(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) **N° de publication :** **2 803 594**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **00 00288**

(51) Int Cl[7] : **C 07 K 7/02,** C 07 K 14/575

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 11.01.00.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 13.07.01 Bulletin 01/28.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire :** *Se reporter à la fin du présent fascicule*

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(71) **Demandeur(s) :** *CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS Etablissement public à caractère scientifique et technologique* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** AMBLARD MURIEL, MARTINEZ JEAN et BERGE GILBERT.

(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire(s) :** CABINET SUEUR ET L'HELGOUALCH.

(54) OLIGOMERES DE MIMES CONTRAINTS NON PEPTIDIQUES DE DIPEPTIDES OU DE TRIPEPTIDES, ET LEURS UTILISATIONS.

(57) L'invention a pour objet des oligomères d'acides aminés, non peptidiques.

Les oligomères sont constitués d'unités - (NR'-A-CO)-O- qui représentent un mime contraint non peptidique inducteur de coude ß, d'un fragment dipeptide ou tripeptide.

Ils peuvent être obtenus selon les procédés de la synthèse peptidique, soit en solution, soit en phase solide.

Ils sont utiles pour la synthèse de protéines ou de polypeptides artificiels dans lesquels le ou les fragments peptidiques sont identiques à ceux de la protéine ou du polypeptide naturel correspondant, et le ou les fragments structurants sont constitués par un fragment d'un oligomère de l'invention.

FR 2 803 594 - A1

La présente invention a pour objet des oligomères d'acides aminés, un procédé pour leur préparation, leur utilisation pour la synthèse de polypeptides et de protéines artificiels, et les polypeptides et protéines artificiels obtenus.

Les protéines et les polypeptides sont des polymères obtenus par couplage d'un certain nombre d'acides α-aminés identiques ou différents dans un ordre donné. Ils présentent de nombreuses propriétés fort intéressantes, mais leur structure les rend fragiles et ils sont facilement dégradés.

On a cherché à augmenter la stabilité en remplaçant tout ou partie des acides α-aminés dans la séquence d'une protéine ou d'un polypeptide naturel par des acides β-aminés (K. Gademan, et al, Helvetica Chimica Acta Vol. 82 (1999), pp. 1-11). Cette substitution a effectivement permis d'améliorer la stabilité des produits obtenus. Néanmoins, les procédés de synthèse sont longs et compliqués à mettre en œuvre, et les dérivés obtenus sont des homologues des acides α-aminés.

Le but de l'invention est l'obtention de polypeptides et de protéines artificiels plus stables que les polypeptides et les protéines naturels, dans lesquels les parties peptidiques structurées, en particulier en hélice α, sont remplacées par des oligomères non peptidiques.

L'invention a ainsi pour objet des oligomères d'aminoacides dont les unités récurrentes sont des mimes contraints non peptidiques de dipeptides ou de tripeptides, un procédé pour leur obtention, leur utilisation pour l'élaboration de polypeptides et de protéines artificiels, et les polypeptides et protéines artificiels obtenus.

Un oligomère de la présente invention est représenté par l'une des formules générales

R_1-(NR'-A-CO)$_n$-OR_2 (I) ou R_1-(NR'-A-CO)$_n$-NR'$_2$R"$_2$ (I')

dans lesquelles :

- l'unité -NR'-A-CO- représente un mime contraint non peptidique inducteur de coude β, d'un fragment dipeptide ou tripeptide ;
- n est compris entre 2 et 40 ;

- R_1 représente un groupe acyle R_3-CO- ou un groupe R_3-O-CO- dans lesquels R_3 représente un groupe benzyle, un groupe tert-butyle ou un groupe 9-fluorénylméthyle ;
- R_2 représente H, un groupe alkyle, (de préférence un méthyle ou un éthyle) ou un groupe benzyle ;
- R'_2 et R''_2 représentent indépendamment l'un de l'autre H, un groupe alkyle, (de préférence un méthyle ou un éthyle) ou un groupe benzyle ;
- R' représente un atome d'hydrogène ou bien R' forme un groupe monocyclique ou un groupe polycyclique éventuellement condensé avec l'atome N et le groupe A.

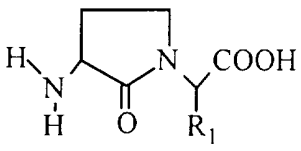
Dans un mode de réalisation particulier, A représente un groupe hétérocyclique aromatique ou non, monocyclique ou polycyclique éventuellement condensé.

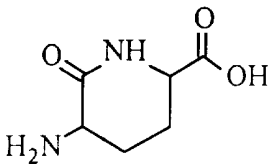
Dans un autre mode de réalisation, le groupe -NR'-A-CO- représente un groupe hétérocyclique aromatique ou non, monocyclique ou polycyclique éventuellement condensé.

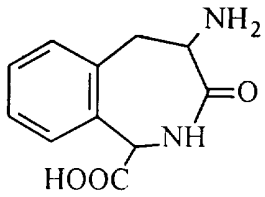
Le groupe -NR'-A-CO- peut comprendre un centre asymétrique, qui peut être de configuration R ou de configuration S.

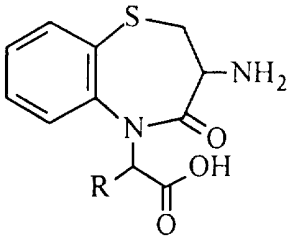
Un oligomère de l'invention peut être constitué d'unités récurrentes -NR'-A-CO- qui sont toutes identiques. Il peut également être constitué par des unités différentes qui répondent à la définition ci-dessus.

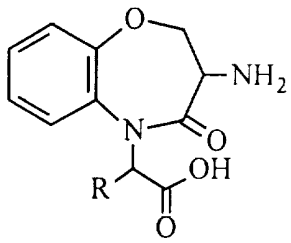
Un oligomère (I) ou (I') est obtenu par polymérisation d'au moins un acide aminé constituant un mime contraint non peptidique inducteur de coude β, d'un dipeptide ou d'un tripeptide et répondant à la formule NHR'-A-CO-OH (II) dans laquelle les groupes R' et A ont la même signification que dans l'oligomère (I) ou (I'). A titre d'exemples de composés (II), on peut citer les composés ci-dessous :

