



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2007/08/03
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2008/02/07
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2015/11/24
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2009/01/27
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: EP 2007/058069
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2008/015273
(30) Priorité/Priority: 2006/08/04 (FR0607149)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C07K 14/705* (2006.01),
A61K 38/16 (2006.01)
(72) Inventeurs/Inventors:
BALEUX, FRANCOISE, FR;
BONNAFFE, DAVID, FR;
LORTAT-JACOB, HUGUES, FR
(73) Propriétaires/Owners:
INSTITUT PASTEUR, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS), FR
(74) Agent: NORTON ROSE FULBRIGHT CANADA
LLP/S.E.N.C.R.L., S.R.L.

(54) Titre : PEPTIDES DERIVES DU RECEPTEUR CD4 ET LEUR PROCEDE DE PREPARATION
(54) Title: CD4-RECEPTOR-DERIVED PEPTIDES AND METHOD FOR THE PREPARATION THEREOF

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention a pour objet un peptide activé dérivé du récepteur du CD4, qui est capable de se coupler par liaison covalente à une molécule organique et permet ainsi de générer de multiples dérivés potentiellement antiviraux. Un autre objet est une molécule conjuguée comprenant le peptide dérivé du récepteur CD4 et une molécule organique, de préférence le peptide GPR1 ou un polyanion. Une telle molécule conjuguée peut notamment être utilisée dans les traitements antiviraux, notamment le traitement du sida. L'invention a encore pour objet les procédés de préparation du peptide activé dérivé du récepteur CD4 et de la molécule conjuguée.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

VERSION CORRIGÉE

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
7 février 2008 (07.02.2008)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2008/015273 A1(51) Classification internationale des brevets :
C07K 14/705 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2007/058069

(22) Date de dépôt international : 3 août 2007 (03.08.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0607149 4 août 2006 (04.08.2006) FR(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : IN-
STITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Docteur
Roux, F-75015 Paris (FR). CENTRE NATIONAL DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR];
3, rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : BALEUX,
Françoise [FR/FR]; 4, rue Lhomond, F-75005 Paris (FR).(74) Mandataire : WARCOIN, AHNER, TEXIER, LE
FORESTIER, CALLON DE LAMARCK, COLLIN,
TETAZ-Cabinet Regimbeau; 20, rue de Chazelles,
F-75847 Paris Cedex 17 (FR).(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avec la partie réservée au listage des séquences de la des-
cription publiée séparément sous forme électronique et dis-
ponible sur demande auprès du Bureau international(48) Date de publication de la présente version corrigée:
27 mars 2008(15) Renseignements relatifs à la correction:
voir la Notice du 27 mars 2008

(54) Title: CD4-RECEPTOR-DERIVED PEPTIDES AND METHOD FOR THE PREPARATION THEREOF

(54) Titre : PEPTIDES DERIVES DU RECEPTEUR CD4 ET LEUR PROCEDE DE PREPARATION

(57) Abstract: The present invention relates to an activated peptide derived from the CD4 receptor, which is capable of coupling by covalent bonding to an organic molecule and thus makes it possible to generate multiple potentially antiviral derivatives. The present invention also relates to a conjugated molecule comprising the CD4-receptor-derived peptide and an organic molecule, preferably the GPR1 peptide or a polyanion. Such a conjugated molecule can in particular be used in antiviral treatments, in particular the treatment of AIDS. The invention also relates to the methods for preparing the activated peptide derived from the CD4 receptor and the conjugated molecule.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un peptide activé dérivé du récepteur du CD4, qui est capable de se coupler par liaison covalente à une molécule organique et permet ainsi de générer de multiples dérivés potentiellement antiviraux. Un autre objet est une molécule conjuguée comprenant le peptide dérivé du récepteur CD4 et une molécule organique, de préférence le peptide GPR1 ou un polyanion. Une telle molécule conjuguée peut notamment être utilisée dans les traitements antiviraux, notamment le traitement du sida. L'invention a encore pour objet les procédés de préparation du peptide activé dérivé du récepteur CD4 et de la molécule conjuguée.

WO 2008/015273 A1

PEPTIDES DERIVES DU RECEPTEUR CD4 ET LEUR PROCEDE DE PREPARATION

- 5 La présente invention a pour objet un peptide activé dérivé du récepteur du CD4, qui est capable de se coupler par liaison covalente à une molécule organique et permet ainsi de générer de multiples dérivés potentiellement antiviraux. Un autre objet est une molécule conjuguée comprenant le peptide dérivé du récepteur CD4 et une molécule organique, de préférence le peptide GPR1 ou un polyanion.
- 10 Une telle molécule conjuguée peut notamment être utilisée dans les traitements antiviraux, notamment le traitement du sida. L'invention a encore pour objet les procédés de préparation du peptide activé dérivé du récepteur CD4 et de la molécule conjuguée.
- 15 Les trithérapies, associant inhibiteurs nucléosidiques (INTI), non nucléosidiques (INNTI) et/ou antiprotéases (IP), permettent une réduction de la charge virale en dessous des seuils de détectabilité chez un grand nombre de patients séropositifs au VIH. Cette efficacité a permis une diminution très notable de la mortalité liée à l'infection à VIH. Malheureusement, des génotypes indiquant
- 20 une résistance à un antiviral ont été trouvés chez 80 % des patients et, de manière plus inquiétante, 45,5 % des populations virales sont résistantes à une association INTI/IP et 26 % à une association de trois classes d'anti-VIH (Tamalet et al., AIDS. 2003 Nov 7;17(16):2383-8). Ce constat est particulièrement préoccupant lorsque l'on observe des effets secondaires liés à une prise au long terme des
- 25 trithérapies (lipoatrophies, lipodystrophies, hypertriglycémie, hypercholestérolémie, neuropathies...), observés chez 70 % des patients sous traitement, entraînant une mauvaise observance et des arrêts « sauvages » souvent à l'origine de l'apparition de résistances. La mise au point de traitements moins contraignants, entraînant moins d'effets secondaires et ne présentant pas de profil
- 30 de résistances croisées reste donc une priorité, malgré le grand nombre de médicaments actuellement commercialisés. Dans ce but, il est indispensable de

cibler d'autres étapes du cycle réplcatif du VIH que la rétrotranscription et la protéolyse.

La découverte des corécepteurs CXCR4 et CCR5 (Broder CC & Collman RG, J Leukoc Biol. 1997 Jul;62(1):20-9. Review) a ouvert la voie à la compréhension des mécanismes d'infection d'une cellule hôte. La première étape implique un attachement du VIH à la surface cellulaire, grâce à une interaction entre la glycoprotéine gp120 du VIH et le récepteur CD4 de la cellule cible. Il s'en suit un changement conformationnel de la gp120 qui va exposer un épitope, dit CD4i (pour CD4 induit) auparavant masqué, qui constitue une partie du site de liaison aux corécepteurs. L'interaction gp120/corécepteur va provoquer un nouveau changement conformationnel permettant l'exposition de la gp41, ce qui initie le processus de fusion des membranes. La compréhension de ce mécanisme a permis la mise au point de nouveaux types de médicaments inhibant soit l'interaction gp120/CD4 (Bristol-Myers Squibb BMS-488043 en phase clinique IIa), soit l'interaction gp120/CCR5 (Schering-Plough SCH-D et Pfizer UK-427,657 en phase III en 2004-05, et GlaxoSmithKline GSK GW873140/AK602 en phase I), soit la phase de fusion en se liant à la gp41 (T20, Fuzéon[®], Roche).

Ces résultats extrêmement positifs attestent que les approches visant à bloquer l'une des étapes de la pénétration du VIH dans une cellule sont pertinentes. On peut cependant remarquer que parmi les inhibiteurs de l'interaction gp120/corécepteur en développement clinique, seuls des produits inhibant l'interaction avec CCR5 sont étudiés. Les composés se liant à CXCR4 ont vu leurs développements arrêtés, comme l'AMD8664 qui provoque des effets secondaires au niveau cardiovasculaire liés à son mode d'action (Gao Z & Metz WA, 2003 Sep;103(9):3733-52). L'absence de traitement inhibant l'interaction gp120/CXCR4 pourrait conduire à terme à l'échec de ceux visant CCR5 en provoquant une évolution de la population virale vers un tropisme X4 (VIH infectant via CXCR4), souvent associée à une accélération de la déplétion en lymphocytes T CD4+. Curieusement, le site de liaison aux corécepteurs,

hautement conservé chez le VIH-1, le VIH-2 et le SIV (Rizzuto CD et al, 1998 Jun 19;280(5371):1949-53 ; Kwong PD et al., Nature. 1998 Jun 18;393(6686):648-59), ne semble pas être une cible thérapeutique sur laquelle beaucoup de recherches sont menées. Le fait que ce site soit caché, tant que la gp120 n'est pas
5 liée à CD4, rend en effet l'accès de molécules à ce site difficile. La présente invention propose de résoudre ce problème en préparant, par synthèse chimique, des composés capables de se lier au site conservé de liaison aux corécepteurs ainsi qu'à la boucle V3. De tels composés seraient a priori capables d'inhiber l'interaction gp120/CD4 et l'interaction gp120/corécepteur et ce, quelque soit le
10 type de souche de VIH.

Il est connu depuis de nombreuses années que certains polyanions, comme l'héparine (HP) ou le sulfate de dextran (DS), mais pas le chondroïtine sulfate (CS), sont capables d'inhiber l'infection de cellules par le VIH (Esté JA, et al.,
15 Mol Pharmacol. 1997 Jul;52(1):98-104). Ils ne sont cependant pas utilisés en clinique notamment à cause de leurs effets anticoagulants (Flexner C et al., Antimicrob Agents Chemother. 1991 Dec;35(12):2544-50). Récemment il a été montré que le mécanisme moléculaire de cette inhibition était lié à une interaction du polyanion avec la boucle V3 (Moulard M et al., J Virol. 2000 Feb;74(4):1948-
20 60.

D'autre part, différentes études ont exploré l'utilisation de CD4 soluble pour inhiber l'interaction du virus avec le CD4 exprimé à la surface des cellules cibles du VIH. Cette solution s'est révélée inefficace, parce qu'en se fixant aux virus, le
25 CD4 soluble expose l'épitope CD4i, et favorise en fait l'interaction du virus au co-récepteur CCR5 ou CXCR4, ce qui dans certains cas augmente l'infection (Schenten D. et al, 1999, J Virol.73 : 5373-80).

Il est connu de la demande de brevet internationale publiée sous le numéro
30 WO 03/089000 qu'un peptide dérivé du récepteur CD4, lorsqu'il est mis en présence avec un polyanion, possède une action anti-VIH. Il est notamment

préconisé que des composés dans lesquels le peptide et le polyanion sont liés peuvent être préparés selon la description faite dans l'article Najjam S. et al. (Cytokine 1997, 9 (12) : 1013-1022) (cf. point I.1 de la partie EXEMPLES).

5 Dans la présente invention, les inventeurs ont obtenu des peptides activés dérivés du récepteur CD4, susceptibles de lier directement et de manière covalente le polyanion ou toute autre molécule organique susceptible de jouer un rôle dans l'action anti-VIH avec le miniCD4. Cette activation requiert l'introduction préalable de résidus d'acides aminés particuliers dans le peptide natif. En
10 particulier, les inventeurs ont découvert que la présence d'un et un seul résidu d'acide aminé lysine dans la séquence du peptide dérivé du récepteur CD4 est indispensable pour obtenir un peptide activé selon l'invention. En outre, cet unique résidu d'acide aminé lysine doit être en une position bien définie dans la séquence du peptide dérivé du récepteur CD4. La conception du peptide miniCD4
15 comprenant un seul résidu d'acide aminé lysine en position définie permet d'introduire sélectivement et directement n'importe quelle fonction sur le miniCD4.

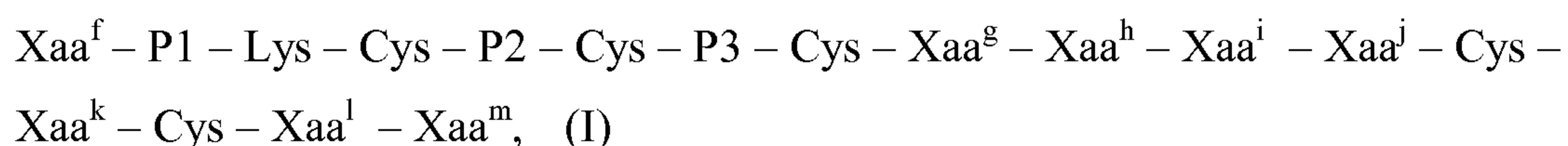
La présente invention offre ainsi des composés activés permettant de générer
20 de multiples dérivés potentiellement antiviraux. Ces dérivés consistent en des molécules conjuguées comprenant un peptide CD4 couplé de manière spécifique à une molécule organique, telle qu'un polyanion, au moyen d'un bras espaceur.

Cette approche est avantageuse du point de vue thérapeutique pour inhiber
25 l'attachement du virus sur les cellules, car elle vise directement le virus et non les cellules elles mêmes. Elle est donc, au premier abord, dépourvue des effets cellulaires qui sont observés avec les médicaments se liant aux corécepteurs. D'autre part, au vu de la conservation des sites impliqués en fonction des différents tropismes viraux, les composés selon l'invention devraient interagir
30 avec les gp120 de différents isolats viraux. De plus, même s'il est illusoire de penser que des résistances n'apparaîtront pas, ce nouveau type de composé ne

devrait provoquer que difficilement leur émergence. En effet, le site CD4 de gp120 doit rester intègre pour continuer à se lier à CD4 et les résidus basiques impliqués dans la liaison au polyanion le sont aussi pour l'interaction avec les corécepteurs, et une mutation dans l'un de ces deux sites conduirait à un virus peu fonctionnel. Finalement, dans le cadre de la présente invention, une version entièrement synthétique des composés peut être développée, garantissant ainsi une préparation en quantité importante, homogène, et parfaitement définie. La méthode de couplage est simple, rapide et quantitative.

10 Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention a pour objet un procédé de préparation d'un peptide activé dérivé du récepteur CD4, ledit peptide, une fois activé, étant capable de se coupler par liaison covalente à une molécule organique, et dans lequel ledit peptide dérivé du récepteur CD4 comprend ou est constitué par la séquence générale (I) suivante :

15



dans laquelle :

20

- P1 représente 3 à 6 résidus d'acides aminés,
- P2 représente 2 à 4 résidus d'acides aminés,
- P3 représente 6 à 10 résidus d'acides aminés,
- Xaa^f représente la N-acétylcystéine (Ac-Cys) ou l'acide thiopropionique (TPA),

25

- Xaa^g représente Ala ou Gln,
- Xaa^h représente Gly ou (D)Asp ou Ser,
- Xaa^i représente Ser ou His ou Asn,
- Xaa^j représente la biphénylalanine (Bip), la phénylalanine ou la [bêta]-naphthylalanine,

30

- Xaa^k représente Thr ou Ala, et
- Xaa^l représente Gly, Val ou Leu,

- Xaa^m représente -NH₂ ou -OH,

les résidus d'acides aminés dans P1, P2 et P3 étant naturels ou non naturels, identiques ou différents, lesdits résidus de P1, P2 et P3 étant tous différents du résidu Lys, et P1, P2 et P3 ayant ou non une séquence commune,

5 caractérisé en ce que le procédé comprend la mise en présence du peptide de séquence générale (I) dérivé du récepteur CD4 avec un composé bifonctionnel portant deux groupes actifs, dont l'un au moins des deux groupes actifs est capable de former une liaison covalente avec la fonction amine libre (-NH₂) du résidu d'acide aminé Lys présent dans la séquence générale (I).

10

De préférence **P3** comporte au moins un acide aminé basique, tout préférentiellement ledit acide aminé basique est une arginine. La présence de résidus basiques dans cette portion du fragment du récepteur CD4 contribue à sa liaison avec la protéine gp120. Ainsi les inventeurs ont préféré introduire dans **P3**
15 au moins un acide aminé basique, de préférence une arginine. Celle-ci maintient ainsi une charge basique qui n'est pas réactive pour une dérivatisation à pH7-8 mais qui s'est effectivement avéré utile pour la liaison du peptide miniCD4 avec la protéine gp120.

