine.

20 7. Procédé de synthèse de peptides ou de peptides protégés en milieu liquide, caractérisé en ce que l'on part d'un peptide ou d'un aminoacide initial solubilisé selon le procédé défini à la revendication 2, et en ce que l'on ajoute successivement un à un les aminoacides activés sur la fonction acide et protégés sur la fonction amine.

 8. Procédé de synthèse de peptides ou de peptides protégés en milieu liquide, caractérisé en ce que l'on part d'un peptide ou d'un aminoacide initial solubilisé selon le procédé défini à la revendication 3, et en ce que l'on ajoute successivement un à un les aminoacides activés sur la fonction acide et protégés sur la fonction amine.

30 9. Procédé de synthèse de peptides ou de peptides protégés en milieu liquide, caractérisé en ce que l'on part d'un peptide ou d'un aminoacide initial solubilisé selon le

procédé défini à la revendication 4, et en ce que l'on ajoute successivement un à un les aminoacides activés sur la fonction acide et protégés sur la fonction amine.

10. Procédé de synthèse de peptides ou de peptides protégés en milieu liquide, caractérisé en ce que l'on part d'un peptide ou d'un aminoacide initial solubilisé selon le procédé défini à la revendication 5, et en ce que l'on ajoute successivement un à un les aminoacides activés sur la fonction acide et protégés sur la fonction amine.

11. Procédé de synthèse de peptides ou de peptides protégés en milieu liquide caractérisé en ce que l'on part d'un aminoacide ou d'un peptide solubilisé selon le procédé défini à la revendication 1, et en ce que l'on condense un autre peptide ayant sa fonction acide C-terminale activée et sa fonction amine N-terminale protégée.

12. Procédé de synthèse de peptides ou de peptides protégés en milieu liquide caractérisé en ce que l'on part d'un aminoacide ou d'un peptide solubilisé selon le procédé défini à la revendication 2, et en ce que l'on condense un autre peptide ayant sa fonction acide C-terminale activée et sa fonction amine N-terminale protégée.

13. Procédé de synthèse de peptides ou de peptides protégés en milieu liquide caractérisé en ce que l'on part d'un aminoacide ou d'un peptide solubilisé selon le procédé défini à la revendication 3, et en ce que l'on condense un autre peptide ayant sa fonction acide C-terminale activée et sa fonction amine N-terminale protégée.

14. Procédé de synthèse de peptides ou de peptides protégés en milieu liquide caractérisé en ce que

l'on part d'un aminoacide ou d'un peptide solubilisé selon le procédé défini à la revendication 4, et en ce que l'on condense un autre peptide ayant sa fonction acide C-terminale activée et sa fonction amine N-terminale protégée.

15. Procédé de synthèse de peptides ou de peptides protégés en milieu liquide caractérisé en ce que l'on part d'un aminoacide ou d'un peptide solubilisé selon le procédé défini à la revendication 5, et en ce que l'on condense un autre peptide ayant sa fonction acide C-terminale activée et sa fonction amine N-terminale protégée.

16. Procédé selon la revendication 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15, caractérisé en ce que le milieu liquide est constitué d'un solvant choisi dans le groupe constitué par les dérivés aliphatiques halogénés, les dérivés aromatiques et les esters.

17. Procédé selon la revendication 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15, caractérisé en ce que la fonction amine N-terminale est protégée par un groupe tertibutyloxycarbonyle ou par réaction avec un composé bêta-dicarbonylé.

18. Procédé selon la revendication 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15, caractérisé en ce que la fonction acide est activée par un chlorure d'acide par un chloroformiate d'alkyle, par un carbodiimide ou par un ester activé.

19. Procédé selon la revendication 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15, caractérisé en ce que le peptide C-terminal initial est introduit dans le milieu réactionnel, puis l'acide aminé ou le peptide activé sur sa fonction

acide et protégé sur sa fonction amine est ajouté, puis après réaction les co-produits et les excès de réactif sont éliminés de la phase organique par lavage avec des solutions aqueuses neutres, acides ou basiques, puis la fonction amine est libérée et enfin un nouvel acide aminé ou un nouveau peptide activé sur sa fonction acide et protégé sur sa fonction amine est introduit.