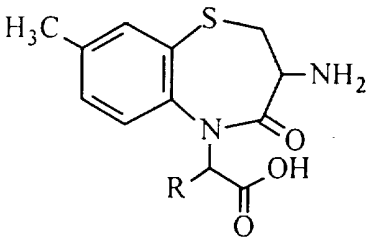


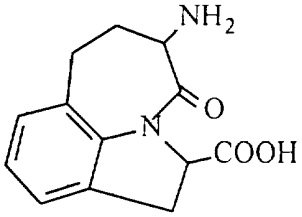


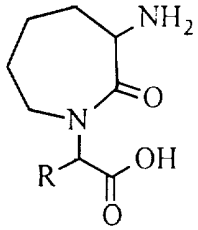


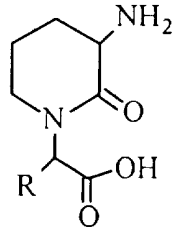


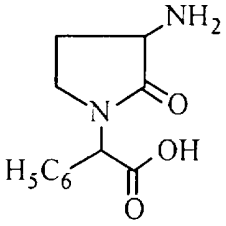


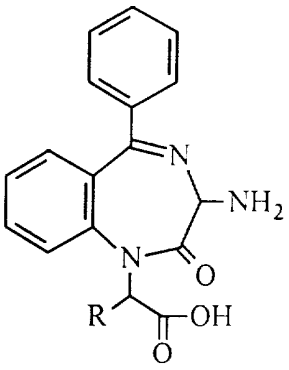


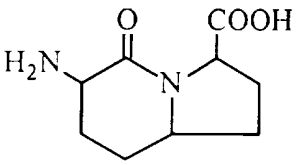


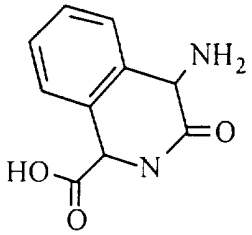


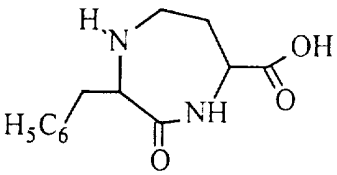


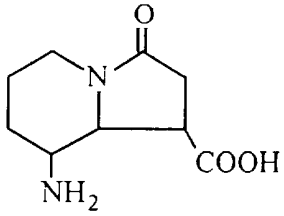


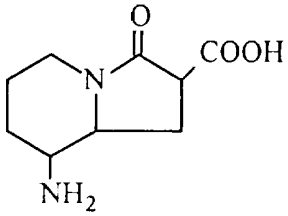


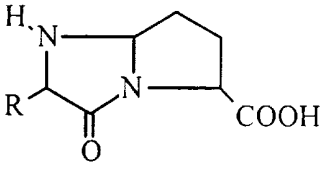


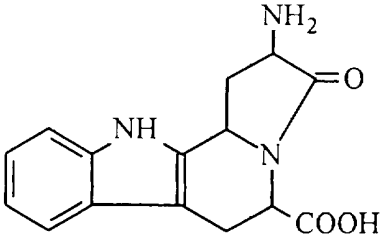


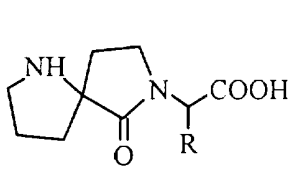


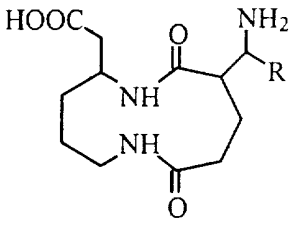


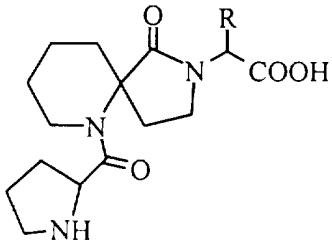


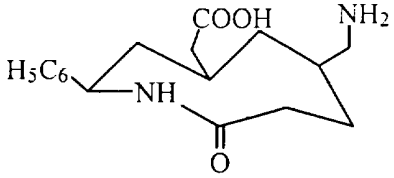


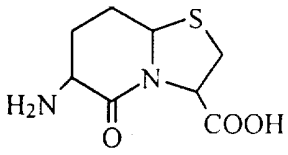


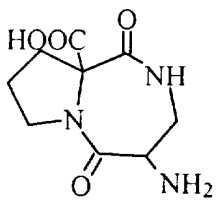


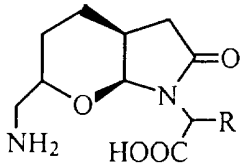


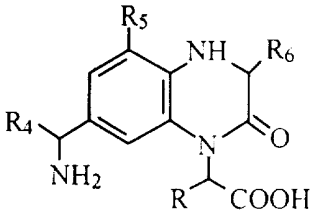


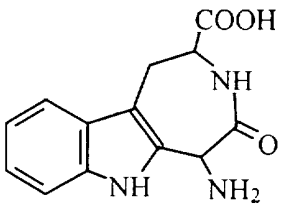


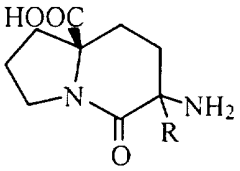


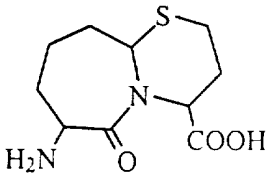


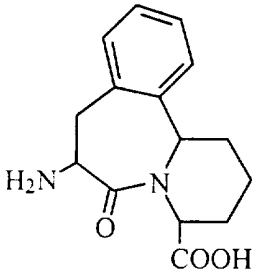


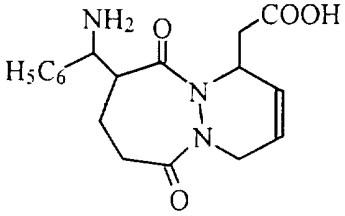


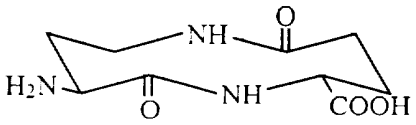


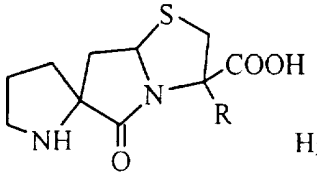


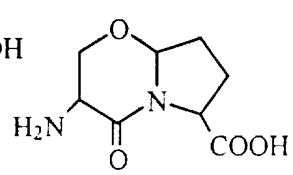


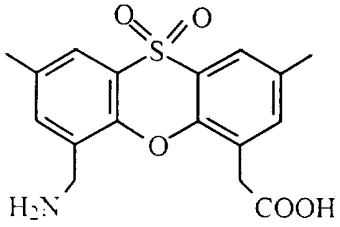


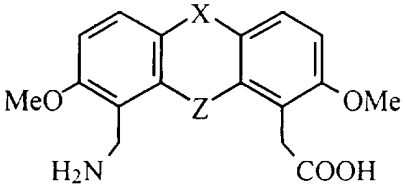


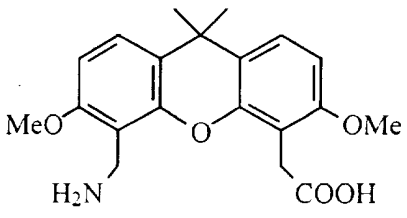




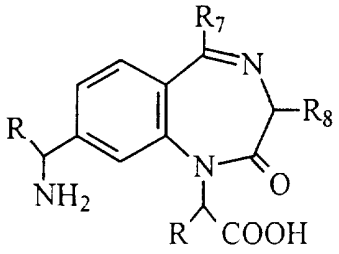


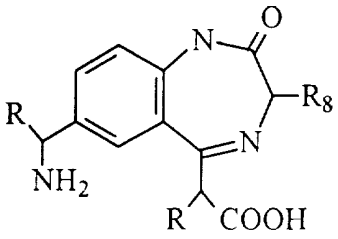


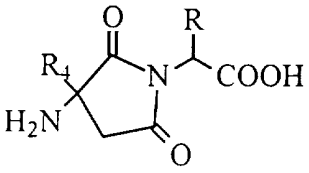


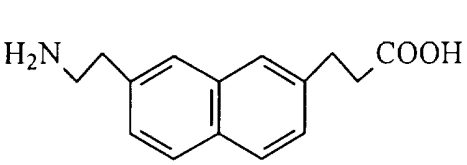


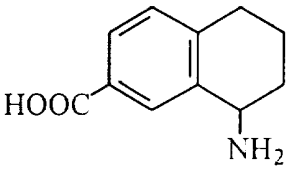
X = O,S; Z = NH, CH_2.