20 Dans la présente demande, les expressions « peptide miniCD4 », « peptide CD4 » ou « miniCD4 », sont utilisées de manière indifférente pour désigner le peptide dérivé du récepteur CD4 comprenant ou étant constitué par la séquence générale (I) définie ci-dessus.

25 La présente invention requiert que le peptide dérivé du récepteur CD4 comporte dans sa séquence générale (I) un et un seul résidu d'acide aminé lysine (Lys), dans la position telle que définie dans la séquence générale (I).

Les résidus Cys dans la séquence générale (I) permet la formation de trois
30 ponts disulfures nécessaires au repliement du miniCD4.

L'acide thiopropionique (TPA), lorsqu'il est en position N-terminale du peptide de séquence générale (I), permet de diminuer l'encombrement en N-ter et de s'affranchir de la présence d'une fonction amine.

5 Ainsi, selon un mode de réalisation préféré, Xaa^f représente TPA dans la séquence générale (I).

Dans la séquence générale (I), Xaa^j représente la Bip, Phe ou la [bêta]-naphthylalanine. La biphenylalanine permet d'augmenter le contact avec la
10 glycoprotéine gp120 au niveau de la cavité dans laquelle se loge la Phe 43 du récepteur CD4. Toutefois, un peptide miniCD4 selon l'invention avec une Phe pourrait être un meilleur mime de CD4 lorsqu'on analyse la structure du complexe miniCD4/gp120 (Huang CC et al., Structure. 2005 May;13(5):755-68).

Ainsi, selon un autre mode de réalisation préféré, Xaa^j représente Phe.
15

Le peptide de séquence générale (I) dérivé du récepteur CD4 présente une structure en hélice alpha suivie d'un feuillet bêta. Les acides aminés Xaa^g-Xaa^h-Xaaⁱ-Xaa^j-Cys-Xaa^h-Cys-Xaa^l participent majoritairement à la liaison sur gp120. Ces peptides présentent des IC₅₀ (affinité pour gp120) voisines de celles du sCD4
20 (CD4 soluble).

Le peptide de séquence générale (I) dérivé du récepteur CD4 peut être préparé par les techniques classiques de synthèse chimique en phase solide, par exemple selon la méthodologie de synthèse peptidique en phase solide Fmoc (« Fmoc solid
25 Phase peptide synthesis, a practical approach », publié par W.C. Chan et P.D. White, Oxford university press, 2000), et/ou par recombinaison génétique.

De préférence, la séquence du peptide dérivé du récepteur CD4 de séquence générale (I) est choisie dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID N°1 et
30 SEQ ID N°2, avantageusement SEQ ID N°1.

On entend désigner par « composé bifonctionnel » dans la présente demande tout composé portant deux groupes actifs dont l'un au moins des deux groupes est capable de former une liaison covalente avec la fonction amine libre (-NH₂) du résidu d'acide aminé Lys de la séquence générale (I).

5

L'homme du métier connaît bien les composés bifonctionnels qui peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention. Notamment, le composé bifonctionnel selon la présente invention peut être choisi dans la liste suivante, non limitative : NHS-PEO_n-Maleimide où n est compris entre 2 et 24, 10 avantageusement n=2, 4, 8 ou 12, SMPT (4-succinimidyl-oxycarbonyl-méthyl-a-[2-pyridyldithio]toluène), Sulfo-LC-SMPT (4-sulfosuccinimidyl-6-méthyl-a-(2-pyridyldithio)toluamido]hexanoate)), Sulfo-KMUS (N-[k-maléïmidoundécanoyloxy]sulfosuccinimide ester), LC-SMCC (succinimidyl-4-[N-maléïmidométhyl]cyclohexane-1-carboxy-[6-amidocaproate]), KMUA (acide 15 N-k-maléïmidoundécanoïque), Sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidyl 6-(3'-[2-pyridyldithio]-propionamido)hexanoate), LC-SPDP (succinimidyl 6-(3-[2-pyridyldithio]-propionamido)hexanoate), SMPB (succinimidyl 4-[p-maléïmidophényle]butyrate), Sulfo-SMPB (sulfosuccinimidyl 4-[p-maléïmidophényle]butyrate), Sulfo-SIAB (N-sulfosuccinimidyl[4-iodoacétyl]aminobenzoate), 20 SIAB (N-succinimidyl[4-iodoacétyl]aminobenzoate), Sulfo-EMCS ([N-e-maléïmidocaproyloxy]sulfosuccinimide ester), EMCA (acide N-e-maléïmidocaproïque), EMCS ([N-e-maléïmidocaproyloxy]succinimide ester), SMCC (succinimidyl 4-[N-maléïmidométhyl]cyclohexane-1-carboxylate), Sulfo-SMCC (sulfosuccinimidyl 4-[N-maléïmidométhyl]cyclohexane-1-carboxylate), 25 MBS (m-maléïmidobenzoyl-N-hydroxy succinimide ester), Sulfo-MBS (m-maléïmidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ester), GMBS (N-[g-maléïmidobutyryloxy]succinimide ester), Sulfo-GMBS (N-[g-maléïmidobutyryloxy] sulfosuccinimide ester), SPDP (N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate), SBAP (succinimidyl 3-[bromoacétamido]propionate), 30 BMPS (N-[[bêta]-maléïmidopropoxy]succinimide ester), BMPA (acide N-[[bêta]-maléïmidopropionique), AMAS N-(a-maléïmidoacétoxy) succinimide

ester), SIA (*N*-succinimidyl iodoacétate), SMPH (succinimidyl-6-[bêta-maléïmidopropionamido]hexanoate), SATA (*N*-succinimidyl-S-acétylthioacétate), SATP (*N*-succinimidyl-S-acétylthiopropionate).

- 5 Selon la présente invention, NHS-PEO_n-Maleimide où n=2 est également appelé succinimidyl-[(*N*-maleimidopropionamido)-diethyleneglycol] ester, NHS-PEO_n-Maleimide où n=4 est également appelé succinimidyl-[(*N*-maleimidopropionamido)-tetraethyleneglycol] ester, NHS-PEO_n-Maleimide où n=8 est également appelé succinimidyl-[(*N*-
10 maleimidopropionamido)-octaethyleneglycol] ester, NHS-PEO_n-Maleimide où n=12 est également appelé succinimidyl-[(*N*-maleimidopropionamido)-dodecaethyleneglycol] ester.

Le groupe actif capable de former une liaison covalente avec la fonction amine
15 libre (-NH₂) du résidu d'acide aminé Lys présent dans la séquence générale (I), peut être tout groupe ester actif.

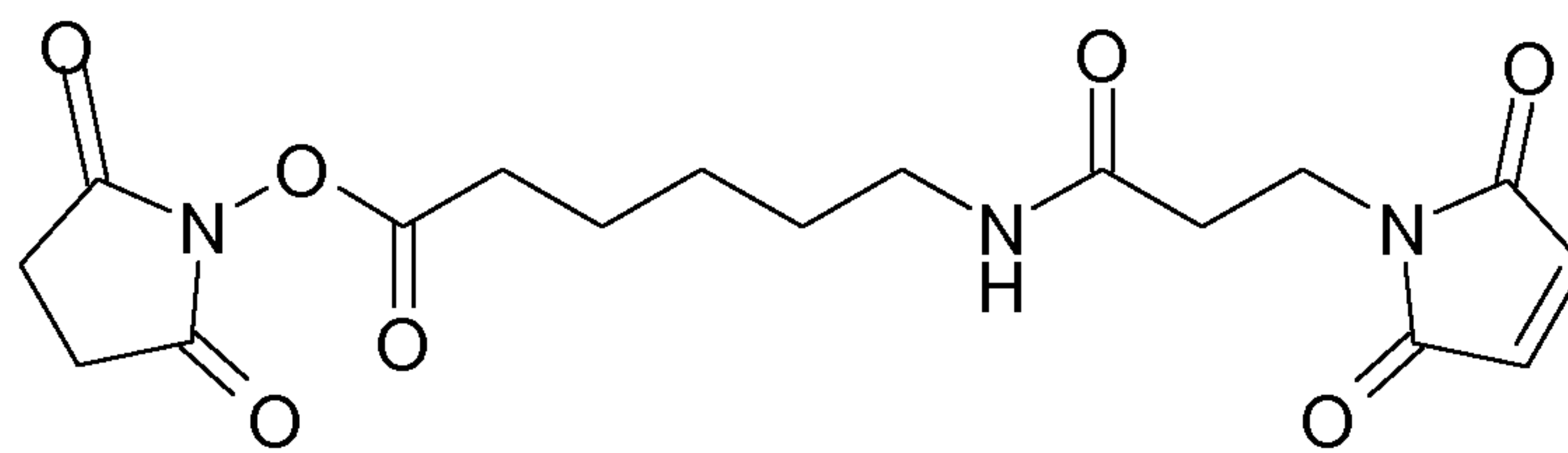
De manière préférée, le groupe actif capable de former une liaison covalente avec la fonction amine libre (-NH₂) du résidu d'acide aminé Lys présent dans la
20 séquence générale (I), est le groupe actif N-hydroxysuccinimide ester (NHS).

De manière encore préférée, les deux groupes actifs du composé bifonctionnel sont différents (groupe hétérobifonctionnel), et l'un des deux groupes représente le groupe actif NHS.

25

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, le composé bifonctionnel est le succinimidyl-6-[bêta-maléïmidopropionamido]hexanoate (SMPH).

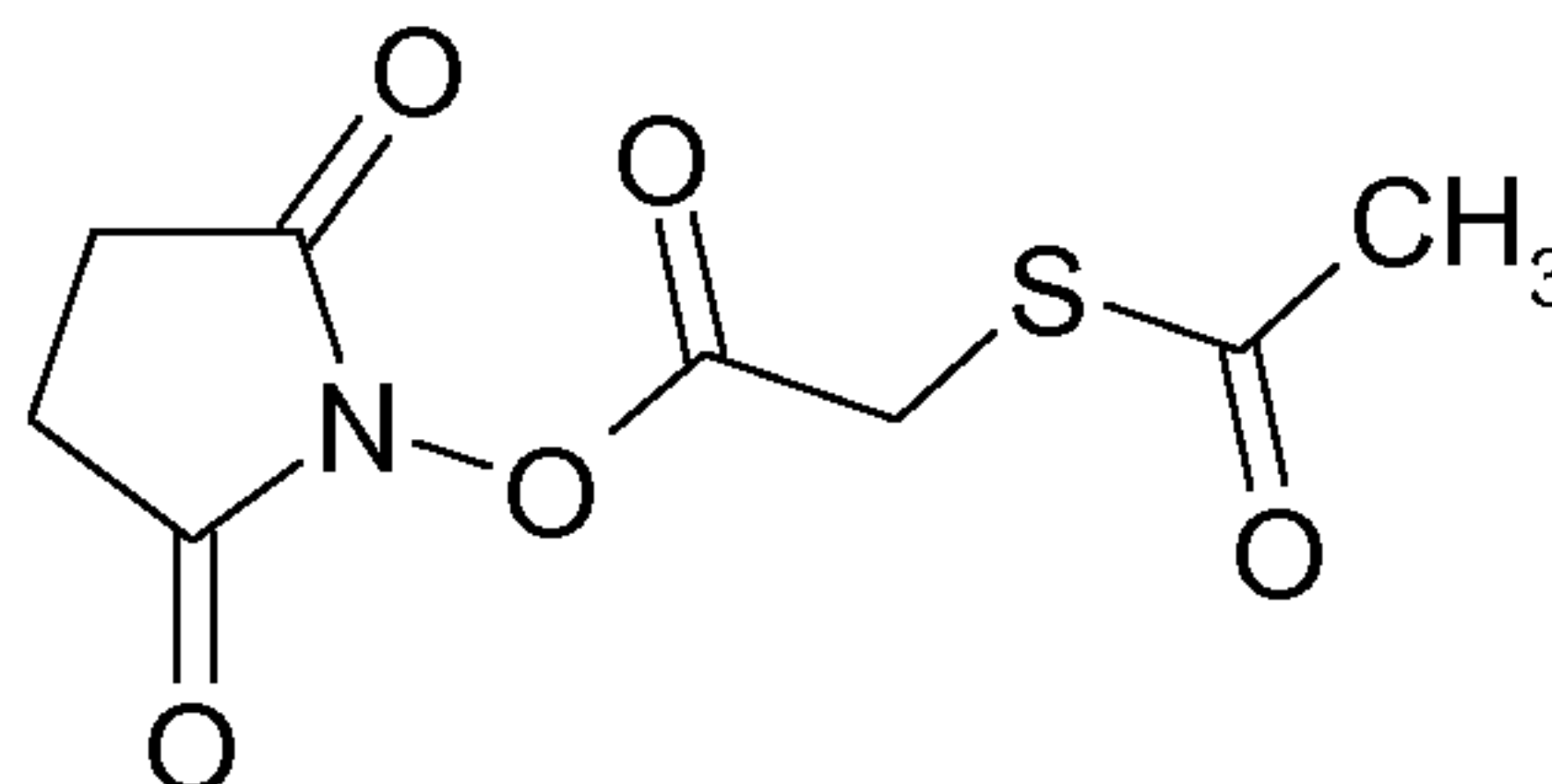
30 La structure moléculaire du SMPH est la suivante :



SMPH

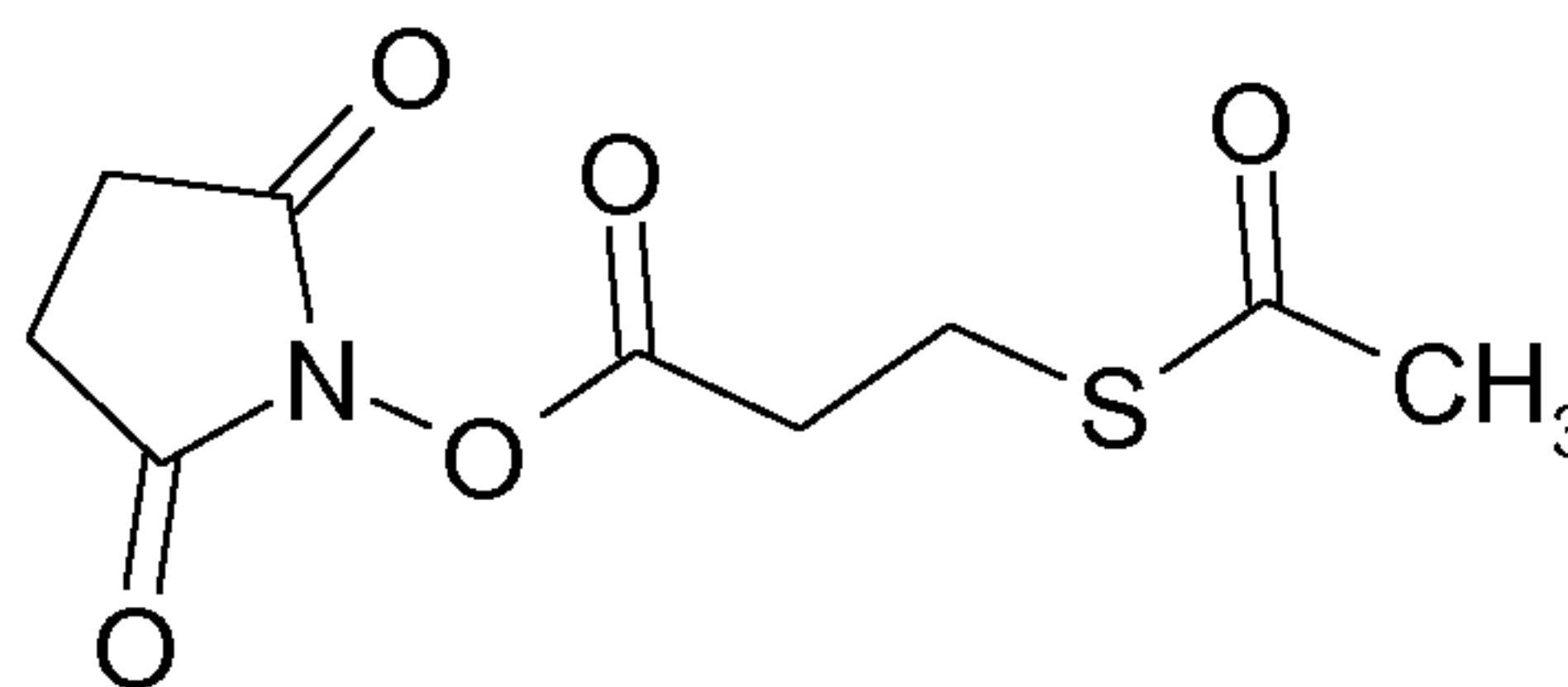
Selon un autre mode de réalisation particulièrement préféré, le composé
5 bifonctionnel est choisi dans le groupe constitué par le N-succinimidyl-S-acétylthioacétate (SATA) et le N-succinimidyl-S-acétylthiopropionate (SATP).