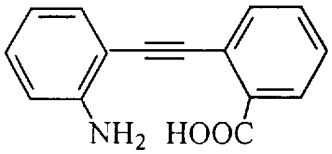


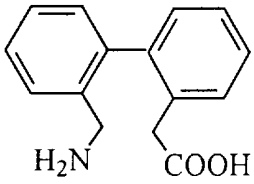


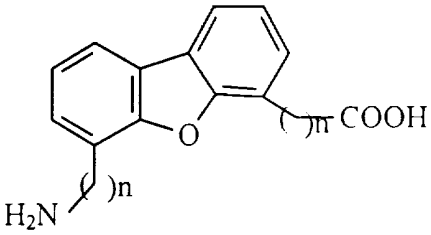


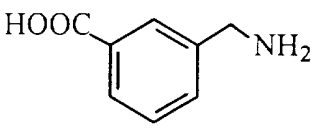


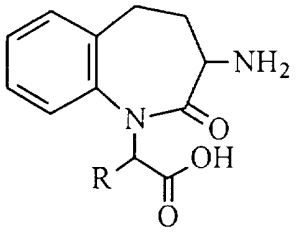


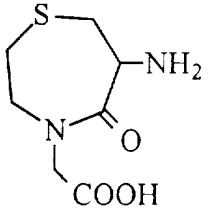


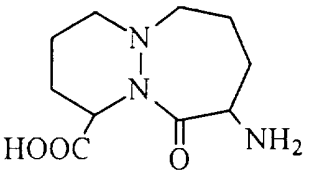


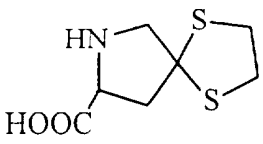


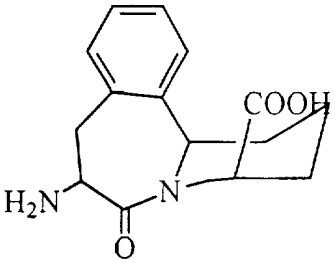


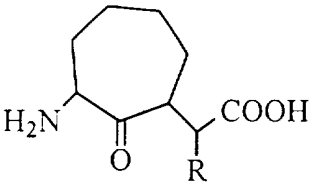


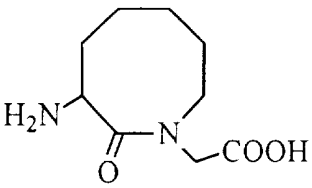


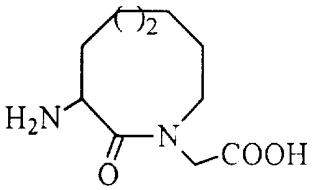


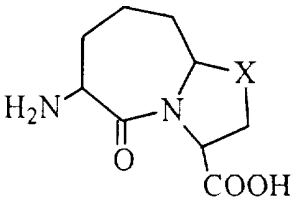




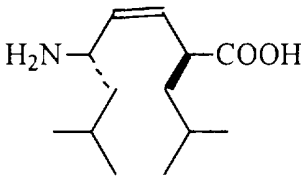


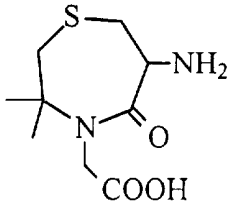


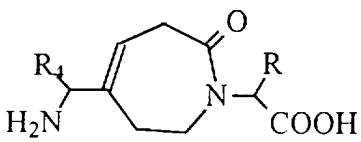


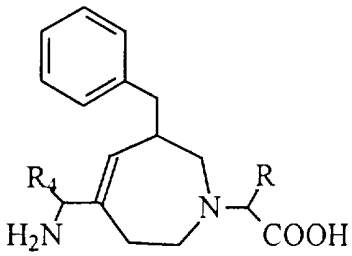


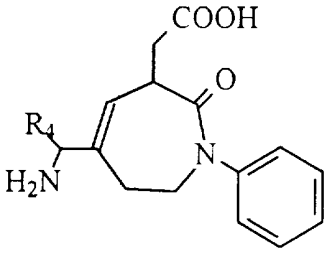
X = CH_2, S

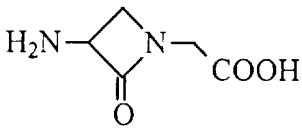


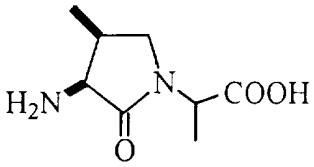


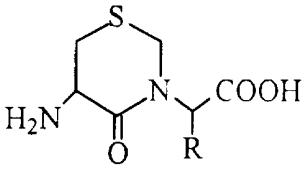


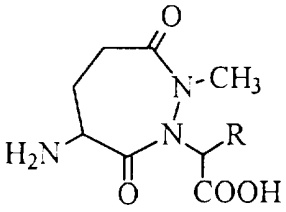


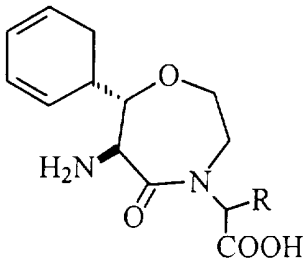


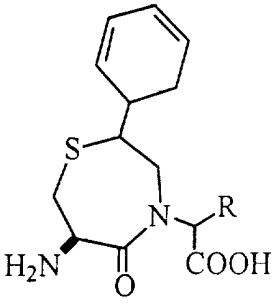


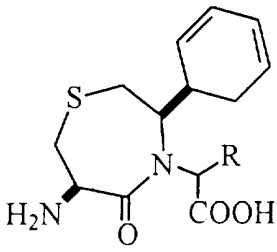


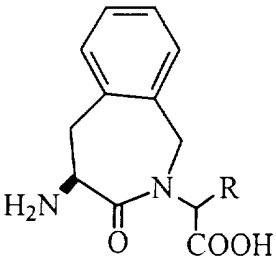


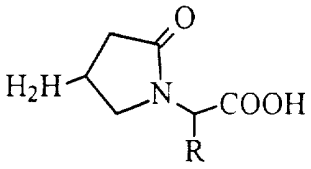


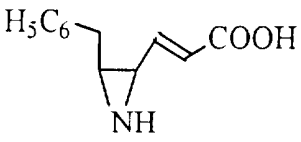


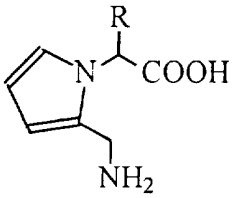


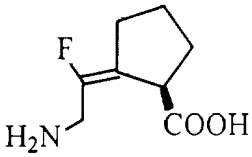


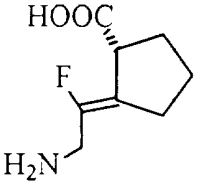


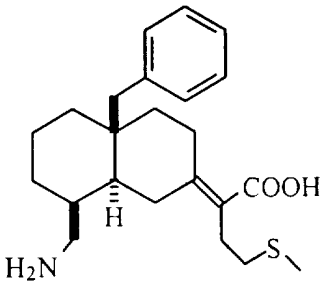


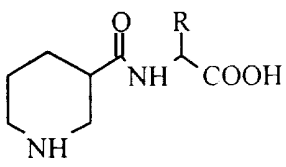


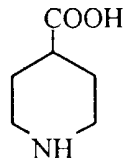


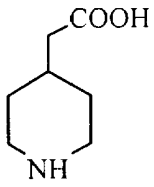


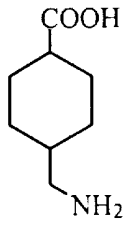


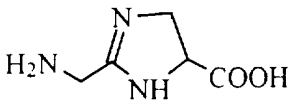


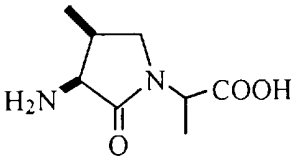


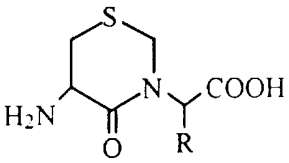


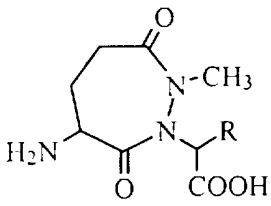


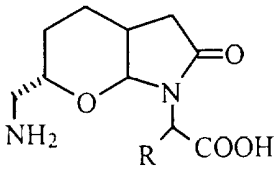


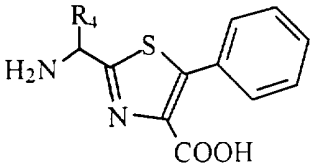


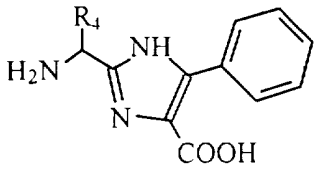


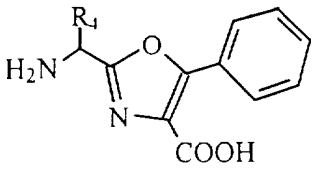


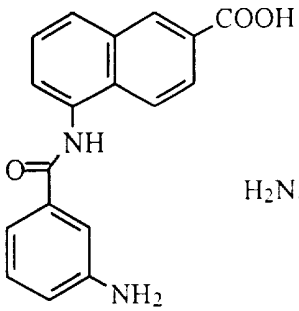


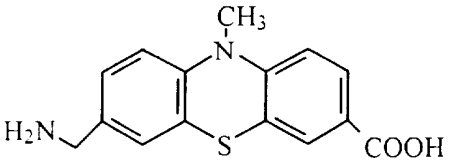


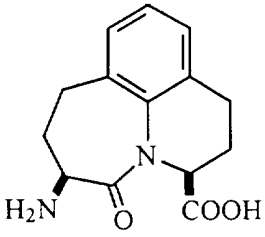


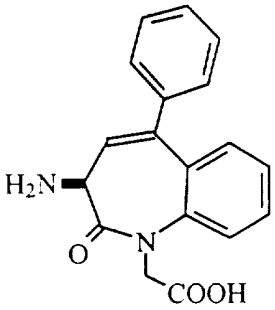


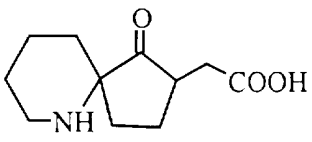


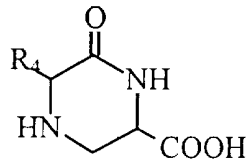


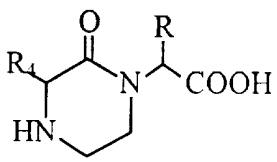


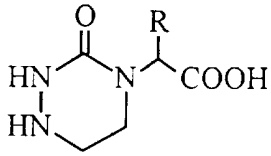


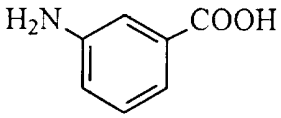


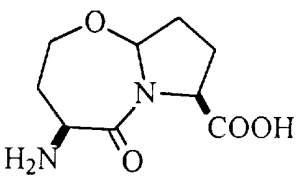


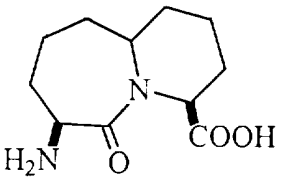


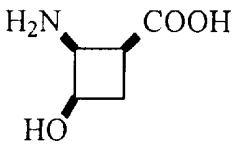


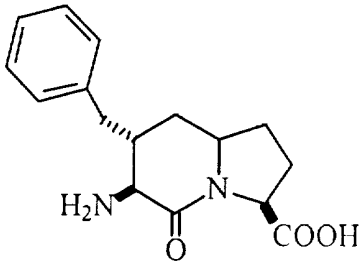


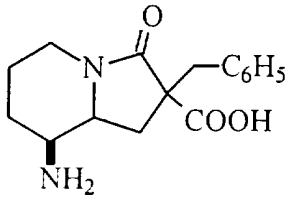


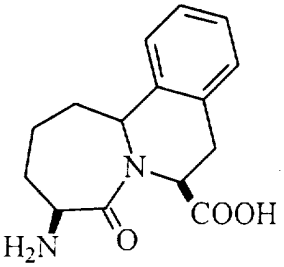


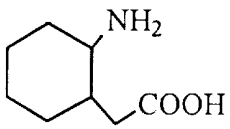


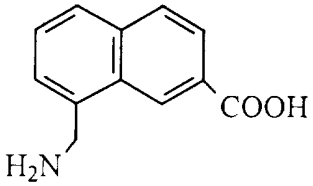


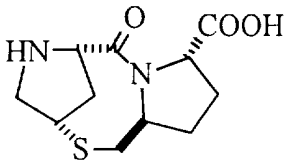


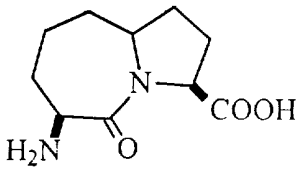


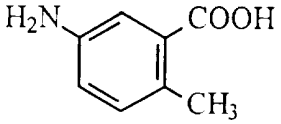


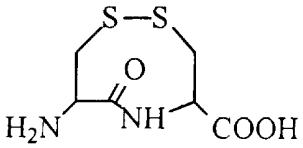


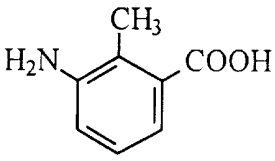


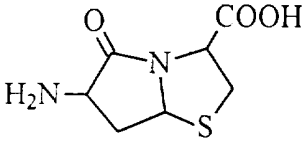


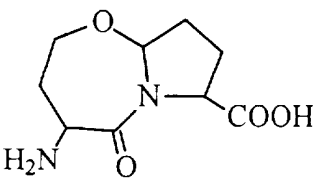


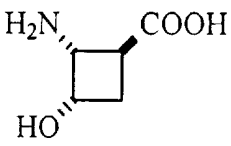


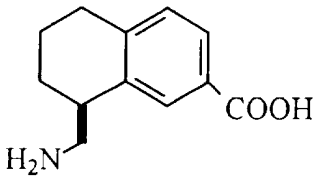


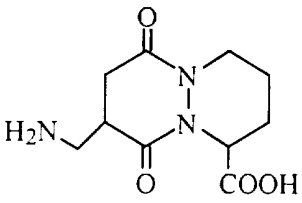


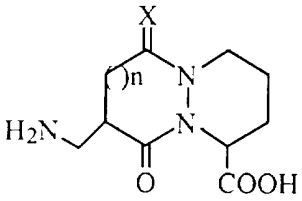




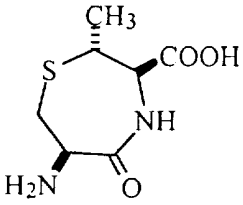


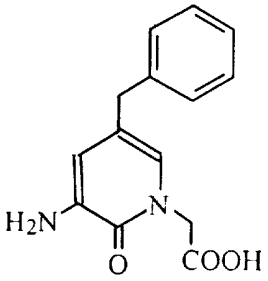


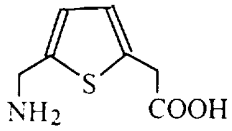


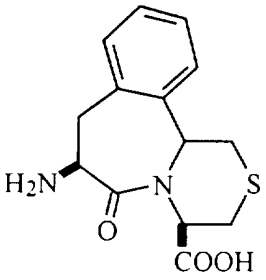


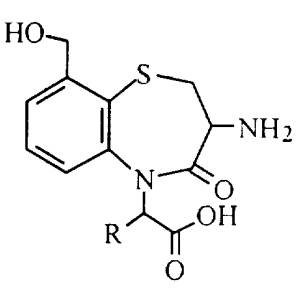
X = H_2, n = 0, 1, 2, 3
X = O, n = 0, 1, 2, 3

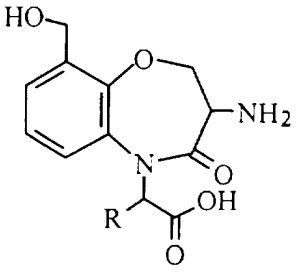


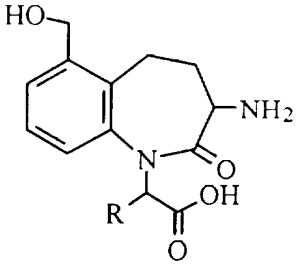












Dans les composés ci-dessus :

- R, et le cas échéant R_4, sont choisis indépendamment l'un de l'autre parmi les groupes constituants les chaînes latérales des α-aminoacides, par exemple H, CH_3-, $(CH_3)_2CH$-, CH_3-$(CH_2)_3$- ou C_6H_5-CH_2- ;
- R_5 et R_6 représentent indépendamment l'un de l'autre H, CH_3-, ou C_6H_5-CH_2- ;
- R_7 représente H ou un phényle ;
- R_8 représente H, CH_3-, C_2H_5- ou C_6H_5-CH_2- ;
- les substituants X et Z sont définis de manière spécifique pour chaque composé qui les contient, et
- Me représente un groupe méthyle.

Dans les composés ci-dessus comprenant des centres asymétriques, lesdits centres asymétriques peuvent être de configuration R ou S.

Ces monomères peuvent être synthétisés par des procédés décrits dans l'art antérieur. Par exemple, Amblard, et al., J. Med. Chem., 1999, 42, 4193-4201, décrivent la synthèse de la (3S)[amino]-5-(carbonylméthyl)-2,3-dihydro-1,5-benzothiazépin-4(5H)-one et d'autres monomères.

La polymérisation des monomères (II) peut être effectuée en solution selon un mode opératoire classique pour les synthèses peptidiques. On met en solution un monomère (II) protégé sur sa fonction acide, un monomère (II) identique au premier cité ou non, protégé sur sa fonction amine et un agent de couplage, ce qui provoque la formation d'une liaison amide entre les deux monomères. Ensuite, on déprotège sélectivement la fonction N-terminale de l'oligomère obtenu et on condense un autre monomère (II) N-protégé avec cet oligomère pour obtenir un oligomère protégé constitué de trois unités monomères. La synthèse est ainsi poursuivie par des étapes successives de déprotection sélective de la fonction N-terminale de l'oligomère, suivie d'un couplage avec un monomère N-protégé, jusqu'à l'obtention d'un oligomère de la taille désirée. L'oligomère final peut être déprotégé in fine soit sélectivement sur la fonction carboxylique, soit sur la fonction amine, soit totalement.

Dans un oligomère (I) ou (I'), le substituant terminal R_1 peut être obtenu en utilisant pour la dernière étape de couplage, un monomère N-protégé par un groupe R_1, ou en effectuant une réaction d'acylation avec le réactif approprié.

Lorsque l'un au moins des substituants R'_2 ou R''_2 est différent de H, le groupe terminal $-NR'_2R''_2$ d'un oligomère (I') est obtenu en choisissant comme premier monomère N-protégé libre sur sa fonction acide, un composé résultant de la réaction d'un composé (II) avec une amide $HNR'_2R''_2$, répondant (avant protection de la fonction amine) à la formule $NHR'-A-CO-HNR'_2R''_2$.

Lorsque le substituant R_2 d'un oligomère (I) est différent de H, le groupe terminal OR_2 est obtenu par le choix du groupe protecteur de la fonction acide dans le premier monomère.

Un oligomère (I) ou (I') peut également être obtenu par un procédé de polymérisation en phase solide, selon une stratégie classique de synthèse peptidique : une résine portant des substituants amine est fonctionnalisée à l'aide d'un acide aminé, puis le fragment ainsi fixé sur la résine est allongé depuis le côté C-terminal vers le côté N-terminal, le fragment final étant protégé sur son extrémité N-terminale avant d'être séparé de la résine. Un tel procédé en phase solide permet d'obtenir les oligomères (I) et (I') dans lesquels les substituants respectifs R_2, R'_2 et R''_2 sont H.