La structure moléculaire du SATA est la suivante :



10

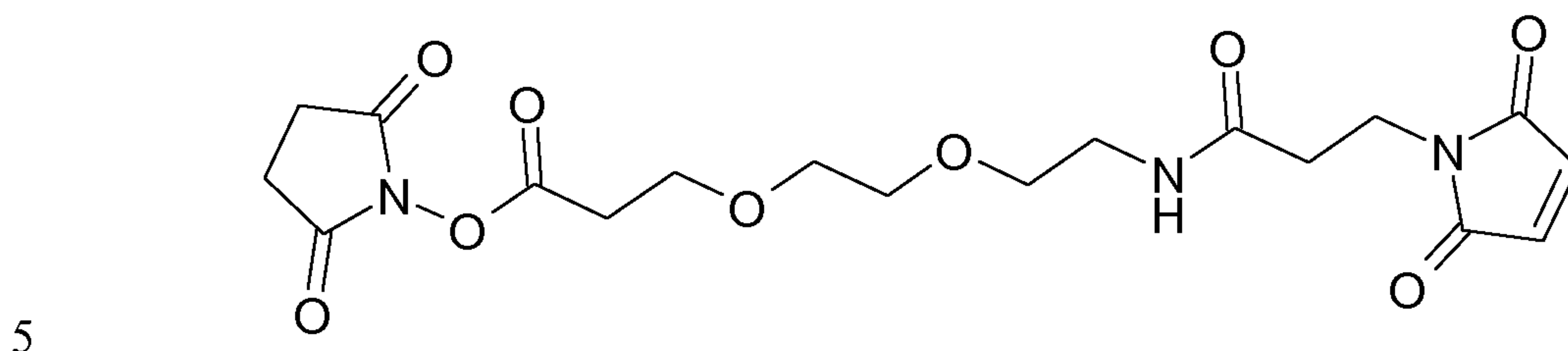
La structure moléculaire du SATP est la suivante :



Selon encore un autre mode de réalisation préféré, le composé
15 bifonctionnel est l'ester de succinimidyl-[(N-maléïmidopropionamido)-diéthylèneglycol], également appelé NHS-PEO₂-maléïmide, l'ester de succinimidyl-[(N-maleimidopropionamido)-tetraéthylèneglycol] également appelé NHS-PEO₄- maléïmide, l'ester de succinimidyl-[(N-maleimidopropionamido)-octaéthylèneglycol] également appelé NHS-PEO₈-maléïmide, l'ester de
20 succinimidyl-[(N-maleimidopropionamido)-dodecaéthylèneglycol] également

appelé NHS-PEO₁₂- maléïmide, de manière encore plus préférée le composé bifonctionnel est le NHS-PEO₂- maléïmide.

La structure moléculaire du NHS-PEO₂-maléïmide est la suivante :



Les composés bifonctionnels peuvent être obtenus auprès de PIERCE (Rockford, IL).

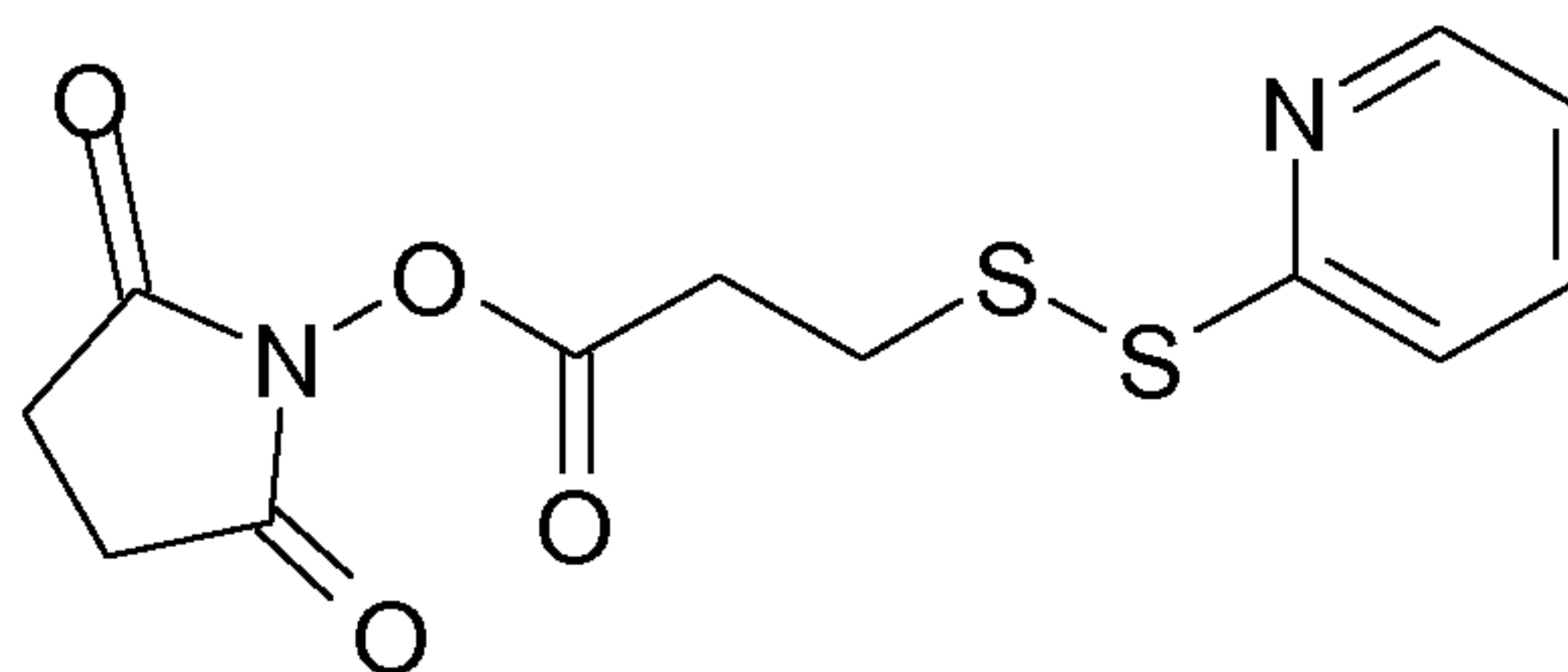
10 De préférence encore, le procédé de préparation d'un peptide activé selon l'invention comprend une étape préliminaire de préparation du peptide dérivé du récepteur CD4 de séquence générale (I) dans lequel Xaa^f représente TPA, dans laquelle le peptide dérivé du récepteur CD4 de séquence générale (II) suivante :

15 P1 – Lys – Cys – P2 – Cys – P3 – Cys – Xaa^g – Xaa^h – Xaaⁱ – Xaa^j – Cys – Xaa^k – Cys – Xaa^l – Xaa^m, (II)

dans laquelle P1 à P3, Bip et Xaa^g à Xaa^m sont tels que définis dans la séquence générale (I) ci-dessus,

20 est mis en présence avec le N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) pour incorporer le TPA à l'extrémité N-terminale dudit peptide dérivé du récepteur CD4 de séquence générale (II).

La structure moléculaire du SPDP est la suivante :



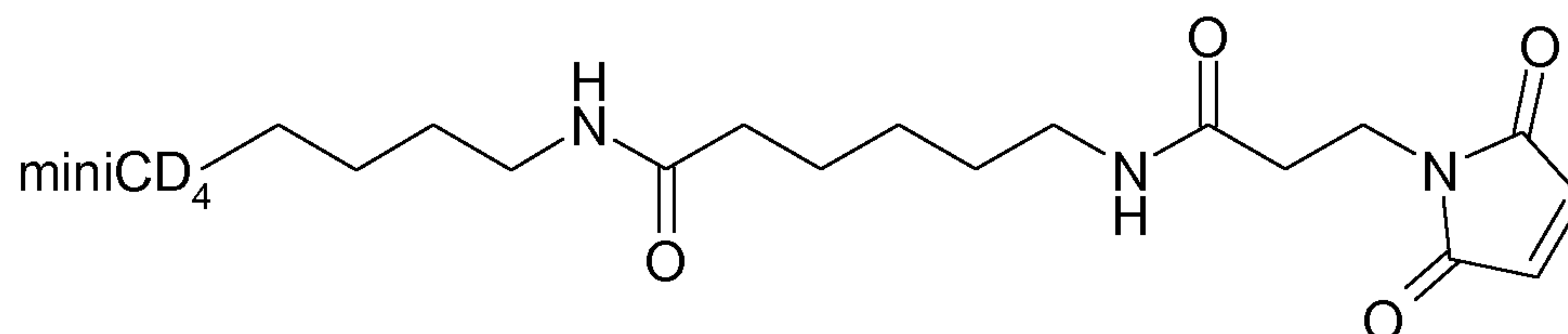
Selon un deuxième aspect, la présente invention a pour objet un peptide activé
 5 dérivé du récepteur CD4 comprenant ou étant constitué par la séquence générale
 (I) telle que définie ci-dessus, dans lequel le résidu d'acide aminé Lys est lié de
 façon covalente, avantageusement par une liaison amine, à un groupe actif capable
 de se coupler par liaison covalente à une molécule organique.

10 Comme exemples de groupes actifs capable de se coupler par liaison covalente
 à la molécule organique, on peut citer le groupe maléïmide, le groupe
 bromoacétyle, le groupe S-S-pyridinium. Lorsque le miniCD4 est activé par une
 fonction thiol protégée (ex : thioacétyle), il est possible de réaliser le couplage
 avec une molécule organique qui portera par exemple un groupe maléïmide. Cette
 15 possibilité peut être utilisée lorsque la fonctionnalisation du polysaccharide (ou
 polyanion) par une fonction thiol ou thioacétyle pose des problèmes. On parle
 alors de « couplage inverse ».

De préférence, le groupe actif est le groupe maléïmide.

20

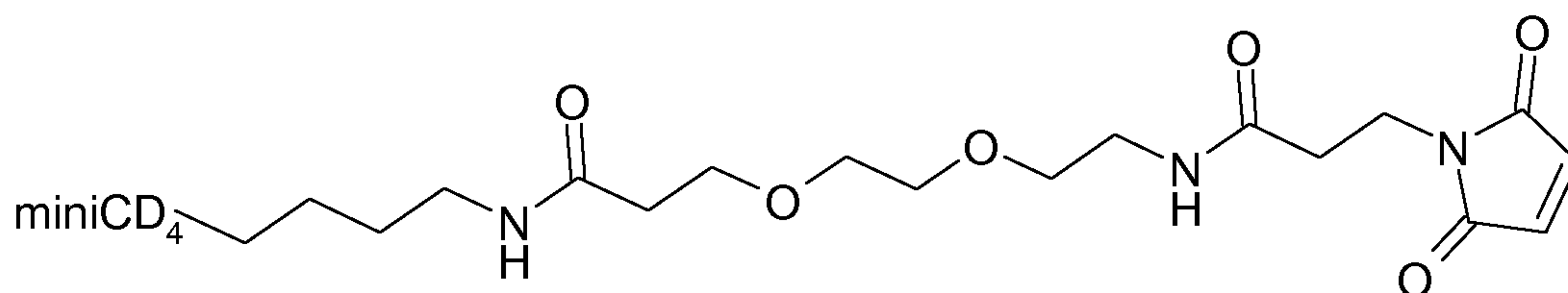
La structure moléculaire du peptide activé selon la présente invention, dont le
 groupe actif est le groupe maléïmide, est la suivante lorsque SMPH est le composé
 bifonctionnel utilisé:



Dans la présente demande, l'expression « peptide miniCD4 activé SMPH » désigne un peptide activé selon l'invention, dont le résidu d'acide aminé Lys est lié de façon covalente, avantageusement par une liaison amine, au groupe actif
5 maléïmide via un espaceur dérivé du SMPH.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, la structure moléculaire du peptide activé selon la présente invention, dont le groupe actif est le groupe maléïmide, est la suivante lorsque NHS-PEO₂-maléïmide le composé

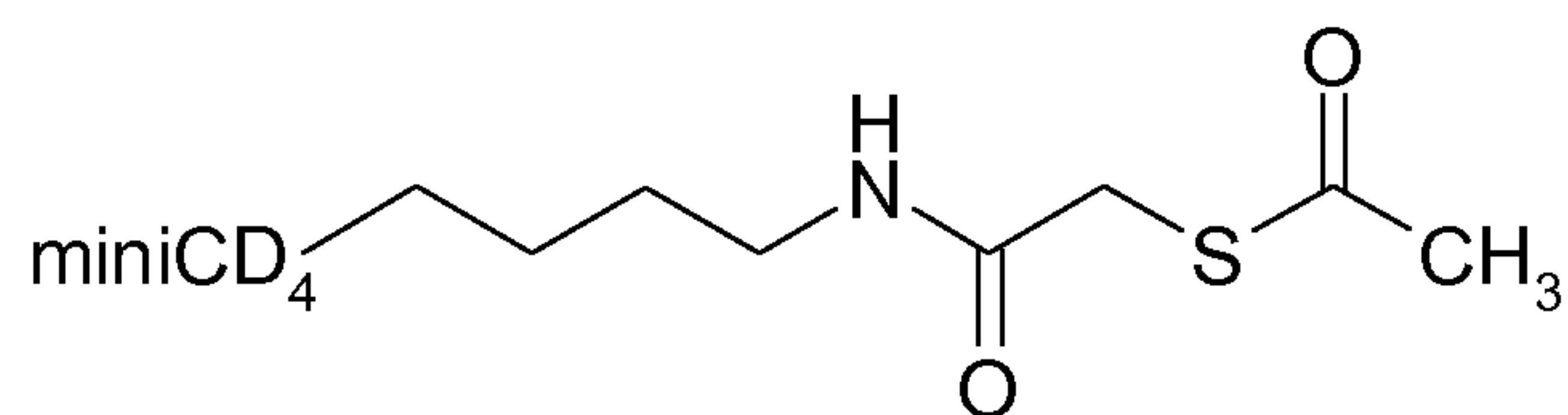
10 bifonctionnel utilisé :



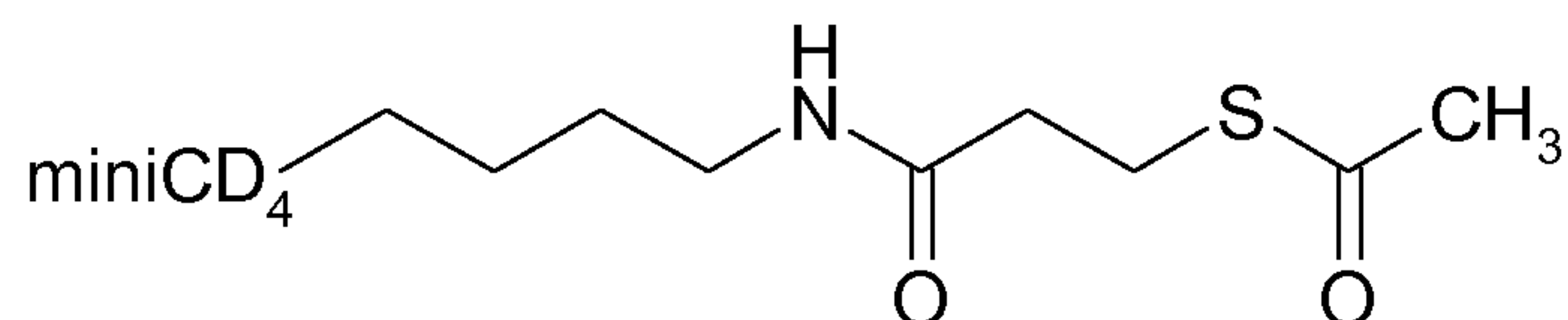
Dans la présente demande, l'expression « peptide miniCD4 activé maléïmide via un espaceur PEO₂ » désigne un peptide activé selon l'invention, dont le résidu
15 d'acide aminé Lys est lié de façon covalente, avantageusement par une liaison amine, au groupe actif maléïmide via un espaceur PEO₂.

Selon une autre préférence, le groupe actif est le groupe thioacétyle.

20 Par exemple, la structure moléculaire du peptide activé selon la présente invention, dont le groupe actif est le groupe thioacétyle, est la suivante lorsque SATA est le composé bifonctionnel utilisé :



De même, la structure moléculaire du peptide activé selon la présente invention, dont le groupe actif est le groupe thioacétyl, est la suivante lorsque SATP est le composé bifonctionnel utilisé :



5

Le groupe thioacétyl est une forme protégée du groupe thiol. Pour déprotéger le groupe thiol, on utilise par exemple l'hydroxylamine. Cette étape est réalisée
10 simultanément lors du couplage sur la fonction maléimide portée par la molécule organique.

Dans la présente demande, les expressions « peptide miniCD4 activé SATA » et « peptide miniCD4 activé SATP » désignent un peptide activé selon l'invention,
15 dont le résidu d'acide aminé Lys est lié de façon covalente, avantageusement par une liaison amine, à un groupe thiol protégé (ex : thioacétyl) via un espaceur dérivé du SATA ou SATP.

Selon un troisième aspect, la présente invention a pour objet un procédé de
20 préparation d'une molécule conjuguée comportant un peptide dérivé du récepteur CD4 couplé par liaison covalente à une molécule organique, ledit peptide dérivé du récepteur CD4 comprenant ou étant constitué par la séquence générale (I) telle que définie ci-dessus, caractérisé en ce que le procédé comprend la mise en
25 présence du peptide activé selon l'invention tel que défini ci-dessus avec la molécule organique. Le peptide activé dérivé du récepteur CD4 comprend la séquence générale (I) telle que définie ci-dessus, dans lequel le résidu d'acide aminé Lys est lié de façon covalente, avantageusement par une liaison amine, à un groupe actif capable de se coupler par liaison covalente à une molécule organique.

Selon un mode réalisation particulier, le groupe actif est le groupe maléïmide et la molécule organique porte une fonction thiol ou thioacétyle.

De préférence, la molécule organique portant une fonction thiol est le peptide
5 GPR1 de séquence choisie dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4, avantageusement SEQ ID N°3.

Le peptide GPR1 de séquence SEQ ID N°3 ou SEQ ID N°4 est un peptide
synthétique dérivé de la région extracellulaire N-terminale du récepteur couplé à la
10 protéine G, GPR1 (Jinno-Oue et al., J Biol Chem. 2005 Sep 2;280(35):30924-34. Epub 2005 May 26).

Selon une autre préférence, la molécule organique portant une fonction thiol
est choisie dans le groupe constitué par les peptides comportant essentiellement
15 des résidus acides (acide aspartique, acide glutamique,...), les peptides comportant
essentiellement des résidus phosphorylables (Ser, Thr, Tyr,...), et les peptides
comportant essentiellement des résidus sulfatables (Ser, Thr, Tyr,...).

Selon une autre préférence, la molécule organique portant une fonction thiol
20 est un polyanion modifié portant la fonction thiol ou thioacétyle.

Selon l'invention, le polyanion, ou polysaccharide, peut être choisi
avantageusement dans le groupe constitué de l'héparine, de l'héparane sulfate, et
d'un polyanion équivalent à l'héparine ou à l'héparane sulfate. Il s'agit par exemple
25 du dextran sulfate (marque de commerce, UENO FINE CHEMICALS), du
curdlan sulfate (marque de commerce, AJINOMOTO), du naphthalène-2 sulfonate
polymère (marque de commerce, PROCEPT), du pentosan polysulfate (marque de
commerce, BAKER NORTON PHARM ; HOECHST), ou du resobene (marque
de commerce).

Il est préférable que le polyanion ne soit pas trop long, car il aurait une activité anticoagulante, non souhaitée dans la présente invention, et formerait des liaisons aspécifiques avec différentes protéines, notamment la thrombine ou l'antithrombine III. Sa longueur sera de préférence similaire à une chaîne
5 d'héparine ayant un degré de polymérisation tel que défini ci-dessous. Le polyanion présente de préférence au moins deux groupes anioniques par disaccharide.

Selon la présente invention, lorsque le polyanion est de l'héparine ou de
10 l'héparane sulfate, il aura de préférence un degré de polymérisation dp de 10 à 24, avantageusement de 12 à 24, de préférence de 16 à 22. Selon l'invention, l'héparine, l'héparane sulfate ou le polyanion équivalent à l'héparine ou l'héparane sulfate peut avoir un degré de polymérisation dp de 12 à 20, par exemple de 15 à 17.

15

On peut citer par exemple le dodécasaccharide d'héparine (HP₁₂).

Selon un mode de réalisation particulier, le polyanion modifié portant la fonction thiol ou thioacétyle est choisi dans le groupe constitué par l'héparine et
20 l'héparane sulfate et a un degré de polymérisation dp de 10 à 24.

Selon un autre mode de réalisation particulier, le groupe actif est le groupe thioacétyle et la molécule organique porte une fonction maléimide ou halogène.

Selon l'invention, le polyanion peut être préparé par dépolymérisation partielle
25 d'héparine ou d'héparane sulfate par une méthode enzymatique, par exemple au moyen d'héparinase, ou chimique, par exemple au moyen d'acide nitreux. Lorsqu'ils sont obtenus chimiquement, les héparanes peuvent être définis par la présence de glucosamine N-sulfatée ou N-acétylée, ou non substituée en position N, liée à un acide uronique (acide glucuronique ou acide iduronique)
30 avec une proportion variable de groupe sulfate. Des mimes structuraux de ces oligosaccharides peuvent être obtenus par synthèse chimique.

Les avantages d'une telle approche synthétique par rapport à une conjugaison de composés recombinants ou issus de sources naturelles sont multiples. Dans l'optique d'une utilisation thérapeutique, les composés de synthèse sont toujours
5 préférés, car outre une structure parfaitement définie, on évite toute contamination par des agents pathogènes et en particulier des protéines prions dans le cas de fragments d'HP. De plus, les fragments synthétiques d'HP sont nettement plus homogènes que leurs équivalents naturels. Ainsi par exemple, l'HP₁₂ synthétique est totalement dépourvu des groupements 3-*O*-sulfates qui sont à l'origine de
10 l'activité antithrombotique de l'héparine.

Les conditions opératoires des procédés de préparation selon l'invention du peptide activé et de la molécule conjuguée, sont bien connus de l'homme de l'art et pourront être adaptées si besoin est.

15

Selon un quatrième aspect, la présente invention a pour objet une molécule conjuguée comportant un peptide dérivé du récepteur CD4 comprenant ou étant constitué par la séquence générale (I) telle que définie ci-dessus couplé à une
20 molécule organique, dans laquelle le peptide dérivé du récepteur CD4 et la molécule organique sont couplés l'un à l'autre par un bras espaceur, et dans laquelle le résidu d'acide aminé Lys de la séquence générale (I) forme une liaison amine avec le bras espaceur.

25 La présente invention a également pour objet une molécule conjuguée comportant un peptide dérivé du récepteur CD4 comprenant ou étant constitué par la séquence générale (I) telle que définie ci-dessus couplé à une molécule organique, ladite molécule conjuguée étant susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention de préparation d'une molécule conjuguée.

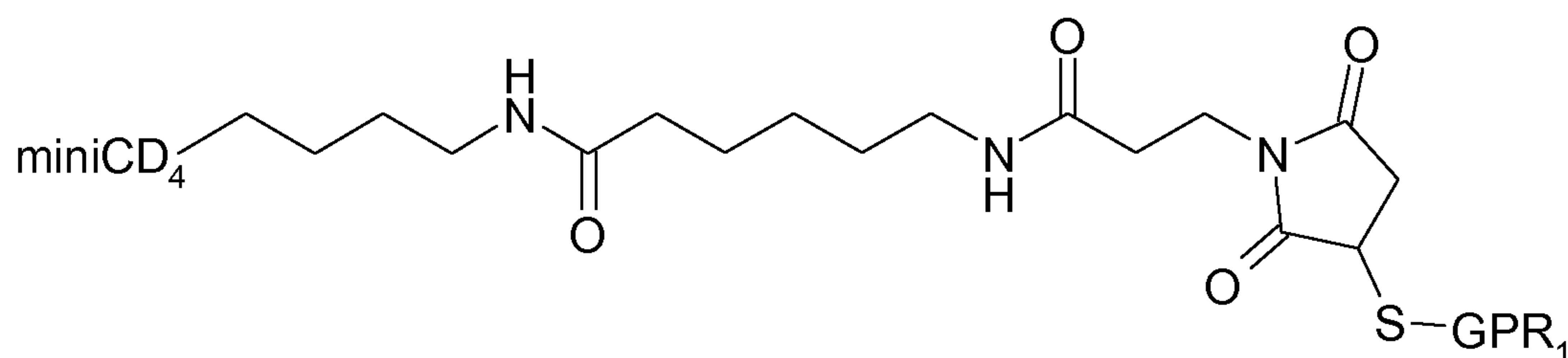
30

Dans la présente demande, on entend désigner par bras espaceur tout agent de liaison entre le peptide miniCD4 selon l'invention et la molécule organique, ledit bras espaceur variant selon le composé bifonctionnel utilisé.

5 Il s'agit de préférence d'une molécule conjuguée selon l'invention, dans laquelle la séquence du peptide dérivé du récepteur CD4 comprend ou est constituée par la séquence générale (I), de préférence la séquence SEQ ID N°1, et la molécule organique portant une fonction thiol est le peptide GPR1 de séquence choisie dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4,
10 avantageusement SEQ ID N°3.

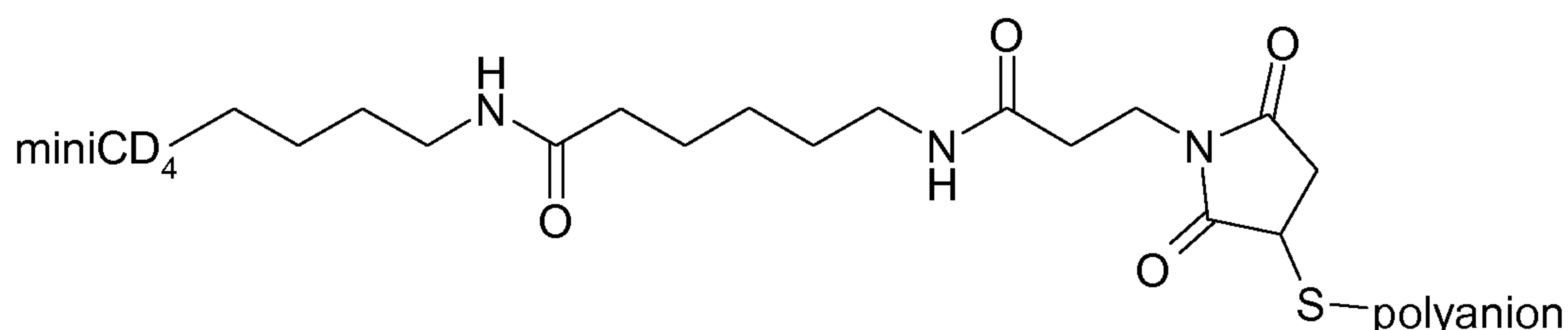
Le couplage selon l'invention du peptide GPR1 au peptide dérivé du récepteur CD4 de séquence générale (I) est capable de se fixer sur la glycoprotéine gp120 du VIH et de bloquer de façon concomitante l'attachement du virus à CD4 et aux
15 corécepteurs CXCR4 et CCR5.

La structure moléculaire d'une telle molécule conjuguée, comportant un peptide dérivé du récepteur CD4 de séquence générale (I) couplé au peptide GPR1 de séquence SEQ ID N°3 ou SEQ ID N°4, est la suivante lorsque le SMPH a été
20 utilisé pour le couplage :



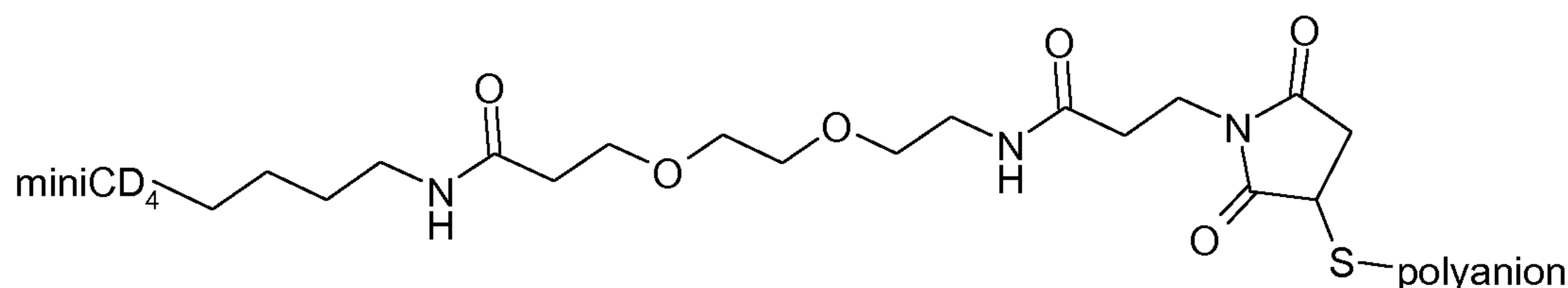
Selon une autre préférence, il s'agit d'une molécule conjuguée selon l'invention, dans laquelle la séquence du peptide dérivé du récepteur CD4 comprend ou est constituée par la séquence générale (I), de préférence la séquence
25 SEQ ID N°1, et la molécule organique portant une fonction thiol est le polyanion modifié portant la fonction thiol ou thioacétyle.

La structure moléculaire d'une telle molécule conjuguée, comportant un peptide dérivé du récepteur CD4 de séquence générale (I) couplé au polyanion modifié portant la fonction thiol ou thioacétyle, est la suivante lorsque le SMPH a
5 été utilisé pour le couplage :



Il peut également s'agir de la molécule conjuguée suivante, lorsque le NHS-PEO₂-maléimide est le composé bifonctionnel utilisé :

10

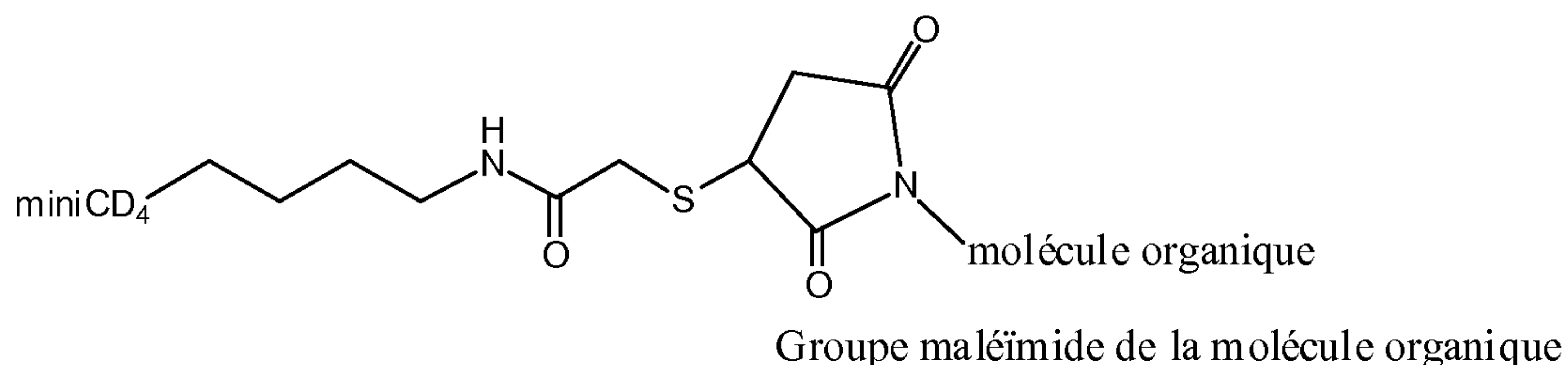


De préférence, le polyanion modifié portant la fonction thiol ou thioacétyle est choisi dans le groupe constitué par l'héparine et l'héparane sulfate et a un degré de
15 polymérisation dp de 10 à 24.