De manière plus précise, un procédé de polymérisation en phase solide pour l'obtention d'un oligomère de l'invention comprend les étapes suivantes :

a) on fonctionnalise une résine support portant des substituants amine par un composé $H-NR'-A-CO-OH$ (II') qui répond à la définition donnée pour (II) et dans lequel le groupe amino a été protégé au préalable ;

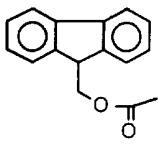
b) on allonge le fragment ainsi fixé sur la résine support à partir du côté C-terminal vers la côté N-terminal par (n-2) réactions successives de couplage de monomère (II), ledit monomère (II) étant utilisé en excès, différents monomères (II) pouvant être utilisés dans les étapes de couplage successives ;

c) on effectue une dernière réaction de couplage d'un monomère protégé sur sa fonction N-terminale par un groupe R_1 stable dans les conditions dans lesquelles l'oligomère doit être séparé du support ;

d) on sépare l'oligomère de la résine support.

Dans le procédé de polymérisation en phase solide, chaque étape de couplage d'un composé (II) - sur la résine support initiale dans l'étape a) ou sur la résine portant un fragment issu d'un composé (II) dans les étapes b) et c) - comprend la protection du groupe amino du composé (II), la réaction de couplage proprement dite en présence d'un agent de couplage, le lavage du produit obtenu après le couplage, puis la déprotection du groupe amino de l'unité -NR'-A-CO- fixée.

La protection du groupe amino de l'acide aminé peut être effectuée par exemple par un groupe *tert*-butyloxycarbonyle (désigné ci-après par Boc-) ou un groupe 9-fluorényl-méthyloxycarbonyle (désigné ci-après par Fmoc) représenté par la formule

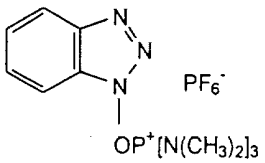


La protection est effectuée selon les procédés connus de l'art antérieur. Par exemple, la protection par le groupe Boc- peut être obtenue en faisant réagir l'acide aminé avec le di-tert-butylpyrocarbonate (Boc_2O).

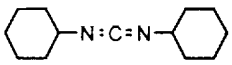
Pour l'étape a), on peut utiliser comme résine support toute résine utilisée de manière classique dans les synthèses peptidiques. A titre d'exemple, on peut citer une résine 4-méthylbenzydrylamine.HCl (désignée ci-après par MBHA.HCl), ou une résine dite Merrifield, qui est un copolymère de styrène et de divinylbenzène fonctionnalisée par le chlorobenzyle. Les deux résines sont des résines commerciales distribuées notamment par les sociétés Novabiochem et Bachem.

L'agent de couplage peut être choisi parmi les agents de couplage classiquement utilisés en synthèse peptidique. On peut citer par exemple :

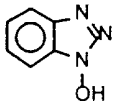
l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium (ci-après désigné par BOP)



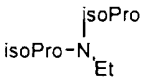
le dicyclohexylcarbodiimide (désigné ci-après par DCC)



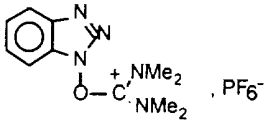
en présence de 1-hydroxybenzotriazole (désigné ci-après par HOBT)



la diisopropyléthylamine (désignée ci-après par DIEA),



l'hexafluorophosphate de O-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium (désigné ci-après par HBTU)



On peut également utiliser pour le couplage, les anhydrides symétriques préformés à partir d'un monomère (II) N-protégé et de la DCC.

Le lavage des produits obtenus après chaque phase de couplage peut être effectué à l'aide des solvants utilisés classiquement dans les synthèses peptidiques en phase solide. A titre d'exemple, on peut citer la diméthylformamide (DMF), le méthanol et le dichlorométhane (DCM).

Le réactif utilisé pour la déprotection du groupe amine après une étape de couplage dépend de l'agent de protection utilisé. Par exemple, si la protection est effectuée par un groupe Boc, la déprotection est effectuée avantageusement à l'aide d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA). Si la protection est effectuée par un groupe Fmoc-, la déprotection peut être effectuée par la pipéridine. De manière générale, les groupes protecteurs et les réactifs de déprotection utilisés de manière connue lors des synthèses peptidiques en

phase solide peuvent être utilisés lors de la synthèse des oligomères de la présente invention.

L'oligomère peut avantageusement être séparé de la résine par traitement par un acide. A titre d'exemple, on peut citer l'acide trifluoroacétique ou l'acide fluorhydrique en présence d'anisole, suivant le type de résine utilisée. Dans ces conditions, la protection du groupe amino avant séparation de la résine est effectuée par un groupe uréthane stable dans les conditions acide de clivage ou par un groupe acyle stable dans les mêmes conditions. Lorsque la séparation est effectuée par l'acide trifluoroacétique, le groupe amino est protégé par exemple par un groupe Fmoc défini précédemment.

La préparation des oligomères en phase solide est réalisée de manière avantageuse dans un synthétiseur automatique utilisé de manière classique pour la synthèse des peptides sur support solide. Dans ce type d'appareil, la succession des différentes opérations de couplage, de lavage, de déprotection, est pilotée par un ordinateur.

Les oligomères (I) ou (I') de l'invention peuvent constituer des structures organisées et rigides, par exemple des structures en hélice. Ils sont avantageusement utilisés pour la synthèse de polypeptides et de protéines artificiels constituant des mimes de polypeptides ou de protéines naturels, par remplacement du (des) fragment(s) structurant(s) en hélice α de la protéine ou du polypeptide naturel par un fragment provenant d'un oligomère (I) ou (I'). Cet oligomère (I) ou (I') est préparé par le couplage de plusieurs molécules du même monomère acide aminé (II), ou de monomères (II) différents.

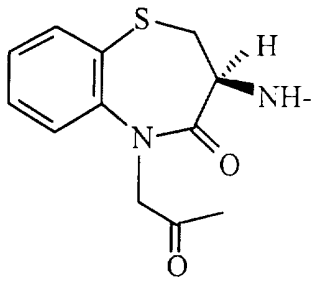
Le procédé de préparation d'une protéine ou d'un polypeptide artificiel analogue d'une protéine ou d'un polypeptide naturel consiste à effectuer des réactions de couplage de synthèse peptidique en phase solide. Il est caractérisé en ce que, dans la succession des réactions de couplage des acides α-aminés constituant la protéine ou le polypeptide naturel, une ou plusieurs séquences d'acides α-aminés sont remplacées par un oligomère (I) ou (I') ayant une longueur équivalente à celle de la séquence d'acides α-aminés

remplacée. Dans un cas particulier, la séquence d'acides α-aminés constituant l'hélice α de la protéine ou du peptide naturel est remplacée par un oligomère (I) ou (I').

L'oligomère est préparé au préalable selon le procédé de polymérisation en phase solide tel que décrit ci-dessus et il est utilisé sous une forme dans laquelle la fonction amine N-terminale est protégée par un groupe protecteur résistant aux conditions dans lesquelles l'oligomère sera séparé de la résine support. A titre d'exemple d'un tel groupe protecteur, on peut citer le groupe 9-fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc).

Une protéine ou un polypeptide artificiel analogue d'une protéine ou d'un polypeptide naturel donné comprend un ou plusieurs fragments structurants et un ou plusieurs fragments peptidiques. Il est caractérisé en ce que le ou les fragments peptidiques sont identiques à ceux de la protéine ou du polypeptide naturel correspondant, et en ce que le ou les fragments structurants sont constitués par un fragment d'un oligomère (I) ou (I') qui a une longueur sensiblement identique à celle la partie structurante en hélice α de la protéine ou du polypeptide naturel.

A titre d'exemple, on peut citer une protéine artificielle analogue du CRF humain ou hCRF ("human corticotropin releasing factor" c'est-à-dire "facteur humain de libération de la corticotropine"). Une telle protéine artificielle a une structure analogue à celle du CRF, dans laquelle la partie centrale formant l'hélice α, qui est une partie structurante sans activité biologique, a été remplacée par une séquence $-(NR'-A-CO)_n-$, dans laquelle n est 8 ou 9 et -NR'-A-CO- est un fragment -DBT- dérivé de la (3S)[amino]-5-(carbonylméthyl)-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepin-4(5H)-one et représenté par la formule



Les deux protéines artificielles, analogues du CRF humain, présentent une certaine affinité pour les récepteurs du CRF humain.

La présente invention est décrite plus en détail à l'aide des exemples suivants, qui sont donnés à titre d'illustration et auxquels l'invention n'est pas limitée.

Exemple 1

Préparation d'une résine Boc-$(DBT)_5$- MBHA

La polymérisation a été effectuée en phase solide à l'aide d'un synthétiseur automatique Applied 433 en stratégie Boc en utilisant :

- comme acide aminé (II) : la (3S)[amino]-5-(carbonylméthyl)-2,3-dihydro-1,5-benzothiaepin-4(5H)-one, désignée ci-après par H-DBT-OH, dans laquelle la fonction amine a été protégée par un groupe Boc défini précédemment,
- comme résine support : 2 g de résine MBHA.HCl substituée à 0,8 mmol/g par des fonctions amine (commercialisée par Novabiochem).

A partir de la résine MBHA substituée, on a effectué 5 fois la séquence d'opérations suivantes :

- protection de la fonction amine de 1,25 éq. de H-DBT-OH par réaction avec le di-tert-butylpyrocarbonate Boc_2O, pour obtenir 704 mg (1,25 équivalent) de Boc-DBT-OH ;
- couplage dans le diméthylformamide (DMF), à l'aide de HBTU (758 mg) comme agent de couplage en présence de DIEA (0,62 ml), à pH 8-9 ;
- lavage du produit obtenu 1 fois dans le DMF, puis 2 fois dans le méthanol et 2 fois dans le dichlorométhane (DCM) ;
- déprotection par traitement à l'aide d'un mélange d'acide trifluoroacétique (TFA), de dichlorométhane (DCM) et d'éthanedithiol (EDT) dans les proportions suivantes : TFA/DCM/EDT (40/60/2) pendant 2 min, puis filtration, puis second traitement pendant 28 min à l'aide du même mélange TFA/DCM/EDT, la déprotection étant omise après la dernière étape de couplage.

L'on a ainsi récupéré une résine MBHA portant des fragments Boc-$(DBT)_5$-, désignée ci-après par résine Boc-$(DBT)_5$-MBHA.

Exemple 2

Préparation d'un oligomère Ac-$(DBT)_5$-NH_2

250 mg d'une résine Boc-$(DBT)_5$-MBHA obtenue selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 1 ont été placés dans un réacteur. Le groupement Boc- a été éliminé à l'aide d'une solution constituée par un mélange TFA/DCM/EDT = 40/60/2, en deux étapes d'une durée respective de 2 min et de 28 min séparées par une filtration. 5 ml d'une solution 50/50 d'anhydride acétique Ac_2O dans le DCM ont ensuite été ajoutés et le mélange a été agité à température ambiante pendant 1 heure. La résine Ac-$(DBT)_5$-MBHA obtenue a été lavée 1 fois dans le DMF, puis 2 fois dans le méthanol et 2 fois dans le dichlorométhane (DCM), puis séchée sous vide. La résine séchée a ensuite été placée sous vide.