Selon un autre mode de réalisation, la molécule conjuguée selon l'invention comprend le peptide dérivé du récepteur CD4 comprenant ou étant constitué par la séquence générale (I), de préférence la séquence SEQ ID N°1, et une molécule
20 organique portant une fonction maléimide ou halogène.

Par exemple, la structure moléculaire d'une telle molécule conjuguée, comportant un peptide dérivé du récepteur CD4 de séquence générale (I) couplé à

une molécule organique portant une fonction maléïmide, est la suivante lorsque le SATA a été utilisé pour le couplage :



- 5 Il résulte de la présente invention que la molécule conjuguée telle que définie ci-dessus comporte un bras espaceur, dont la longueur varie selon le composé bifonctionnel utilisé.

Selon encore un autre mode de réalisation, la molécule conjuguée selon l'invention comprend le peptide dérivé du récepteur CD4 comprenant ou étant constitué par la séquence générale (I), de préférence la séquence SEQ ID N°1, et la molécule organique portant une fonction thiol choisie dans le groupe constitué par les peptides comportant essentiellement des résidus acides (acide aspartique, acide glutamique,...), les peptides comportant essentiellement des résidus phosphorylables (Ser, Thr, Tyr,...), et les peptides comportant essentiellement des résidus sulfatables (Ser, Thr, Tyr,...).

La présente invention a encore pour objet l'utilisation du peptide activé dérivé du récepteur CD4 comprenant ou étant constitué par la séquence générale (I) telle que définie ci-dessus, dans lequel le résidu d'acide aminé Lys est lié de façon covalente, avantageusement par une liaison amine, à un groupe actif maléïmide, pour le couplage par liaison covalente à une molécule organique comportant une fonction thiol ou thioacétyle.

Un autre objet de la présente invention est l'utilisation du peptide dérivé du récepteur CD4 comprenant ou étant constitué par la séquence générale (I) telle que définie ci-dessus, dans lequel le résidu d'acide aminé Lys est lié de façon

covalente, avantageusement par une liaison amine, à un groupe actif thiol protégé (ex : thioacétyle), pour le couplage par liaison covalente à une molécule organique comportant une fonction maléïmide ou halogène.

L'invention a également pour objet l'utilisation du peptide activé dérivé du récepteur CD4 comprenant ou étant constitué par la séquence générale (I) telle que définie ci-dessus, dans lequel le résidu d'acide aminé Lys est lié de façon covalente, avantageusement par une liaison amine, à un groupe actif maléïmide permettant le couplage par liaison covalente à une molécule organique comportant une fonction thiol ou thioacétyle, pour la fabrication d'un médicament destiné à un traitement antiviral.

L'invention a encore pour objet l'utilisation du peptide activé dérivé du récepteur CD4 comprenant ou étant constitué par la séquence générale (I) telle que définie ci-dessus, dans lequel le résidu d'acide aminé Lys est lié de façon covalente, avantageusement par une liaison amine, à un groupe actif thiol protégé (ex : -thioacétyle) permettant le couplage par liaison covalente à une molécule organique comportant une fonction maléïmide ou halogène, pour la fabrication d'un médicament destiné à un traitement antiviral.

De préférence, l'invention a pour objet l'utilisation du peptide activé dérivé du récepteur CD4 comprenant ou étant constitué par la séquence générale (I) telle que définie ci-dessus, dans lequel le résidu d'acide aminé Lys est lié de façon covalente, avantageusement par une liaison amine, à un groupe actif maléïmide permettant le couplage par liaison covalente à une molécule organique comportant une fonction thiol ou thioacétyle, pour la fabrication d'un médicament destiné à traiter le sida.

L'invention a encore pour objet une molécule conjuguée selon la présente invention, pour son utilisation en tant que médicament.

Selon encore un autre aspect, l'invention a pour objet l'utilisation de la molécule conjuguée selon la présente invention pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du sida.

5 L'invention concerne également une méthode de traitement antiviral, de préférence une méthode de traitement contre le sida, comprenant l'utilisation d'une molécule conjuguée selon la présente invention.

De préférence, la molécule conjuguée selon la présente invention est une
10 molécule conjuguée dans laquelle la séquence générale (I) est la séquence SEQ ID N°1, et la molécule organique portant une fonction thiol est le peptide GPR1 de séquence choisie dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4, avantageusement SEQ ID N°3.

15 Selon une autre préférence, la molécule conjuguée selon la présente invention est une molécule conjuguée dans laquelle la séquence générale (I) est la séquence SEQ ID N°1, et la molécule organique portant une fonction thiol choisie dans le groupe constitué par les peptides comportant essentiellement des résidus acides (acide aspartique, acide glutamique,...), les peptides comportant essentiellement
20 des résidus phosphorylables (Ser, Thr, Tyr,...), et les peptides comportant essentiellement des résidus sulfatables (Ser, Thr, Tyr,...).

Selon une autre préférence, la molécule conjuguée selon la présente invention est une molécule conjuguée dans laquelle la séquence générale (I) est la séquence
25 SEQ ID N°1, et la molécule organique portant une fonction thiol est le polyanion modifié portant la fonction thiol ou thioacétyle.

Les modes de réalisation décrits précédemment s'appliquent à ces différents aspects de l'invention.

Les exemples et figures qui suivent permettent d'illustrer la présente invention, mais n'en limitent pas la portée.

FIGURES

Figure 1 : Schéma de synthèse du peptide activé SMPH ou SATA/SATP dérivé du récepteur CD4, et de la molécule conjuguée miniCD4-GPR1.

5

Figure 2 : Elugramme HPLC final de la molécule conjuguée miniCD4-GPR1.

Epsilon ds 50µl TFA/CH3CN 35 % ; inj 10 µl ds 35-55

Nom de l'échantillon : GPR1-mCD4

10 Rapport pourcentage surface :

Trié par : Signal

Multiplicateur : 1.0000

Dilution : 1.0000

Utilise multiplicateur et facteur de dilution avec standard interne

15 Signal 1 : DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Tableau 1

Pic n°	Temps de Rétention [min]	Type	Largeur [min]	Surface [mAU*s]	Hauteur [mAU]	Surface %
1	10.667	BB	0.1595	14.20322	1.29982	0.9401
2	12.172	VV	0.1905	39.30429	2.93002	2.6016
3	12.596	VV	0.2345	1422.81519	89.94869	94.1780
4	13.382	VV B	0.2054	18.64892	1.12492	1.2344
5	14.117	BV	0.2103	15.80048	1.02216	1.0459
Totaux				1510.77210	96.32562	

Résultats obtenus avec intégrateur amélioré

20 **Figure 3 : Spectre de masse de la molécule conjuguée miniCD4-GPR1.**

Copie 3 du calcul de l'hypermasse pour -Q1 MCA (13 balayages) : à partir de FBX15899-56/InfMS-/b/14/12/05

Critères utilisés pour le calcul de l'hypermasse

Agent : , Masse : 1.0079, Charge : 1, Agent perdu

25 Tolérance pour l'estimation de la charge : 0.1000

Tolérances entre les estimations de masse : 20.0000

Tableau 2

Pic	Intensité	Charge	Charge calculée	Estimation de l'hypermasse
1306.33	10500.00	5	4.99783	6536.67
1633.34	215500.00	4	3.99783	6537.38
2178.24	139000.00	3	2.99935	6537.74

Masse finale estimée : 6537.26

Ecart-type : 0.54

5

Figure 4 : Elugramme HPLC final du peptide miniCD4 activé SATP

25-45 en 20min

Nom de l'échantillon : FBX13082-186-2

Rapport pourcentage surface :

10 Trié par : Signal

Multiplicateur : 1.0000

Dilution : 1.0000

Utilise multiplicateur et facteur de dilution avec standard interne

Signal 1 : DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

15

Tableau 3

Pic n°	Temps de Rétention [min]	Type	Largeur [min]	Surface [mAU*s]	Hauteur [mAU]	Surface %
1	13.883	VV	0.1668	520.71381	46.44330	100.0000
Totaux				520.71381	46.44330	

Résultats obtenus avec intégrateur amélioré

Figure 5 : Spectre de masse du peptide miniCD4 activé SATP

20 Copie du calcul de l'hypermasse pour +Q1 MCA (10 balayages): à partir de

FBX13082-186-2/Infpo/c/29/07/05

Critères utilisés pour le calcul de l'hypermasse

Agent : , Masse : 1.0079, Charge : 1, Agent gagné

Tolérance pour l'estimation de la charge : 0.1000

Tolérances entre les estimations de masse : 20.0000

Tableau 4

Pic	Intensité	Charge	Charge calculée	Estimation de l'hypermasse
757.72	125000.00	4	3.99687	3026.85
1010.22	45016000.00	3	2.99687	3027.64
1514.73	23987000.00	2	2.00039	3027.45

Masse finale estimée : 3027.31

5 Ecart-type : 0.41

Figure 6 : Elugramme HPLC final du peptide miniCD4 activé SMPH.

Environ 2 mg/ml

inj 5 µl ds 25-45

10 Nom de l'échantillon : FBX13082-190

Rapport pourcentage surface :

Trié par : Signal

Multiplicateur : 1.0000

Dilution : 1.0000

15 Utilise multiplicateur et facteur de dilution avec standard interne

Signal 1 : DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Tableau 5

Pic n°	Temps de Rétention [min]	Type	Largeur [min]	Surface [mAU*s]	Hauteur [mAU]	Surface %
1	12.674	BV F	0.0909	6.52587	1.07449	0.3925
2	12.753	VV	0.0714	6.31252	1.19955	0.3797
3	12.832	VV	0.0909	8.14971	1.23625	0.4902
4	13.027	VV F	0.0859	16.22212	2.63102	0.9758
5	13.212	VB	0.2055	1625.25330	120.40638	97.7617
Totaux				1662.46352	126.54769	

Résultats obtenus avec intégrateur amélioré

Figure 7 : Spectre de masse du peptide miniCD4 activé SMPH

Copie du calcul de l'hypermasse pour +Q1 MCA (10 balayages): à partir de
FBX13082-190/InfMSpo/c/03/08/05

Critères utilisés pour le calcul de l'hypermasse

5 Agent : , Masse : 1.0079, Charge : 1, Agent gagné

Tolérance pour l'estimation de la charge : 0.1000

Tolérances entre les estimations de masse : 20.0000

Tableau 6

Pic	Intensité	Charge	Charge calculée	Estimation de l'hypermasse
791.29	322500.00	4	4.00218	3161.12
1054.52	41316500.00	3	3.00218	3160.54
1581.43	7411500.00	2	1.99944	3160.84

Masse finale estimée : 3160.83

10 Ecart-type : 0.29

Figure 8 : Schéma de synthèse du peptide miniCD4 activé maléïmide via un espaceur PEO₂.**15 Figure 9 : Interaction miniCD4 et gp120**

L'affinité des miniCD4 synthétisés pour la gp120 a été évaluée par Biacore. Les résultats confirment que le mini CD4 que les Inventeurs ont « designé » comportant une seule lysine est un mime fonctionnel de la protéine CD4.

20 Figure 10

Chromatographie HPLC du dérivé maléïmide, mini-CD4-PEO₂. Prouvant que ce dernier est obtenu avec une pureté finale de 77%, comme indiqué dans l'exemple V de la description.

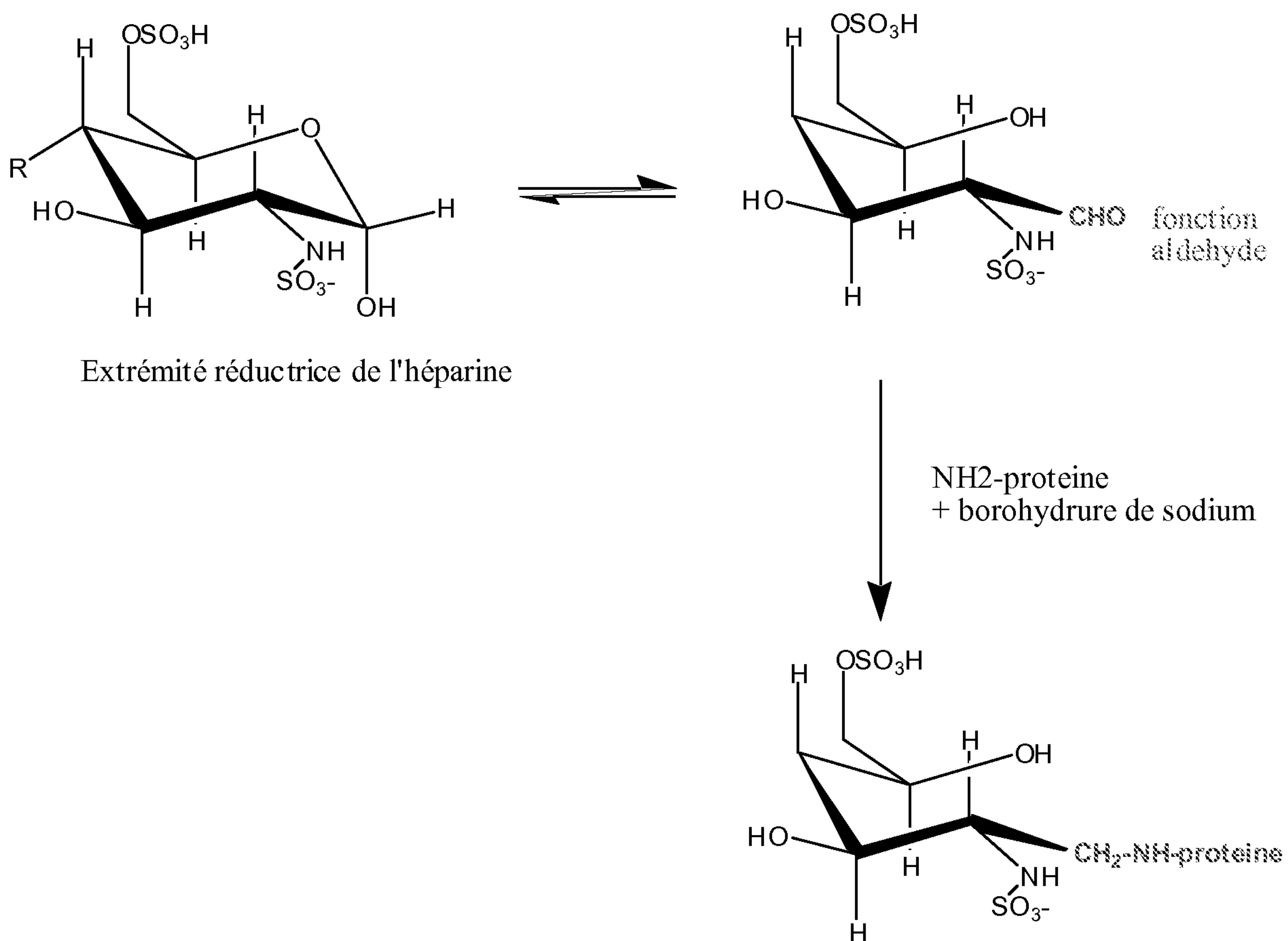
25 Figure 11

Spectre de masse, montrant la masse de dérivé obtenu (3205,3938)