Pour obtenir l'oligomère libre, on a introduit la résine séchée Ac-$(DBT)_5$-MBHA dans un réacteur en téflon contenant de l'anisole (1 ml/g de résine) et l'on a introduit de l'acide fluorhydrique anhydre par distillation dans le réacteur (10 ml de HF/g de résine). Le milieu réactionnel a été agité à 0°C pendant 1 heure, puis on a éliminé HF par distillation, on a introduit de l'éther anhydre, et on a filtré, cette séquence d'opérations étant renouvelée plusieurs fois.

Le produit brut a été extrait par le diméthylsulfoxyde (DMSO), additionné d'eau, puis lyophilisé, et l'on a obtenu un produit blanc floconneux. 100 mg de ce produit ont été purifiés en HPLC (chromatographie liquide haute pression) préparative et le produit purifié a été analysé par spectrométrie de masse [m/z 616.17 (dichargé, $M+H^+$)].

Le temps de rétention (Rt) HPLC est de 15,3 min (détection UV 214 nm, gradient : 0% (A) à 100% (B) en 25 min) ce qui confirme la pureté du produit obtenu.

Exemple 3

Préparation d'oligomères Ac-$(DBT)_n$-NH_2, n>5

Une résine obtenue selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 1 a été soumise à deux séquences supplémentaires protection/couplage/lavage/déprotection telles que décrites dans l'exemple 1, et l'on a obtenu une résine portant des fragments Boc-$(DBT)_7$-. 250 mg de cette résine ont été traités selon le mode opératoire de l'exemple 2, pour obtenir finalement l'oligomère Ac-$(DBT)_7$-NH_2.

De la même manière, on a préparé l'oligomère Ac-$(DBT)_9$-NH_2 et l'oligomère Ac-$(DBT)_{11}$-NH_2 en soumettant une résine obtenue selon le mode opératoire décrit dans l'exemple A, respectivement à 4 et 6 séquences supplémentaires protection/couplage/lavage/déprotection, puis en traitant chacune des résines obtenues selon le mode opératoire de l'exemple 2.

Les différents oligomères ont été analysés de la même manière que l'oligomère Ac-$(DBT)_5$-NH_2. Les résultats sont les suivants :

Ac-$(DBT)_7$-NH_2	m/z 849,9 (dichargé, $M+H^+$)
	Rt HPLC = 28,4 min (détection UV 214 nm,
	gradient: 0% (A) à 100% (B) en 50 min)
Ac-$(DBT)_9$-NH_2	m/z 1084,5 (dichargé, $M+H^+$)
	Rt HPLC = 32,2 min (détection UV 214 nm,
	gradient: 0% (A) à 100% (B) en 50 min)
Ac-$(DBT)_{11}$-NH_2	Rt HPLC = 33,3 min (détection UV 214 nm,
	gradient: 0% (A) à 100% (B) en 50 min)

Exemple 4

Synthèse d'oligomères H-$(DBT)_n$-OH

Divers oligomères H-$(DBT)_n$-OH ont été préparés pour n = 2, 3, 5, 7 et 9. On a mis en œuvre un procédé analogue à celui des exemples 1 et 2, en utilisant :

- une résine de Merrifield portant 0,66 mmol de DBT par g de résine,
- 2,5 équivalents de Boc-DBT-OH par étape de couplage
- le BOP comme agent de couplage.

La résine de Merrifield portant 0,66 mmol de DBT par g de résine a été obtenue de la manière suivante. On a dissous

2,5 g (7,1 mmol) de Boc-DBT-OH dans 20 ml d'éthanol à 95%, on a ajouté de l'eau jusqu'à la limite de précipitation, puis 1,17 g (3,55 mmol) de Cs_2CO_3. Le pH a été maintenu à 7 et la solution agitée pendant 30 min à température ambiante. Après évaporation de l'éthanol, on a lyophilisé le sel de césium Boc-DBT-O^-Cs^+ obtenu. On a ajouté 3,32 g (6,80 mmol) de ce sel à 3 g d'une résine de Merrifield fonctionnalisée par le chlorobenzyle de 1 à 2 mmol/g (commercialisée par la société Novabiochem) dans 20 ml de DMF. On a agité le milieu réactionnel à 60°C pendant 48 h, puis on a séparé par filtration la résine obtenue, on l'a lavée par DMF, DCM, MeOH, l'eau et à nouveau par DCM, puis séchée sous vide. Le taux de substitution de la résine par des groupes Boc-DBT-O- est de 0,66 mmol/g de résine.

Pour un oligomère contenant n unités DBT, on a effectué (n-1) fois la réaction de couplage sur la résine de Merrifield fonctionnalisée par DBT. A la fin de la polymérisation, les groupes Boc ont été supprimés et la résine clivée de la même manière que dans l'exemple 2. Les oligomères ont été purifiés par HPLC sur une colonne C18, leur pureté a été contrôlée par HPLC sur une colonne C18 Waters, 150 x 4,6 mm, 100 Å, 5 µm. La caractérisation a été effectuée par spectrométrie de masse. Les résultats sont les suivants :

$H-(DBT)_5-NH_2$ Rt HPLC = 18,2 min (détection UV 214 nm, gradient: 30% (A) à 60% (B) en 20 min)

$H-(DBT)_3-NH_2$ Rt HPLC = 11,6 min (détection UV 214 nm, gradient: 30% (A) à 60%(B) en 15 min)

$H-(DBT)_2-NH_2$ Rt HPLC = 5,4 min (détection UV 214 nm, gradient: 30% (A) à 40% (B) en 10 min)

Les produits obtenus ont en outre été caractérisés par 1H RMN du proton à 300 MHz.

Exemple 5

Synthèse d'une protéine artificielle analogue du hCRF

H-Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-$(DBT)_8$-Lys-Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH_2

Le hCRF (corticotropin releasing factor (human)) est un peptide amidé de 41 amino acides. La partie en hélice α du

hCRF (constituée par 30 acides aminés) a été remplacée par un fragment d'oligomère -$(DBT)_8$- pour obtenir la protéine artificielle du présent exemple.

Au cours d'une première étape, on a préparé l'oligomère Fmoc-$(DBT)_8$-OH par un procédé de polymérisation en phase solide sur une résine Merrifield fonctionnalisée à 0,66 mmol de DBT par g de résine obtenue selon le procédé décrit dans l'exemple 4. On a placé 0,76 g de cette résine fonctionnalisée dans le réacteur d'un synthétiseur automatique et on a effectué 6 couplages successifs dans des conditions analogues à celles décrite dans l'exemple 1, en utilisant à chaque couplage 4 équivalents (0,528 g, 2 mmol) de Boc-DBT-OH et 20 ml d'une solution de DCC et de HOBT 1M dans le DMF comme agent de couplage. Après chaque étape de couplage, la fonction amine du fragment fixé sur la résine a été déprotégée par une solution de TFA. Une septième réaction de couplage a été effectuée dans les mêmes conditions en utilisant Fmoc-DBT-OH au lieu de Boc-DBT-OH. Ensuite, la résine obtenue a été séchée sous vide, puis traitée par HF en présence d'anisole selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 2. Après élimination de HF par distillation, le résidu a été lavé plusieurs fois à l'éther, et filtré en présence de la résine. Le produit brut récupéré a été dissous dans le DMSO et précipité par l'eau, lavé à l'éther et séché sous vide sur P_2O_5, ce qui a permis d'obtenir 400 mg de produit brut. 100 mg de ce produit brut ont été purifiés en HPLC préparative et le produit purifié Fmoc-$(DBT)_8$-OH obtenu a été analysé par spectrométrie de masse. Rt HPLC = 34,0 min (détection UV 214 nm, gradient: 0% (A) à 100% (B) en 50 min).

On a ensuite synthétisé la protéine artificielle dans un synthétiseur automatique en stratégie Boc, à partir d'une résine MBHA permettant de générer la fonction amide C-terminale, selon le schéma de synthèse suivant, dans lequel le fragment AA représente le fragment de l'acide aminé impliqué dans la réaction de couplage. Les acides aminés successivement couplés sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

|Cycles de :
|couplage : Boc-AA-OH, 4 éq.
|DCC/HOBt, 60 min
|Déprotection : TFA, 30 min
↓

H-Lys(Z)-Leu-Met-Glu(Ochx)-Ile-Ile-NH-résine

|
|Double couplage : Fmoc-$(DBT)_8$-OH,
|BOP/DIEA, 12 heures
|Déprotection : Pipéridine/DMF (20/80)
↓

H-$(DBT)_8$-Lys(Z)-Leu-Met-Glu(Ochx)-Ile-Ile-NH-résine

|Cycles de :
|couplage : Boc-AA-OH, 4 éq.
|DCC/HOBt, 60 min
|Déprotection : TFA, 30 min
↓

H-Ser(Bzl)-Glu(Ochx)-Glu(Ochx)-Pro-Pro-(($DBT)_8$-Lys(Z)-Leu-Met-Glu(Ochx)-Ile-Ile-NH-résine

|
| HF/anisole (10/1)/0°C
| 60 min
↓

H-Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-$(DBT)_8$-Lys-Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH_2

On a placé dans la colonne du réacteur d'un synthétiseur automatique fonctionnant en stratégie Boc, 0,625 g de résine MBHA.HCl substituée à 0,8 mmol et 4 équivalents de chacun des amino-acides requis, correspondant aux quantités suivantes :

Aminoacide	Quantité (mg)
Boc-Ile-OH	463
Boc-Ile-OH	463
Boc-Glu(Ochx)-OH	659
Boc-Met-OH	498
Boc-Leu-OH.H_2O	499
Boc-Lys(Z)-OH	761
Fmoc-$(DBT)_8$-OH	1056

Boc-Pro-OH	430
Boc-Pro-OH	430
Boc- Glu(Ochx)-OH	659
Boc- Glu(Ochx)-OH	659
Boc-Ser(Bzl)-OH	591

Dans le tableau ci-dessus, "chx" signifie "cyclohexyle", "Z" signifie "benzyloxycarbonyle" et "Bzl" signifie "benzyle".

Au cours d'une première étape, on a effectué la synthèse automatique du peptide-résine H-Lys(Z)-Leu-Met-Glu(Ochx)-Ile-Ile-NH-résine en effectuant 6 étapes de couplage successives d'une durée de 60 min, en utilisant le DCC dans HOBt comme agent de couplage, chaque acide aminé étant protégé par un groupe Boc, chaque réaction de couplage étant suivie d'une étape de déprotection par TFA pendant 30 min.

Au cours d'une deuxième étape, le couplage du Fmoc-$(DBT)_8$-OH a été effectué selon le processus suivant. 1056 mg (1 mmol) d'oligomère H-$(DBT)_8$-OH ont été couplés au peptide résine H-Lys(Z)-Leu-Met-Glu(OChx)-Ile-Ile-MBHA résine en utilisant un mélange BOP/DIEA comme agent de couplage, pendant 12 heures. Le produit réactionnel a ensuite été traité par une solution à 20% de pipéridine dans le DMF pour éliminer le groupement protecteur Fmoc.

Au cours d'une troisième étape, l'allongement par les acides aminés N-protégés a été poursuivi en mode automatique pour obtenir le composé Boc-Ser(Bzl)-Glu(Ochx)-Glu(Ochx)-Pro-Pro-$(DBT)_8$-Lys(Z)-Leu-Met-Glu(OChx)-Ile-Ile-MBHA résine.

Après la fin de la synthèse, on a séché le composé porté par la résine sous vide, on l'a traité par une solution TFA/DCM/EDT (50/50/2) pendant 2 min, puis pendant 28 min. On a ensuite traité la résine portant le composé par HF en présence d'anisole suivant le mode opératoire décrit précédemment. On a purifié par HPLC le composé obtenu, et on l'a analysé par spectrométrie de masse comme indiqué dans l'exemple 2. Les résultats obtenus sont les suivants :

Rt HPLC = 25,0 min (détection UV 214 nm, gradient: 0% (A) à 100% (B) en 50 min).

Exemple 6

Synthèse d'un analogue du hCRF

Dans le présent exemple, on a cherché à remplacer la partie en hélice α par un fragment d'oligomère -$(DBT)_9$-.

La protéine artificielle obtenue a la structure primaire suivante :

H-Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-$(DBT)_9$-Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH_2.

Elle a été synthétisé par un procédé analogue à celui de l'exemple 5, mais en préparant au préalable un oligomère Fmoc-$(DBT)_9$-OH et en utilisant les acides aminés du tableau de l'exemple 5, à l'exception du Boc-Lys(Z)-OH.

REVENDICATIONS

1. Oligomère représenté par l'une des formules générales

R_1-(NR'-A-CO)$_n$-OR_2 (I) ou R_1-(NR'-A-CO)$_n$-NR'$_2$R"$_2$ (I')

dans lesquelles :

- l'unité -NR'-A-CO- représente un mime contraint non peptidique inducteur de coude β, d'un fragment dipeptide ou tripeptide ;
- R_1 représente un groupe acyle R_3-CO- ou un groupe R_3-O-CO- dans lesquels R_3 représente un groupe benzyle, un groupe tert-butyle ou un groupe 9-fluorénylméthyle ;
- R_2 représente H, un groupe alkyle ou un groupe benzyle ;
- R'$_2$ et R"$_2$ représentent indépendamment l'un de l'autre H, un groupe alkyle, ou un groupe benzyle ;
- R' représente un atome d'hydrogène ou bien R' forme un groupe monocyclique ou un groupe polycyclique éventuellement condensé avec l'atome N et le groupe A ;
- n est compris entre 2 et 40.

2. Oligomère selon la revendication 1, caractérisé en ce que A représente un groupe hétérocyclique aromatique ou non, monocyclique ou polycyclique éventuellement condensé.

3. Oligomère selon la revendication 1, caractérisé en ce que le groupe -NR'-A-CO- représente un groupe hétérocyclique aromatique ou non, monocyclique ou polycyclique éventuellement condensé.

4. Oligomère selon la revendication 1, caractérisé en ce que le groupe -NR'-A-CO- comprend un centre asymétrique, qui peut être de configuration R ou de configuration S.

5. Oligomère selon la revendication 1, caractérisé en ce que les unités récurrentes -NR'-A-CO- sont toutes identiques.

6. Oligomère selon la revendication 1, caractérisé en ce que les unités récurrentes -NR'-A-CO- sont différentes.

7. Procéde de préparation d'un oligomère selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer une polymérisation d'au moins un acide aminé constituant un mime contraint non peptidique inducteur de coude β, d'un di-

peptide ou d'un tripeptide et répondant à la formule NHR'-A-CO-OH (II), dans laquelle R' représente un atome d'hydrogène ou bien R' forme un groupe monocyclique ou un groupe polycyclique éventuellement condensé avec l'atome N et le groupe A.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que A représente un groupe hétérocyclique aromatique ou non, monocyclique ou polycyclique éventuellement condensé.

9. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le groupe -NR'-A-CO- représente un groupe hétérocyclique aromatique ou non, monocyclique ou polycyclique éventuellement condensé.

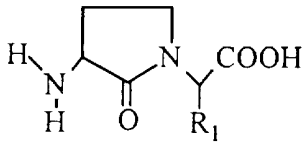
10. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le groupe -NR'-A-CO- comprend un centre asymétrique.

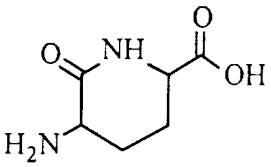
11. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la polymérisation est effectuée en solution.

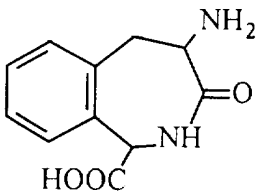
12. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la polymérisation est effectuée en phase solide, selon une stratégie de synthèse peptidique.

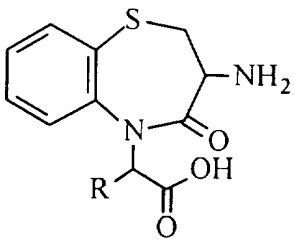
13. Procédé selon la revendicaton 7, caractérisé en ce que le composé (II) est choisi parmi les composés suivants, dans lesquels :

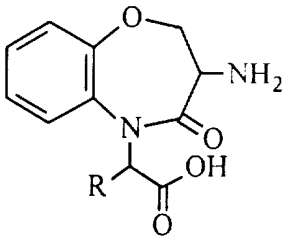
- R, et le cas échéant R_4, sont choisis indépendamment l'un de l'autre parmi les groupes constituants les chaînes latérales des α-aminoacides ;
- R_5 et R_6 représentent indépendamment l'un de l'autre H, CH_3-, ou C_6H_5-CH_2- ;
- R_7 représente H ou un phényle ;
- R_8 représente H, CH_3-, C_2H_5- ou C_6H_5-CH_2- ;
- les substituants X et Z sont définis de manière spécifique pour chaque composé qui les contient, et
- Me représente un groupe méthyle ;