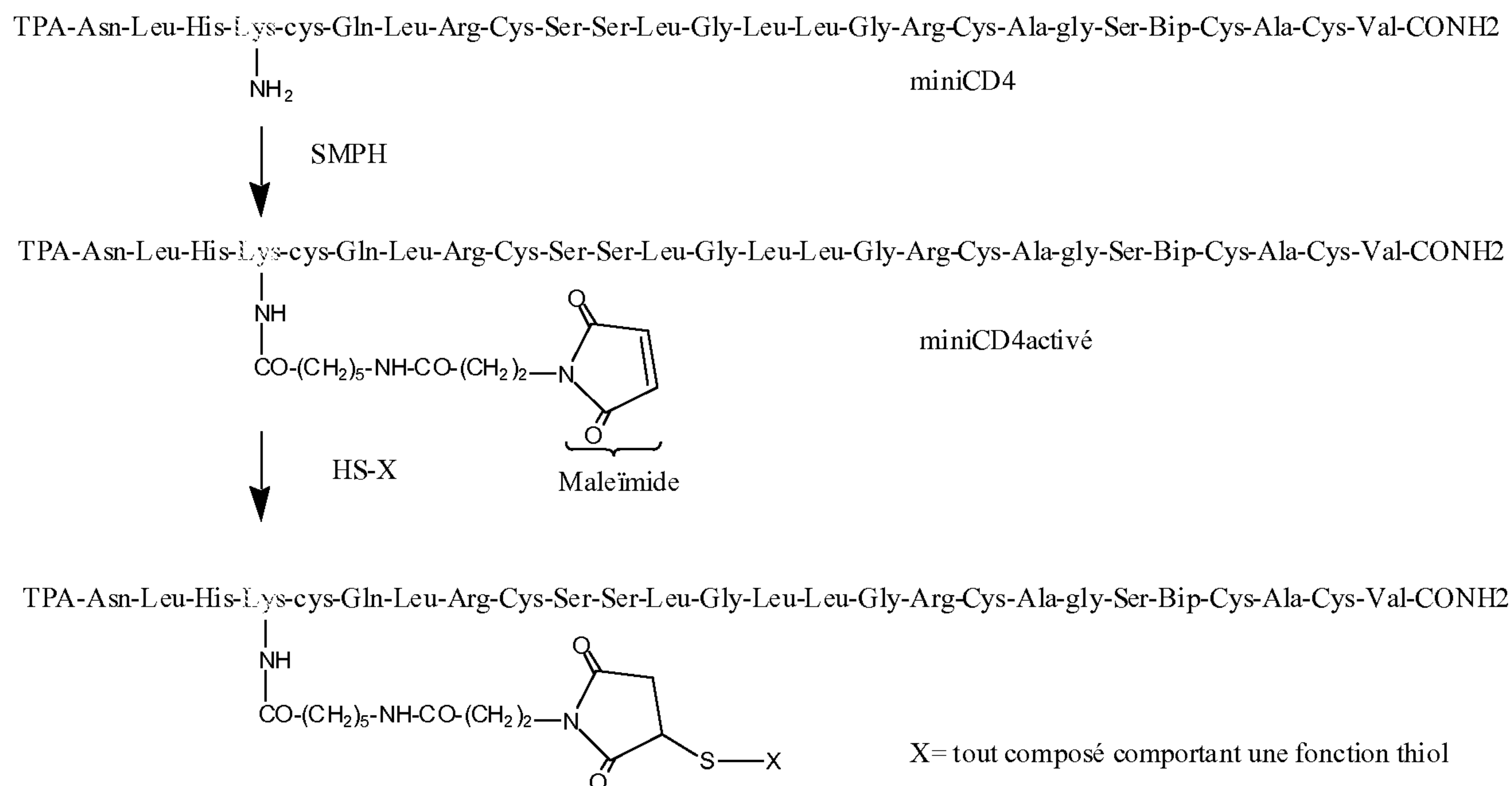
EXEMPLES**Exemple I Schémas de synthèse**

- 5 I.1 Schéma de synthèse de la méthode de couplage entre un peptide miniCD4 et un polyanion à laquelle il est fait allusion dans la demande WO 03/089000 (Najjam S. et al., Cytokine 1997, 9 (12) : 1013-1022).

Couplage d'une fonction amine sur l'extrémité réductrice d'un sucre



I.2 Schéma de synthèse d'une méthode de couplage selon la présente invention



- 5 Le mode d'activation du miniCD4 via l'incorporation de la fonction maléimide permet le couplage de tout composé comportant une fonction thiol libre (SH) ou une fonction thiol masquée (thioacétyle par exemple). Ce miniCD4 activé permet entre autre, l'obtention de conjugués covalents miniCD4-héparine, dans la mesure où l'héparine (ou tout autre polysaccharide) aura été préalablement
- 10 dérivatisé par une fonction thiol.

Exemple II Synthèse chimique de mini-CD4 activés avec du SMPH ou du SATP

15 II.1 Synthèse de mini-CD4

Un mini-peptide CD4 a été synthétisé conformément à la méthodologie de synthèse peptidique en phase solide Fmoc (« Fmoc solid Phase peptide synthesis, a practical approach », publié par W.C. Chan et P.D. White, Oxford university

press, 2000) sur un synthétiseur de peptides Applied Biosystems 433. En partant de 0,1 mmole de résine amide-Fmoc, l'élongation par étapes de la chaîne peptidique a été réalisée par couplage de 10 équivalents d'acides aminés protégés par Fmoc et activés avec un mélange HATU/DIEA. La fonction thiopropionyle N-terminale a été introduite par couplage de SPDP (1,6 équivalent dans du DMF) sur le peptide-résine.

Après clivage par du TFA/H₂O/EDT/TIS (94/2,5/2,5/1), le peptide a été récupéré par précipitation dans de l'éther diéthylique froid. Après lyophilisation, le peptide brut (156 mg) a été réduit pendant une nuit par du DTT dans une solution d'acide acétique à 20 % et purifié par MPLC en phase inverse sur une colonne Nucleoprep C18, 20 µm, 100 Å (26 X 313 mm) en utilisant un gradient linéaire de 30 à 90 % de B dans A, sur une période de 60 min, à un débit de 20 ml/min (B= 80 % de CH₃CN/ 20 % de TFA aqueux à 0,08 %; A= 100 % de TFA aqueux à 0,08 %). Les fractions pures ont été rassemblées et lyophilisées. Le peptide a ensuite été replié par traitement au GSH/GSSG pendant une nuit. Le peptide replié a été purifié par MPLC en utilisant un gradient de 20 à 80 % sur une période de 60 min, donnant lieu à 8,7 mg de mini-CD4. La pureté (93,5 %) a été vérifiée par HPLC analytique en phase inverse sur une colonne Nucleosil C18, 5 µm, 300 Å (4,6 X 150 mm) en utilisant un gradient linéaire de 25 à 35 % de CH₃CN dans du TFA aqueux à 0,08 %, sur une période de 20 min, à un débit de 1 ml/min (temps de rétention = 15,44 min).

ES⁺MS : 2896,32 ± 0,23; attendu : 2896,49 ; Rendement : 5,5 %.

II.2 Mini-CD4 activé avec du SMPH

25

Le groupement maléïmide a été introduit sur la chaîne latérale de Lys du mini-CD4 par réaction de 4 équivalents de SMPH dans un tampon phosphate pH = 8. La réaction a été contrôlée par HPLC. Après 15 min, on a atteint 100 % du couplage. Après purification sur une colonne Nucleosil C18 semi-préparative pour HPLC en phase inverse, 5 µm, 300 Å (10 X 250 mm), en utilisant un gradient

30

linéaire de 25 à 45 % de CH₃CN dans du TFA aqueux à 0,08 %, sur une période de 20 min, à un débit de 6 ml/min, la pureté finale (97,7 %) du mini-CD4 activé avec le SMPH a été contrôlée par RP-HPLC analytique en utilisant un gradient linéaire de 25 à 45 % (temps de rétention = 13,21 min).

- 5 ES⁺MS : 3160,83 ± 0,29; attendu : 3160,78. Rendement : 1,9 mg (67 %).

II.3 Mini-CD4 activé avec du SATP

Le groupe thioacétyle a été introduit sur la chaîne latérale de Lys du mini-CD4
10 par réaction de 1 équivalent de SATP dans un tampon phosphate pH = 8. La réaction a été contrôlée par HPLC. Après 3 min, on a atteint 46% du couplage. Le candidat mini-CD4 activé avec le SATP a été isolé sur une colonne Nucleosil C18 semi-préparative pour HPLC en phase inverse, 5 µm, 300 Å (10 X 250 mm), en utilisant un gradient linéaire de 20 à 40 % de CH₃CN dans du TFA aqueux à 0,08
15 %, sur une période de 20 min, à un débit de 6 ml/min. La pureté finale (100 %) du mini-CD4 activé avec le SATP a été contrôlée par RP-HPLC analytique en utilisant un gradient linéaire de 25 à 45 % (temps de rétention = 13,88 min).

ES⁺MS : 3027,31 ± 0,41; attendu : 3027,66. Cette réaction de couplage a été réalisée une fois et pourrait être optimisée en ajoutant directement 2 équivalents de
20 SATP.

Exemple III Synthèse chimique d'un peptide mini-CD4-GPR1

III.1 Synthèse de GPR1

25

Un peptide GPR1 a été synthétisé en utilisant la synthèse peptidique en phase solide Fmoc conventionnelle, comme décrit pour le mini-CD4. Un résidu Cys a été incorporé à l'extrémité C-terminale de la séquence de GPR1, pour permettre le couplage spécifique à la fonction maléïmide du mini-CD4 activé avec le SMPH.
30 La pureté finale (91%) du peptide GPR1 a été contrôlée par RP-HPLC analytique en utilisant un gradient linéaire de 20 à 40% (temps de rétention = 4,64 min).

ES⁺MS : 3376,44 ± 0,49; attendu : 3376,58. Rendement : 12,9 mg (5,8 %).

III.2 Couplage de GPR1 au mini-CD4 activé avec du SMPH

Un peptide GPR1 (1,5 mg ; 0,4 µmole) dans 200 µl de tampon phosphate pH =
5 7,4 a été ajouté à 200 µl d'une solution aqueuse de mini-CD4 activé avec du
SMPH (0,95 mg ; 0,3 µmole). La réaction a été contrôlée par HPLC. Après 15
min, le pic correspondant au mini-CD4 activé avec le SMPH a complètement
disparu. Le candidat peptide GPR1-mini-CD4 a été isolé sur une colonne
Nucleosil C18 semi-préparative pour HPLC en phase inverse, 5 µm, 300 Å (10 X
10 250 mm) en utilisant un gradient linéaire de 35 à 55 % de CH₃CN dans du TFA
aqueux à 0,08 %, sur une période de 20 min, à un débit de 6 ml/min.

La pureté finale (94,2 %) du peptide GPR1-mini-CD4 a été contrôlée par RP-
HPLC analytique en utilisant un gradient linéaire de 35 à 55 % (temps de rétention
= 12,60 min).

15 ES⁺MS : 6537,26 ± 0,54; attendu : 6537,38. Rendement : 1,9 mg (96 %).

Exemple IV Pertinence du choix de la séquence générale (I) comportant un et un seul résidu lysine en position définie

20 La pertinence du choix de la séquence générale (I) comportant un et un seul
résidu lysine en position définie a été validée par la synthèse d'un peptide
miniCD4 dérivatisé sur la Lys par un (PEO)₄-Biotin à l'aide du réactif EZ-Link-
NHS-(PEO)₄-Biotin PIERCE (Rockford, IL).

L'introduction de ce dérivé Biotin en position définie dans la séquence générale (I)
25 ne modifie pas la fixation de la gp120 sur le miniCD4 (mesure Biacore effectuée).

Les différentes synthèses n'ont pas été optimisées. De meilleurs rendements
devraient être obtenus.

Exemple V Synthèse chimique de mini-CD4 activés maléïmide via un espaceur PEO₂.

Voir Figure 8, Figure 10 et Figure 11

- 5 Le mCD4- PEO₂-maléïmide diffère du composé mCD4-SMPH par la nature du bras espaceur (linker). En effet pour des raisons de solubilité, un linker polyéthylèneoxyde (PEO₂) plus hydrophile a été introduit entre le miniCD4 et la fonction maléïmide.
- 10 Synthèse : Une solution de 10 mg de mCD4 (MW : 2897 ; 3,4 mmoles) dans 1 ml H₂O a été diluée dans 1 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH8. A cette solution trouble ont été ajoutés 4,5 mg de NHS-PEO₂-Maléïmide (MW : 325, 13,8 mmoles ; 4 équiv.) dans 20 µl de DMSO sous agitation. Après 10 min, 85 % (HPLC) du matériel de départ a été converti en dérivé maléïmide. En raison de la
- 15 faible stabilité du groupe maléïmide à pH8, la réaction de couplage a été directement chargée sur une colonne C18 SepaK équilibrée avec 10 % de CH₃CN dans du TFA 0,08% aqueux. Le dérivé maléïmide a été élué avec 50% de CH₃CN. Après lyophilisation, le composé a été ensuite purifié sur une colonne semi-préparative. Rendement: 5,2 mg (48 %); Pureté finale: 77%
- 20 ES+ : 3205,3938 (M monoisotopique attendue: 3205,4211), QTOF micro Waters, MaxEnt1
- Conditions HPLC:
- Analytique: Nucleosil 5C18 300Å (4,6 x 150 mm); gradient linéaire 25-45 % de CH₃CN dans du TFA 0,08% aqueux en 20 min à un débit de 1 ml/min. Détection:
- 25 230 nm. mCD4 Rt= 10,7 min; mCD4-PEO₂-Mal Rt=12,8 min
- Semi-préparative: Nucleosil 5C18 300Å (10 x 250 mm)); gradient linéaire 25-45 % de CH₃CN dans du TFA 0,08% aqueux en 20 min à un débit de 6 ml/min. Détection: 230 nm. mCD4-PEO₂-Mal Rt=11,4 min

Abréviations

Fmoc : 9-fluorénylméthoxycarbonyle

5 HATU : N-oxyde d'hexafluorophosphate de N[(diméthylamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-1-ylméthylène]-N-méthylméthanaminium

DIEA : diisopropyléthylamine

SPDP : N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate

TFA : acide trifluoroacétique

EDT : éthanedithiol

10 TIS : triisopropylsilane

DTT : 1,4-dithiothréitol

MPLC: chromatographie liquide moyenne pression

ES⁺MS : spectrométrie de masse électrospray, en mode positif

GSH : glutathion réduit

15 GSSG : glutathion oxydé

HPLC : chromatographie liquide haute performance

SMPH : succinimidyl-6-[β-maléimidopropionamido]hexanoate

SATP : N-succinimidyl-S-acétylthiopropionate

GPR1 : récepteur 1 couplé à une protéine G

Revendications

1. Procédé de préparation d'un peptide activé dérivé du récepteur CD4, ledit peptide, une fois activé, étant capable de se coupler par liaison covalente à une molécule organique, et dans lequel ledit peptide dérivé du récepteur CD4 comprend la séquence générale (I) suivante :

Xaa^f - P1 - Lys - Cys - P2 - Cys - P3 - Cys - Xaa^g - Xaa^h - Xaaⁱ - Xaa^j - Cys - Xaa^k - Cys - Xaa^l - Xaa^m, (I)

dans laquelle :

- P1 représente 3 à 6 résidus d'acides aminés,
- P2 représente 2 à 4 résidus d'acides aminés,
- P3 représente 6 à 10 résidus d'acides aminés,
- Xaa^f représente la N-acétylcystéine (Ac-Cys) ou l'acide thiopropionique (TPA),
- Xaa^g représente Ala ou Gln,
- Xaa^h représente Gly ou (D)Asp ou Ser,
- Xaaⁱ représente Ser ou His ou Asn,
- Xaa^j représente la biphenylalanine (Bip), la phénylalanine ou la [bêta]-naphthylalanine,
- Xaa^k représente Thr ou Ala,
- Xaa^l représente Gly, Val ou Leu, et
- Xaa^m représente -NH₂ ou -OH,

les résidus d'acides aminés dans P1, P2 et P3 étant naturels ou non naturels, identiques ou différents, lesdits résidus de P1, P2 et P3 étant tous différents du résidu Lys, et P1, P2 et P3 ayant ou non une séquence commune,