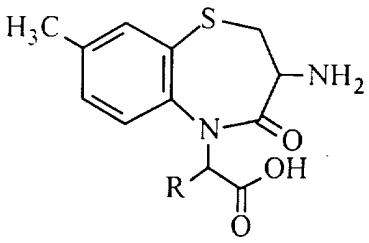


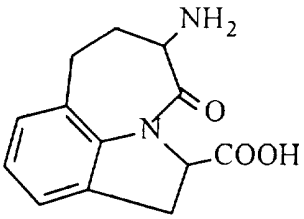


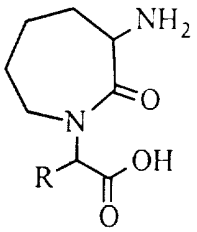


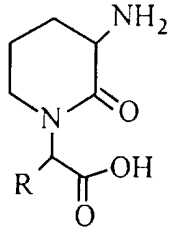


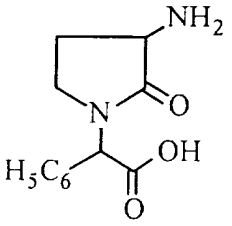


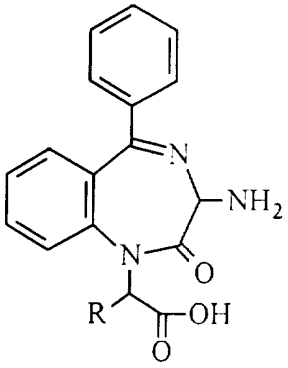


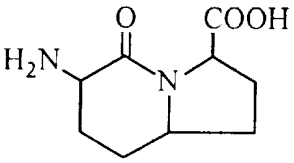


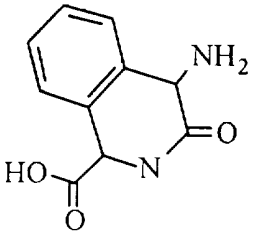


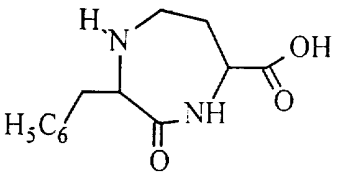


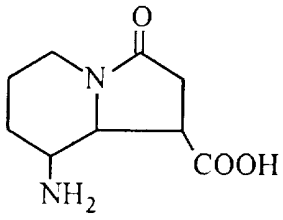


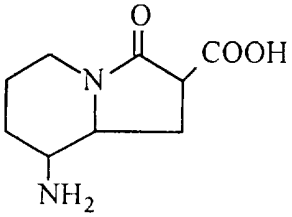


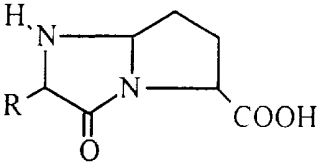


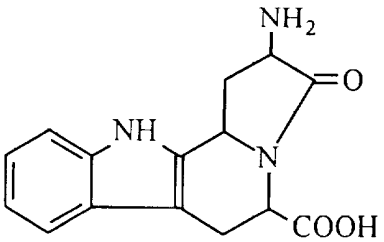


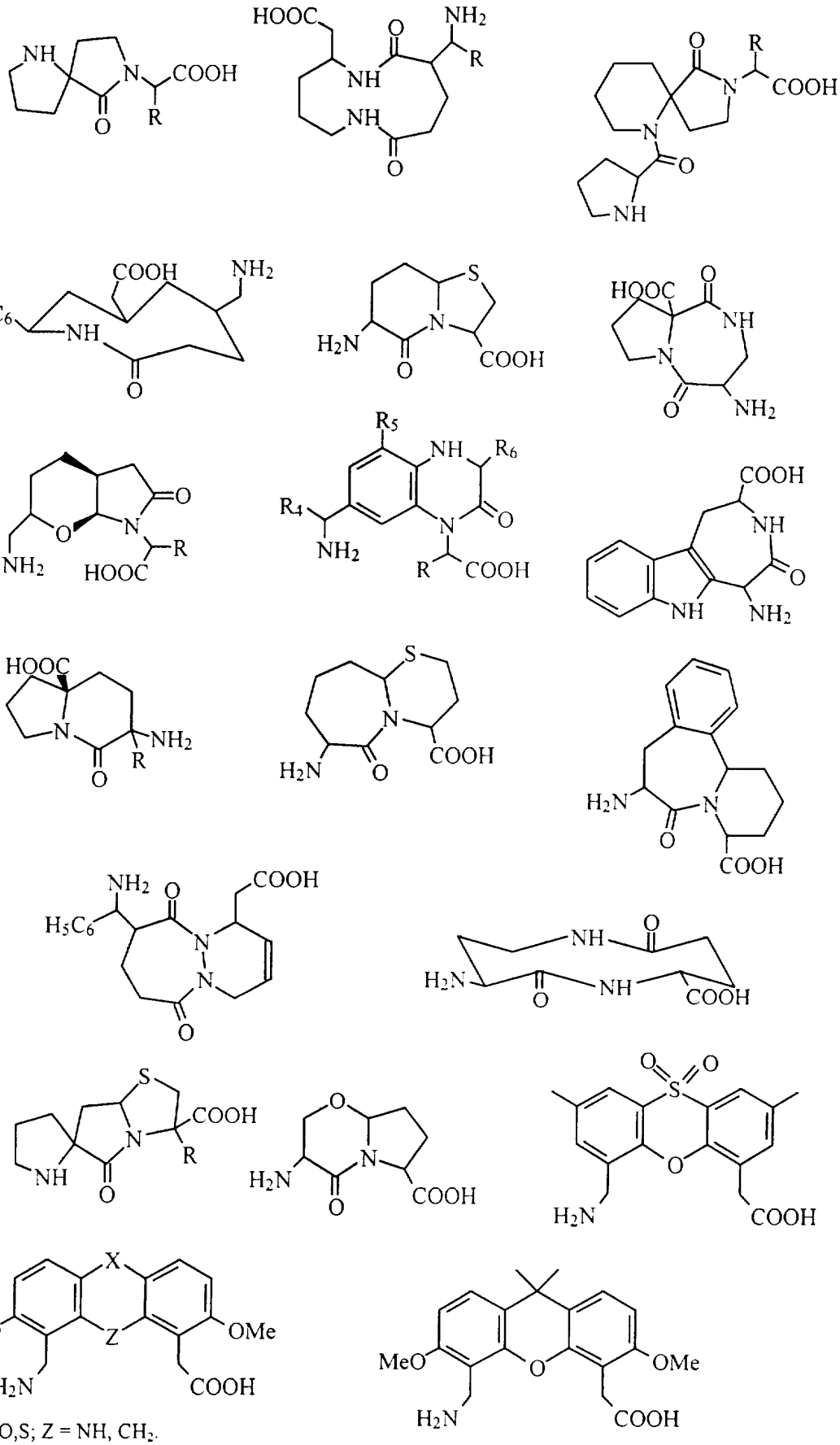




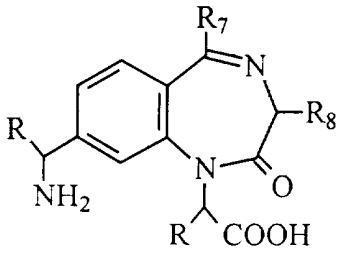


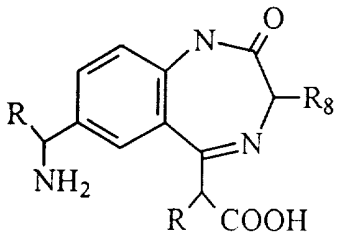


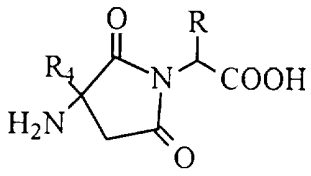


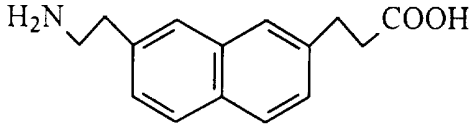


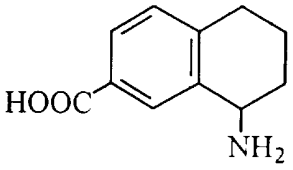
X = O,S; Z = NH, CH_2.