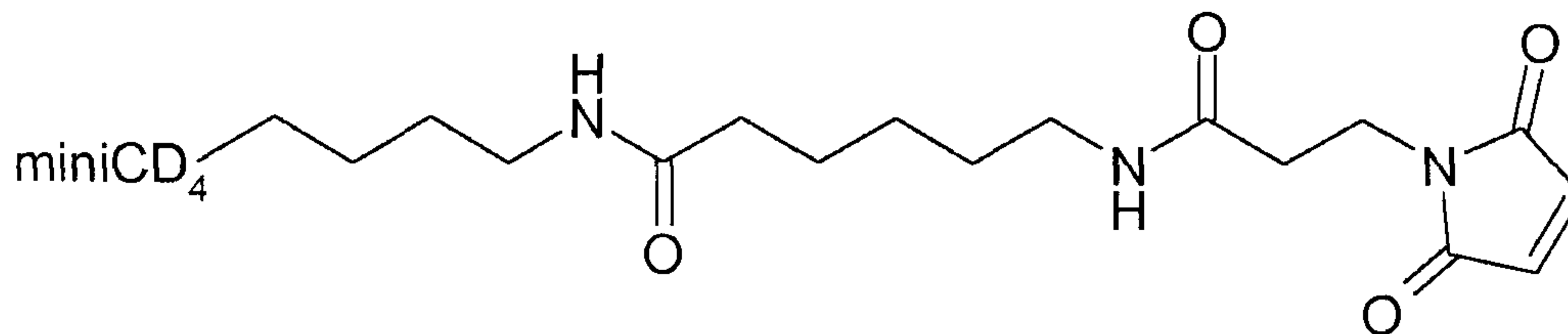
caractérisé en ce que le procédé comprend la mise en présence du peptide de séquence générale (I) dérivé du récepteur CD4 avec un composé bifonctionnel portant deux groupes actifs, dont l'un au moins des deux groupes actifs est capable de former une liaison covalente avec la fonction amine libre (-NH₂) du résidu d'acide aminé Lys présent dans la séquence générale (I).

2. Procédé de préparation d'un peptide activé selon la revendication 1, dans lequel la séquence du peptide dérivé du récepteur CD4 de séquence générale (I) est choisie dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:1 et SEQ ID NO:2.

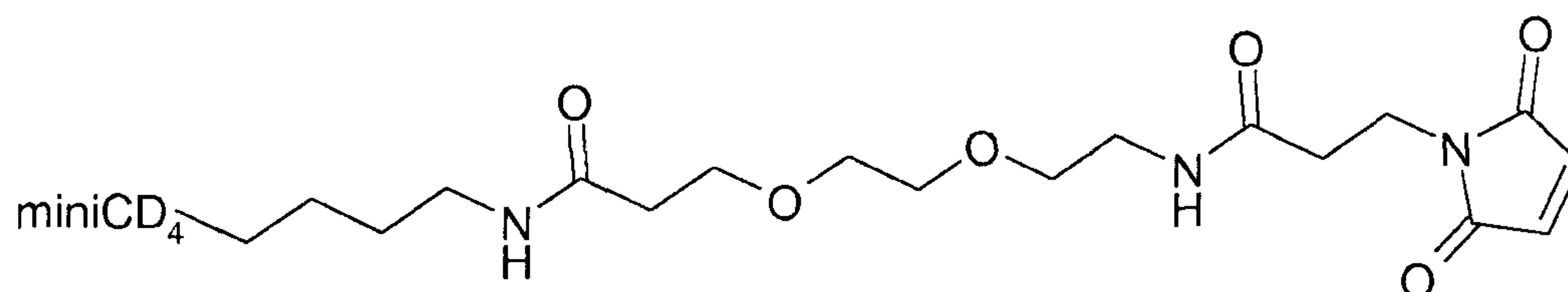
3. Procédé de préparation d'un peptide activé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel le groupe actif capable de former une liaison covalente avec la fonction amine libre (-NH₂) du résidu d'acide aminé Lys présent dans la séquence générale (I), est le groupe actif N-hydroxysuccinimide ester (NHS).

4. Procédé de préparation d'un peptide activé selon la revendication 3, dans lequel les deux groupes actifs du composé bifonctionnel sont différents, et dans lequel l'un des deux groupes représente le groupe actif NHS.
5. Procédé de préparation d'un peptide activé selon la revendication 4, dans lequel le composé bifonctionnel est le succinimidyl-6-[bêta-maléimidopropionamido]hexanoate (SMPH).
6. Procédé de préparation d'un peptide activé selon la revendication 4, dans lequel le composé bifonctionnel est choisi dans le groupe constitué par le N-succinimidyl-S-acétylthioacétate (SATA) et le N-succinimidyl-S-acétylthiopropionate (SATP).
7. Procédé de préparation d'un peptide activé selon la revendication 4, dans lequel le composé bifonctionnel est NHS-PEO_n-maléïmide, n étant compris entre 2 et 24.
8. Procédé de préparation d'un peptide activé selon la revendication 7, dans lequel n=2, le composé bifonctionnel étant l'ester de succinimidyl-[(N-maléimidopropionamido)-diéthyléneglycol].
9. Procédé de préparation d'un peptide activé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel Xaa^f représente TPA, comprenant une étape préliminaire de préparation du peptide dérivé du récepteur CD4 de séquence générale (I), dans laquelle le peptide dérivé du récepteur CD4 de séquence générale (II) suivante :
P1- Lys - Cys - P2 - Cys - P3 - Cys - Xaa^g - Xaa^h - Xaaⁱ - Xaa^j - Cys - Xaa^k - Cys - Xaa^l - Xaa^m, (II)
dans laquelle P1 à P3 et Xaa^g à Xaa^m sont tels que définis dans la séquence générale (I), est mis en présence avec le N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) pour incorporer le TPA à l'extrémité N-terminale dudit peptide dérivé du récepteur CD4 de séquence générale (II).
10. Peptide activé dérivé du récepteur CD4 comprenant la séquence générale (I) telle que définie dans la revendication 1, dans lequel le résidu d'acide aminé Lys est lié de façon covalente, à un groupe actif capable de se coupler par liaison covalente à une molécule organique.
11. Peptide activé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le résidu d'acide aminé Lys est liée par un liaison amine au group actif.
12. Peptide activé selon la revendication 10 ou 11, dans lequel le groupe actif est le groupe maléïmide.

13. Peptide activé selon la revendication 12, de structure moléculaire suivante:

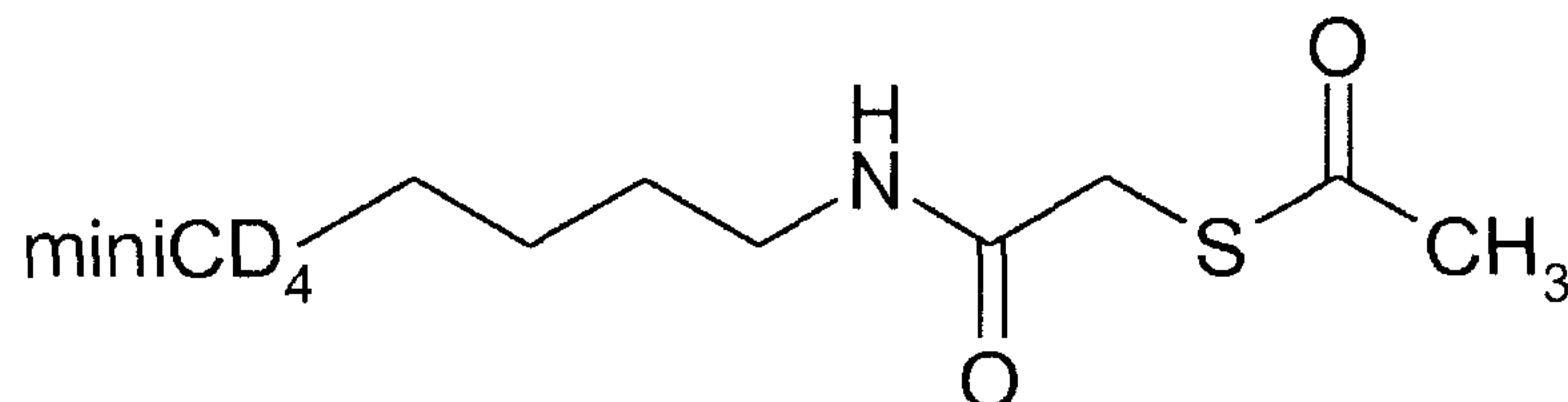


14. Peptide activé selon la revendication 12, de structure moléculaire suivante:

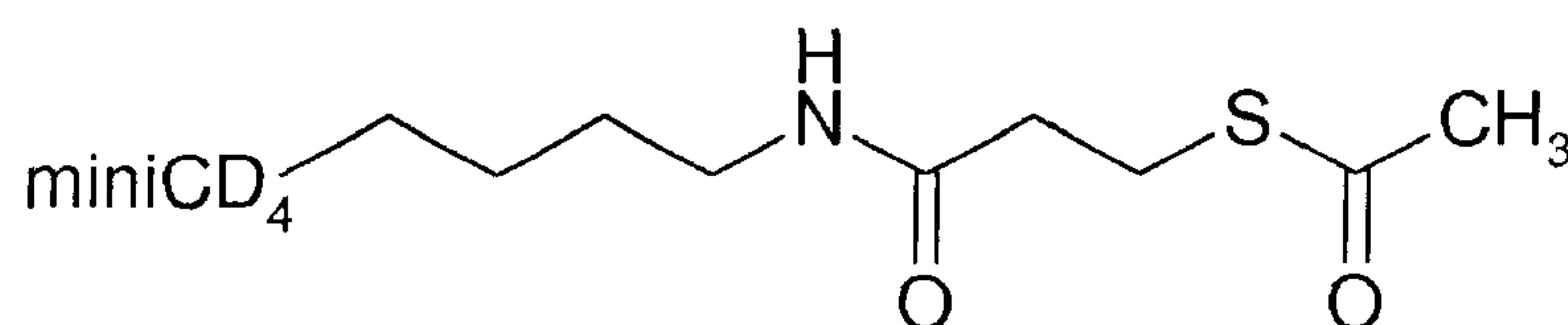


15. Peptide activé selon la revendication 10 ou 11, dans lequel le groupe actif est le groupe thioacétyle.

16. Peptide activé selon la revendication 15, de structure moléculaire suivante:



17. Peptide activé selon la revendication 15, de structure moléculaire suivante:



18. Procédé de préparation d'une molécule conjuguée comportant un peptide dérivé du récepteur CD4 couplé par liaison covalente à une molécule organique, ledit peptide dérivé du récepteur CD4 comprenant la séquence générale (I) telle que définie dans la revendication 1, caractérisé en ce que le procédé comprend la mise en présence du peptide activé selon l'une quelconque des revendications 10 à 17 avec la molécule organique.

19. Procédé de préparation d'une molécule conjuguée selon la revendication 18, dans lequel le peptide activé est le peptide selon l'une quelconque des revendications 12 à 14 et la molécule organique porte une fonction thiol ou thioacétyle.
20. Procédé de préparation d'une molécule conjuguée selon la revendication 19, dans lequel la molécule organique portant une fonction thiol est le peptide GPR1 de séquence choisie dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:3 et SEQ ID NO:4.
21. Procédé de préparation d'une molécule conjuguée selon la revendication 19, dans lequel la molécule organique portant une fonction thiol est choisie dans le groupe constitué par les peptides comportant des résidus acides, les peptides comportant des résidus phosphorylables, et les peptides comportant des résidus sulfatables.
22. Procédé de préparation d'une molécule conjuguée selon la revendication 19, dans lequel la molécule organique portant une fonction thiol est un polyanion modifié portant la fonction thiol.
23. Procédé de préparation d'une molécule conjuguée selon la revendication 22, dans lequel le polyanion modifié portant la fonction thiol est choisi dans le groupe constitué par l'héparine et l'héparane sulfate et a un degré de polymérisation dp de 10 à 24.
24. Procédé de préparation d'une molécule conjuguée selon la revendication 18, dans lequel le peptide activé est le peptide selon l'une quelconque des revendications 15 à 17 et la molécule organique porte une fonction maléïmide ou halogène.
25. Molécule conjuguée comportant un peptide dérivé du récepteur CD4 comprenant la séquence générale (I) telle que définie dans la revendication 1 couplé à une molécule organique, dans laquelle le peptide dérivé du récepteur CD4 et la molécule organique sont couplés l'un à l'autre par un bras espaceur, et dans laquelle le résidu d'acide aminé Lys de la séquence générale (I) forme une liaison amine avec le bras espaceur.
26. Molécule conjuguée selon la revendication 25, dans laquelle la séquence générale (I) est la séquence SEQ ID NO:1, et la molécule organique est le peptide GPR1 de séquence choisie dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:3 et SEQ ID NO:4.
27. Molécule conjuguée selon la revendication 25, dans laquelle la séquence générale (I) est la séquence SEQ ID NO:1, et la molécule organique est un polyanion modifié portant une fonction thiol.

28. Utilisation du peptide activé selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, pour le couplage d'une molécule organique comportant une fonction thiol ou thioacétyle.
29. Utilisation du peptide activé selon l'une des revendications 15 à 17, pour le couplage d'une molécule organique comportant une fonction maléïmide ou halogène.
30. Utilisation du peptide activé selon l'une quelconque des revendications 11 à 17, pour la fabrication d'un médicament destiné à un traitement antiviral.
31. Utilisation selon la revendication 30, dans laquelle le médicament est destiné à traiter le sida.
32. Utilisation de la molécule conjuguée selon la revendication 26 ou 27 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du sida.
33. Utilisation du peptide activé selon l'une quelconque des revendications 11 à 17, pour traiter le sida.