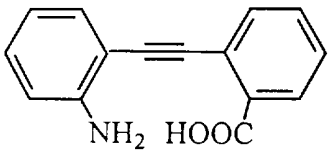


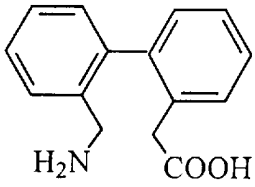


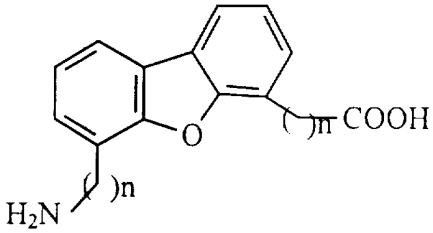


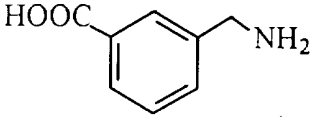


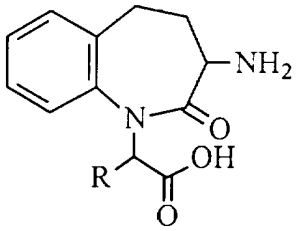


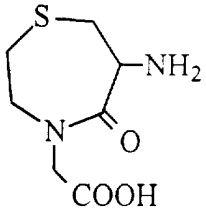


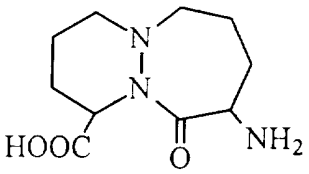


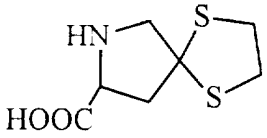


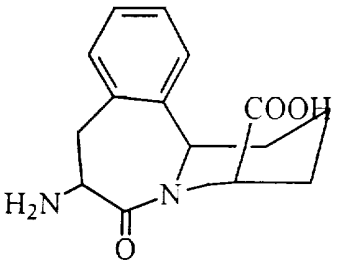


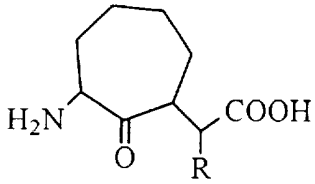


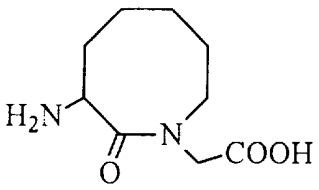


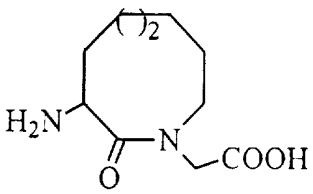


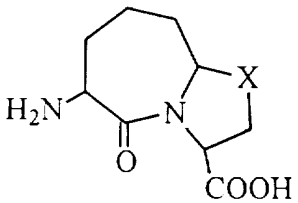




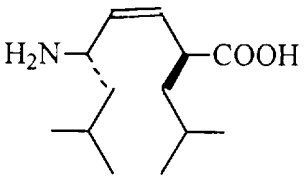


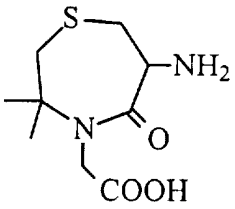


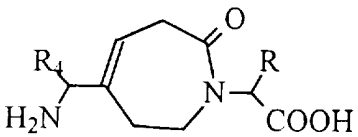


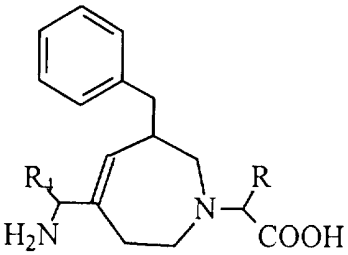


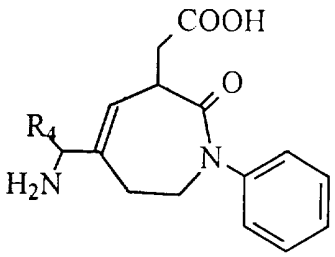
X = CH_2, S

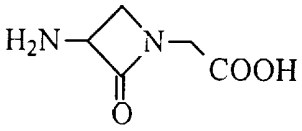


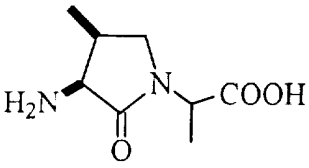


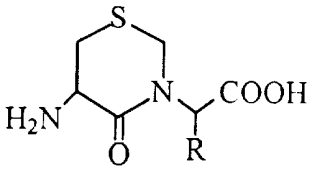


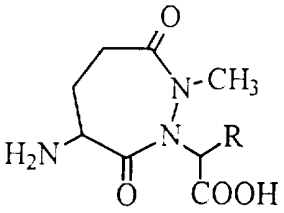


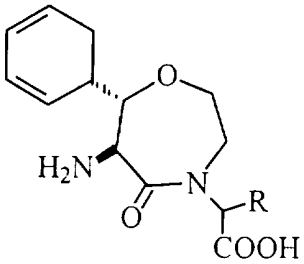


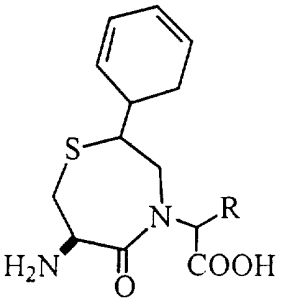


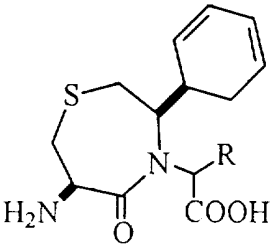


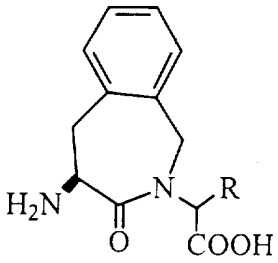


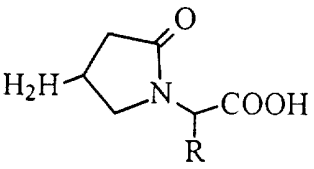


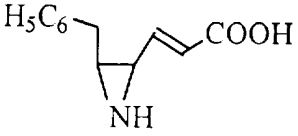


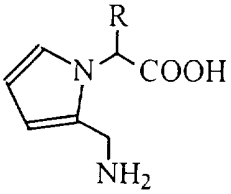


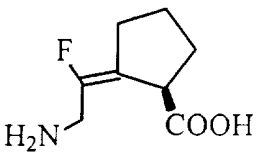


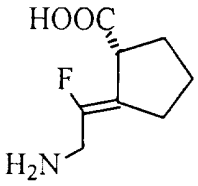


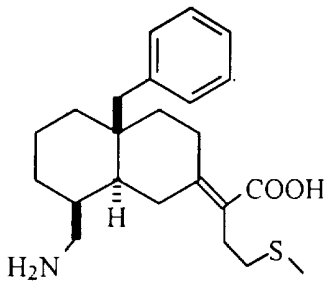


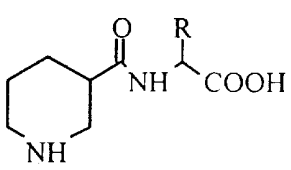


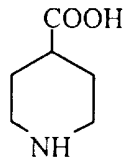


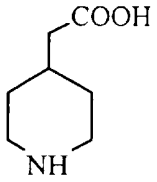


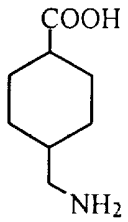


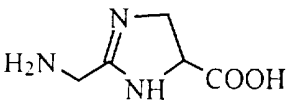


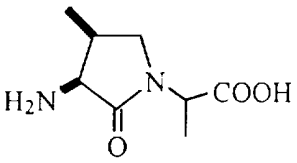


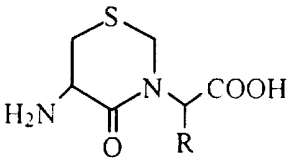


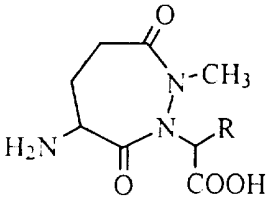


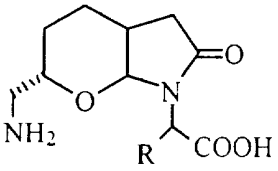


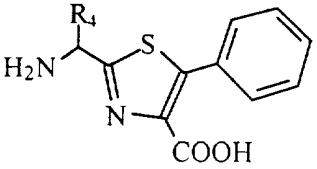


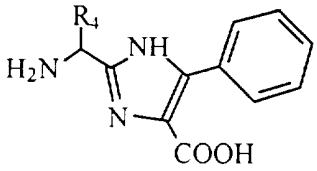


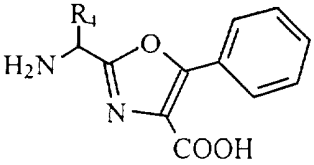


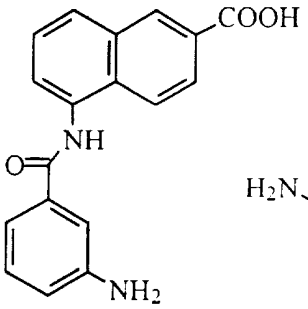


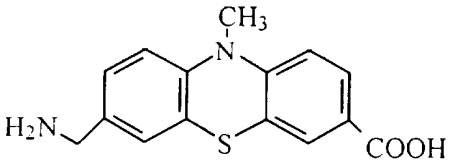


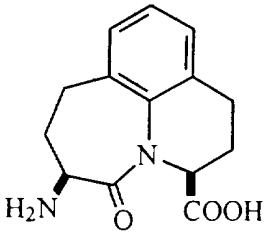


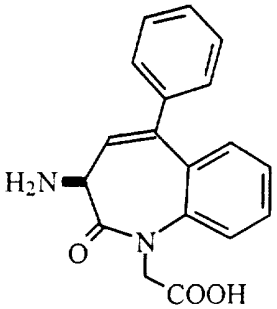


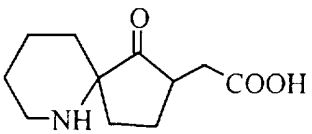


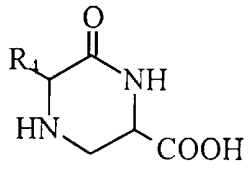


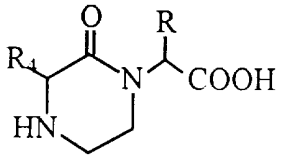


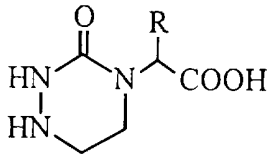


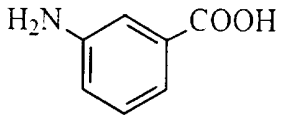


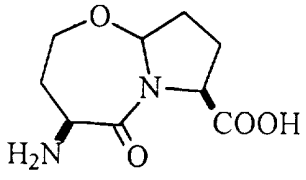


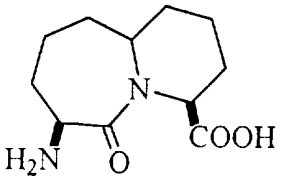


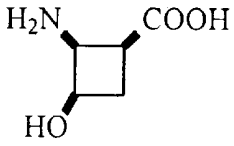


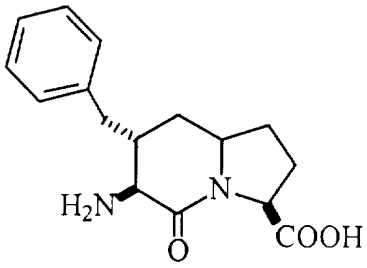


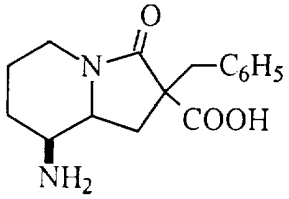


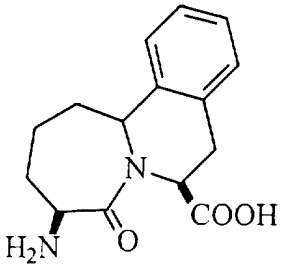


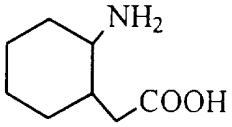


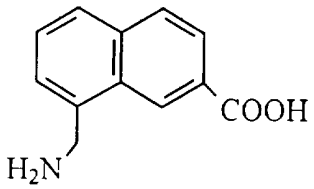


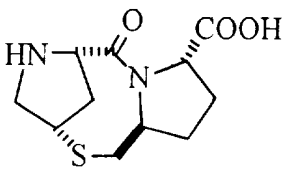


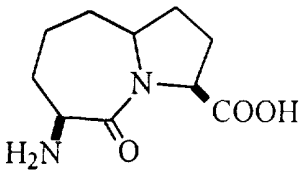


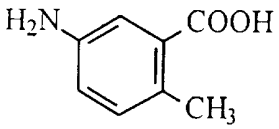


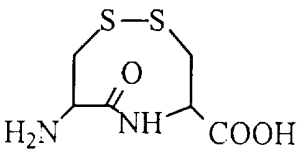


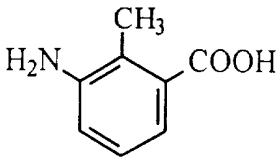


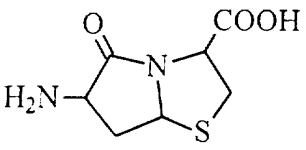


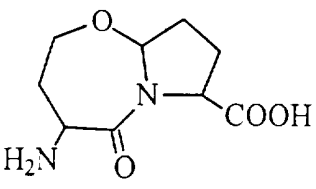


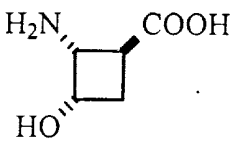


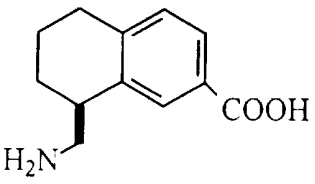


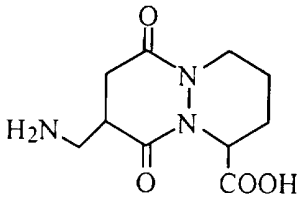


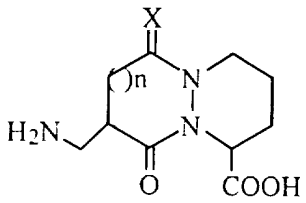






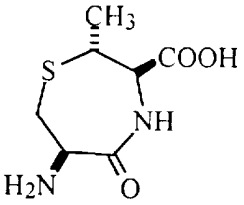


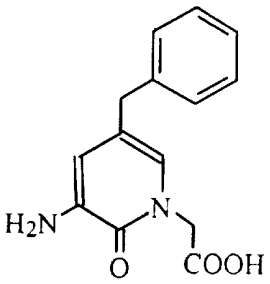


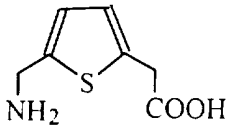


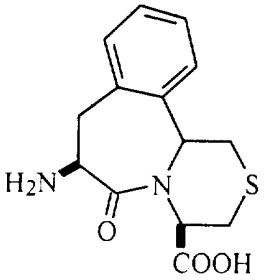
X = H_2, n = 0, 1, 2, 3

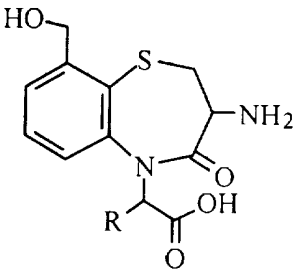
X = O, n = 0, 1, 2, 3

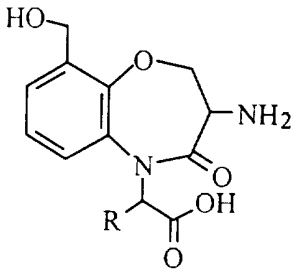


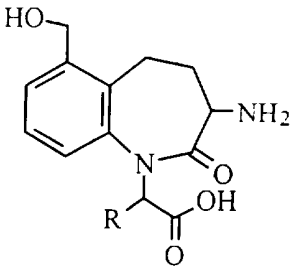












14. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que :

a) on fonctionnalise une résine support portant des substituants amine par un composé H-NR'-A-CO-OH (II') qui répond à la définition donnée pour (II) et dans lequel le groupe amino a été protégé au préalable ;

b) on allonge le fragment ainsi fixé sur la résine support à partir du côté C-terminal vers la côté N-terminal par (n-2) réactions successives de couplage de monomère (II), ledit monomère (II) étant utilisé en excès, différents monomères (II) pouvant être utilisés dans les étapes de couplage successives ;

c) on effectue une dernière réaction de couplage d'un monomère protégé sur sa fonction N-terminale par un groupe R_1 stable dans les conditions dans lesquelles l'oligomère doit être séparé du support ;

d) on sépare l'oligomère la résine support.

15. Procédé de préparation d'une protéine ou d'un polypeptide artificiel analogue d'une protéine ou d'un polypeptide naturel, consistant à effectuer des réactions de couplage de synthèse peptidique en phase solide, caractérisé en ce que, dans la succession des réactions de couplage des acides α-aminés constituant la protéine ou le polypeptide naturel, une ou plusieurs séquences d'acides α-aminés sont remplacés par un oligomère (I) ou (I') ayant une longueur équivalente à celle de la séquence d'acides α-aminés remplacée.

16. Protéine ou polypeptide artificiel analogue d'une protéine ou d'un polypeptide naturel donné, comprenant un ou plusieurs fragments structurants et un ou plusieurs fragments peptidiques, caractérisé en ce que le ou les fragments peptidiques sont identiques à ceux de la protéine ou du polypeptide naturel correspondant, et en ce que le ou les fragments structurants sont constitués par un fragment d'un oligomère (I) ou (I') qui a une longueur sensiblement identique à celle la partie structurante en hélice α de la protéine ou du polypeptide naturel.

17. Protéine analogue du hCRF (facteur humain de libération de la corticotropine), caractérisé en ce qu'elle répond à l'une des formules suivantes :

H-Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-$(DBT)_8$-Lys-Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH_2

ou

H-Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-$(DBT)_9$-Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH_2

dans lesquelles DBT est un fragment dérivé de la (3S)[amino]-5-(carbonylméthyl)-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepin-4(5H)-one.

INPI
INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

2803594

N° d'enregistrement national

FA 586884
FR 0000288

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	STIGERS KIMBERLY D ET AL: "Designed molecules that fold to mimic protein secondary structures." CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, vol. 3, no. 6, décembre 1999 (1999-12), pages 714-723, XP002148554 ISSN: 1367-5931	1-12	C07K7/02 C07K14/575
Y	* le document en entier *	13-16	
X	GELLMAN, SAMUEL H.: "FOLDAMERS A MANIFESTO" ACC CHEM RES (1998) 31(4) 173-180, XP002148555	1-12	
Y	* le document en entier *	13-16	
X	WO 97 30975 A (CALIFORNIA INST OF TECHN) 28 août 1997 (1997-08-28)	1-12	
Y	* le document en entier *	13-16	
A	SEEBACH, DIETER ET AL.: "BETA - PEPTIDES A SURPRISE AT EVERY TURN" CHEM COMMUN (CAMBRIDGE) (1997) (21) 2015-2022, XP002148556		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) C07K
Y,D	AMBLARD MURIEL ET AL: "Synthesis and characterization of bradykinin B2 receptor agonists containing constrained dipeptide mimics." JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 42, no. 20, 7 octobre 1999 (1999-10-07), pages 4193-4201, XP002148557 ISSN: 0022-2623 * le document en entier *	13-16	

-/--

1

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
27 septembre 2000	Cervigni, S

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

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 bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

INPI
INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

2803594

N° d'enregistrement national

FA 586884
FR 0000288

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	WO 99 48913 A (RAMSDALE TRACIE ELIZABETH ;UNIV QUEENSLAND (AU); ALEWOOD PAUL FRAN) 30 septembre 1999 (1999-09-30) * le document en entier * ---	13-16	
Y	NAGAI U ET AL: "BICYCLIC TURNED DIPEPTIDE (BTD) AS A BETA-TURN MIMETIC;ITS DESIGN SYNTHESIS AND INCORPORATION INTO BIOACTIVE PEPTIDES" TETRAHEDRON,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 49, no. 17, 23 avril 1993 (1993-04-23), pages 3577-3592, XP000576111 ISSN: 0040-4020 * le document en entier * ---	13-16	
Y	PITT N ET AL: "Synthesis and Structure of a Small Macrocyclic Hexapeptide Model for Antiparallel beta-Sheet Containing Two Restrained 2-(3'-Aminopropynyl)-aniline Reverse-Turn Mimetics" TETRAHEDRON LETTERS,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 40, no. 19, 7 mai 1999 (1999-05-07), pages 3811-3814, XP004163839 ISSN: 0040-4039 * le document en entier * -----	13-16	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)

1

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
27 septembre 2000	Cervigni, S

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

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 bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)