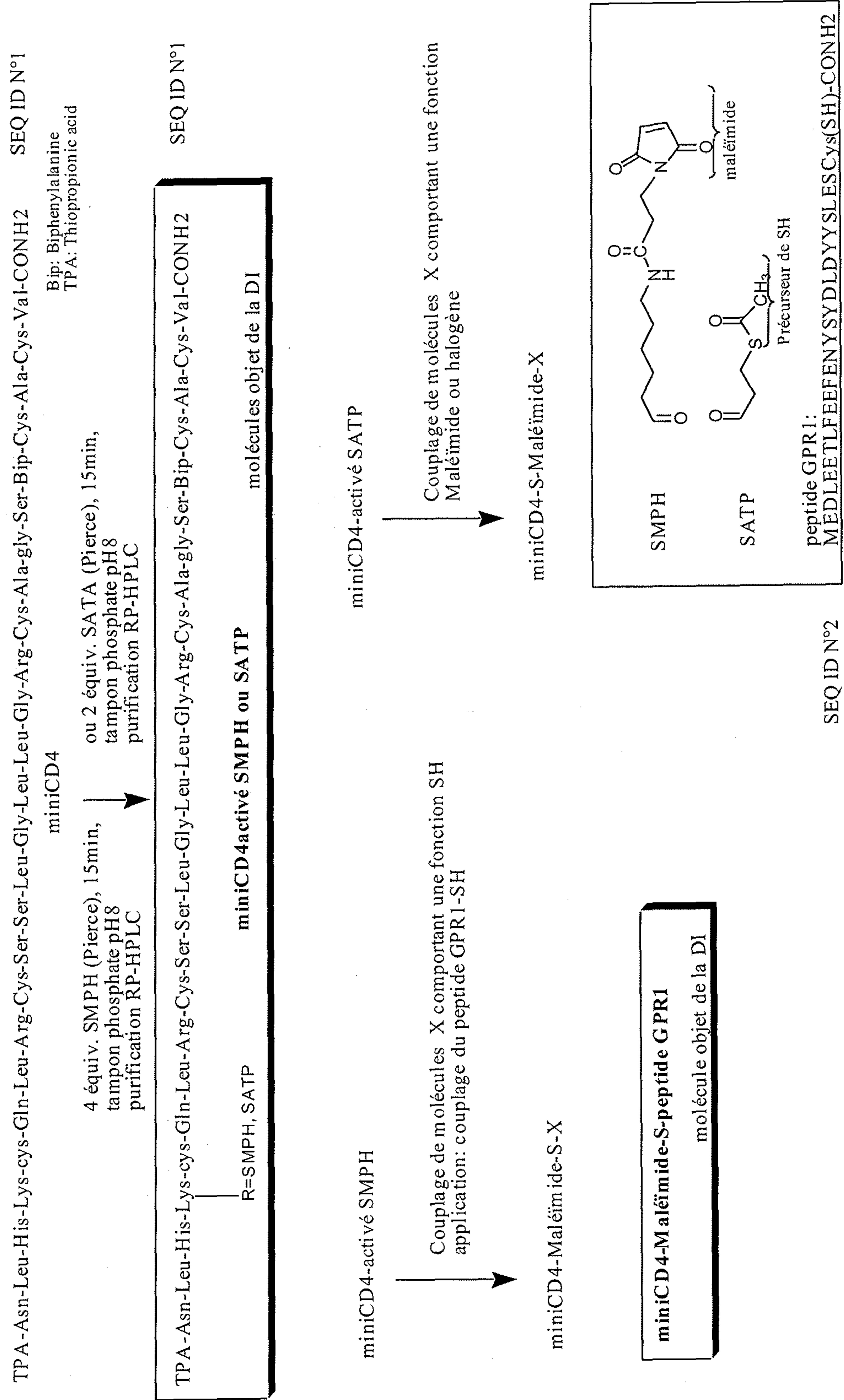


Figure 1

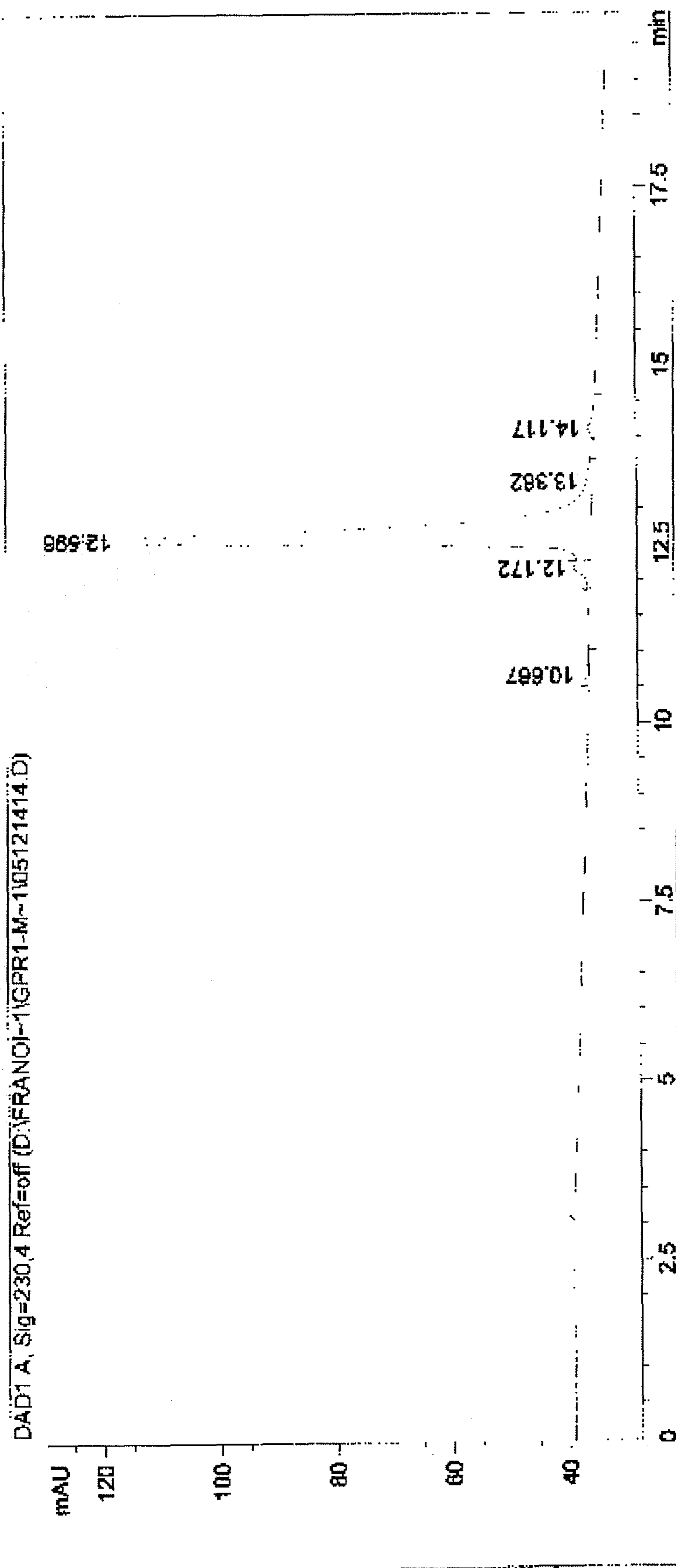


Figure 2

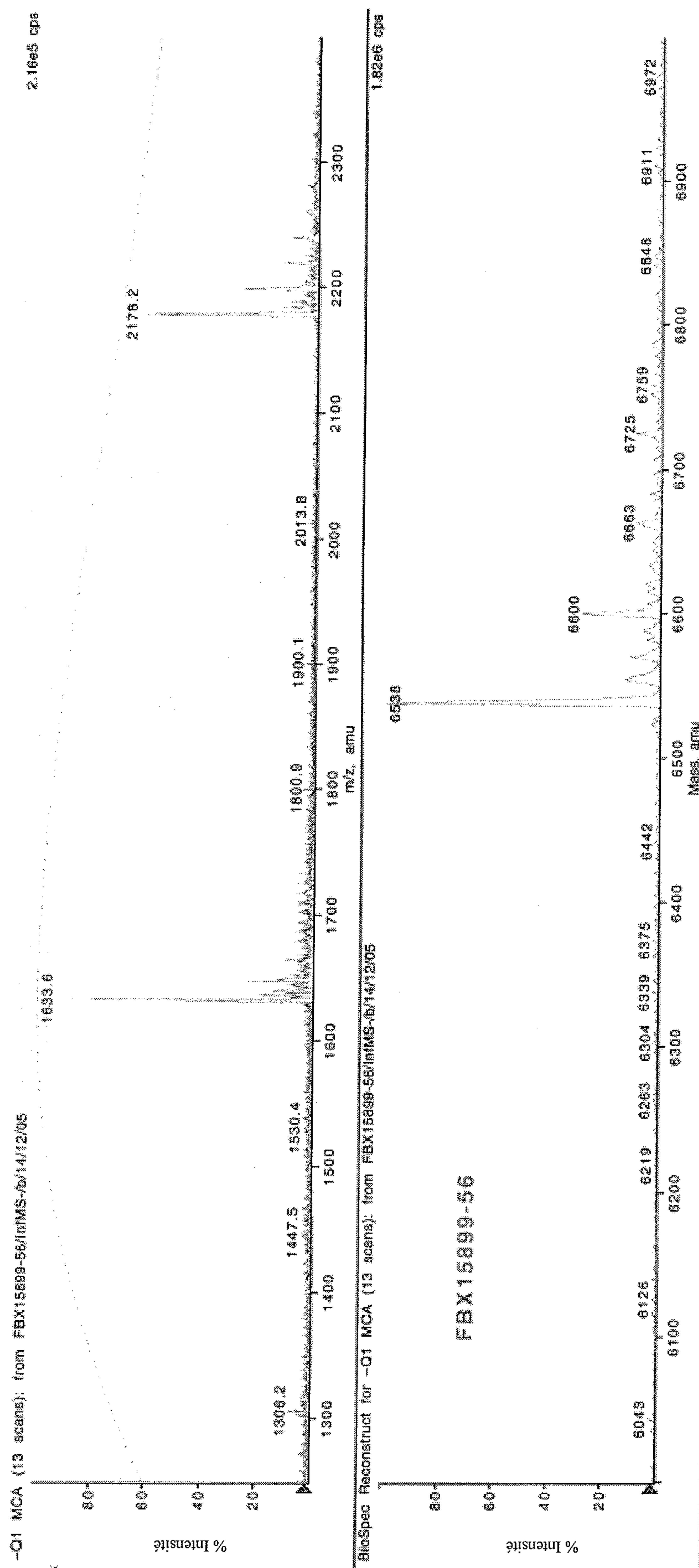


Figure 3

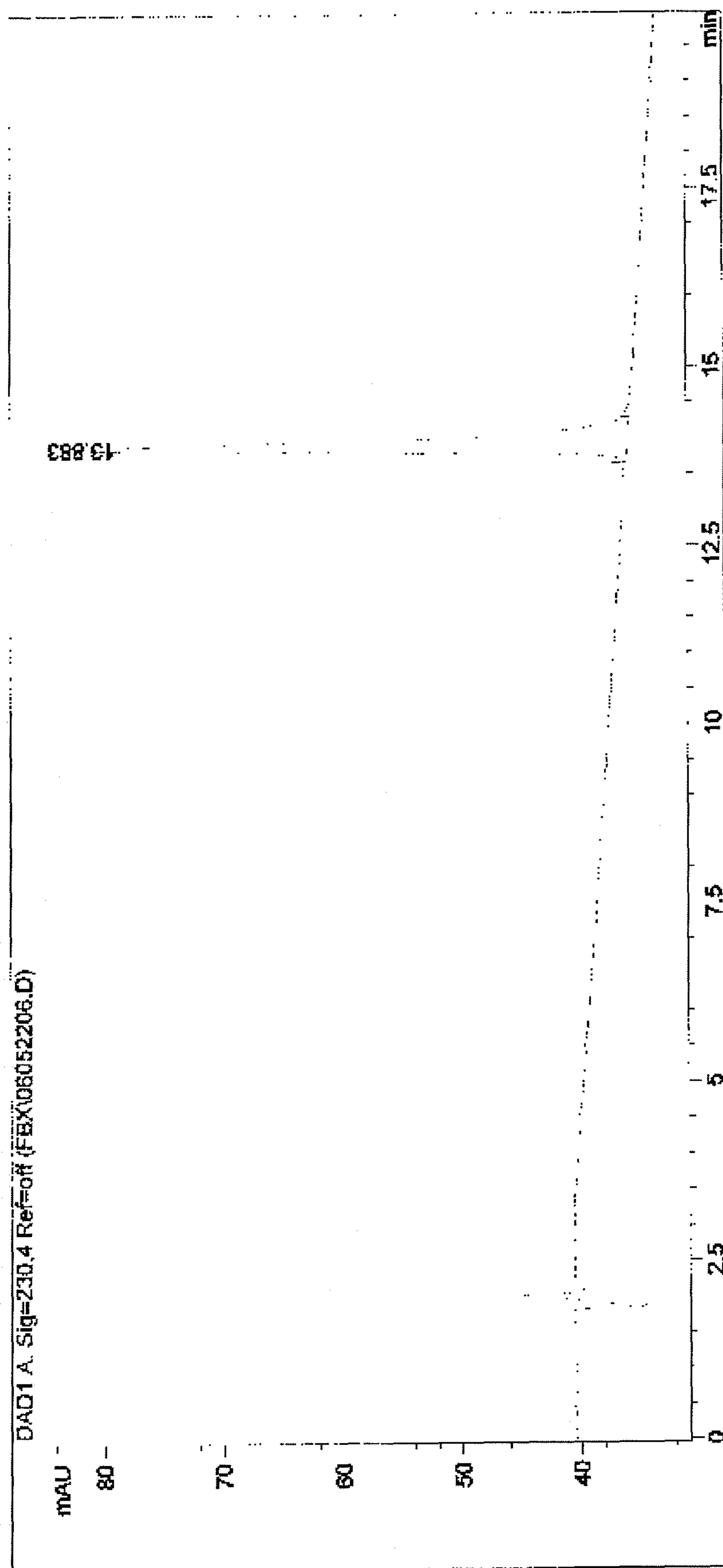


Figure 4

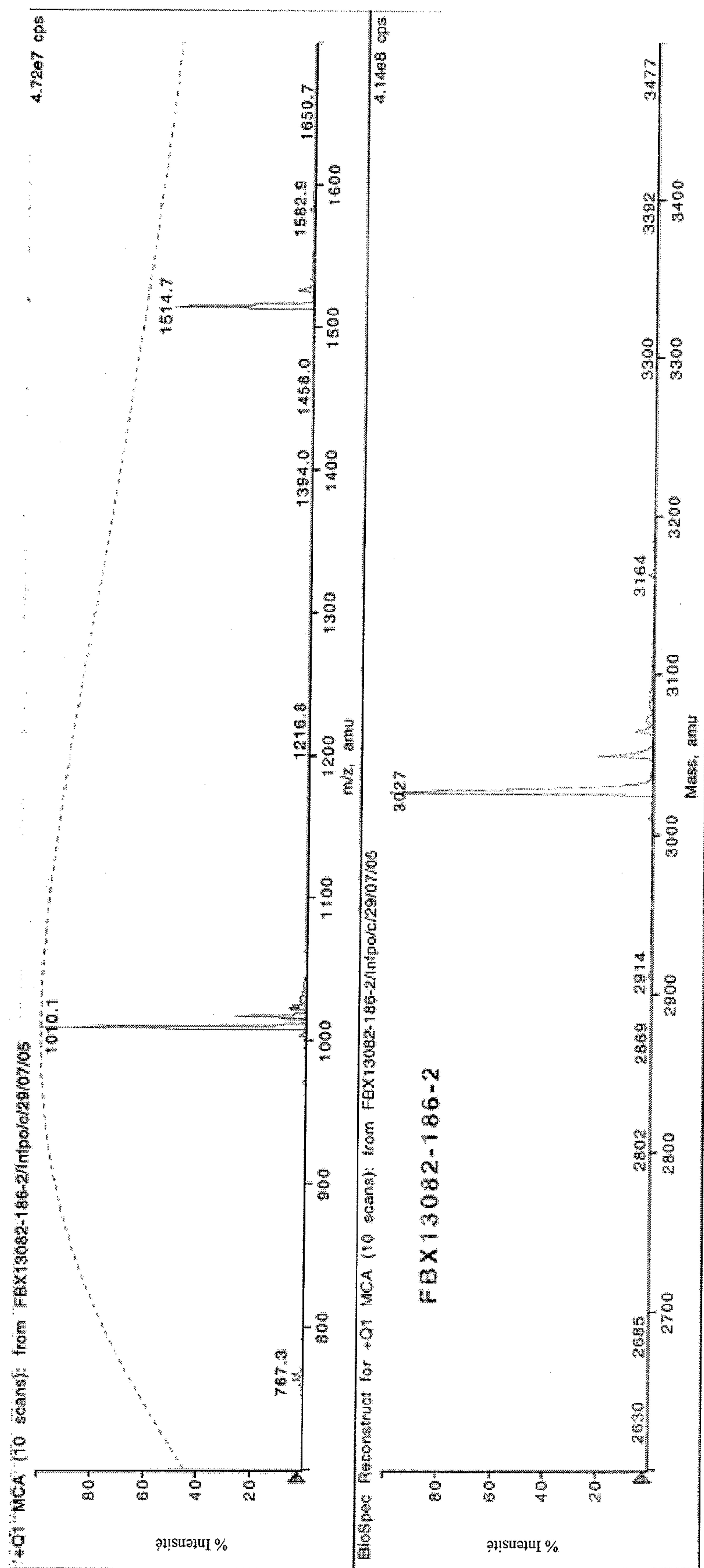


Figure 5

6/11

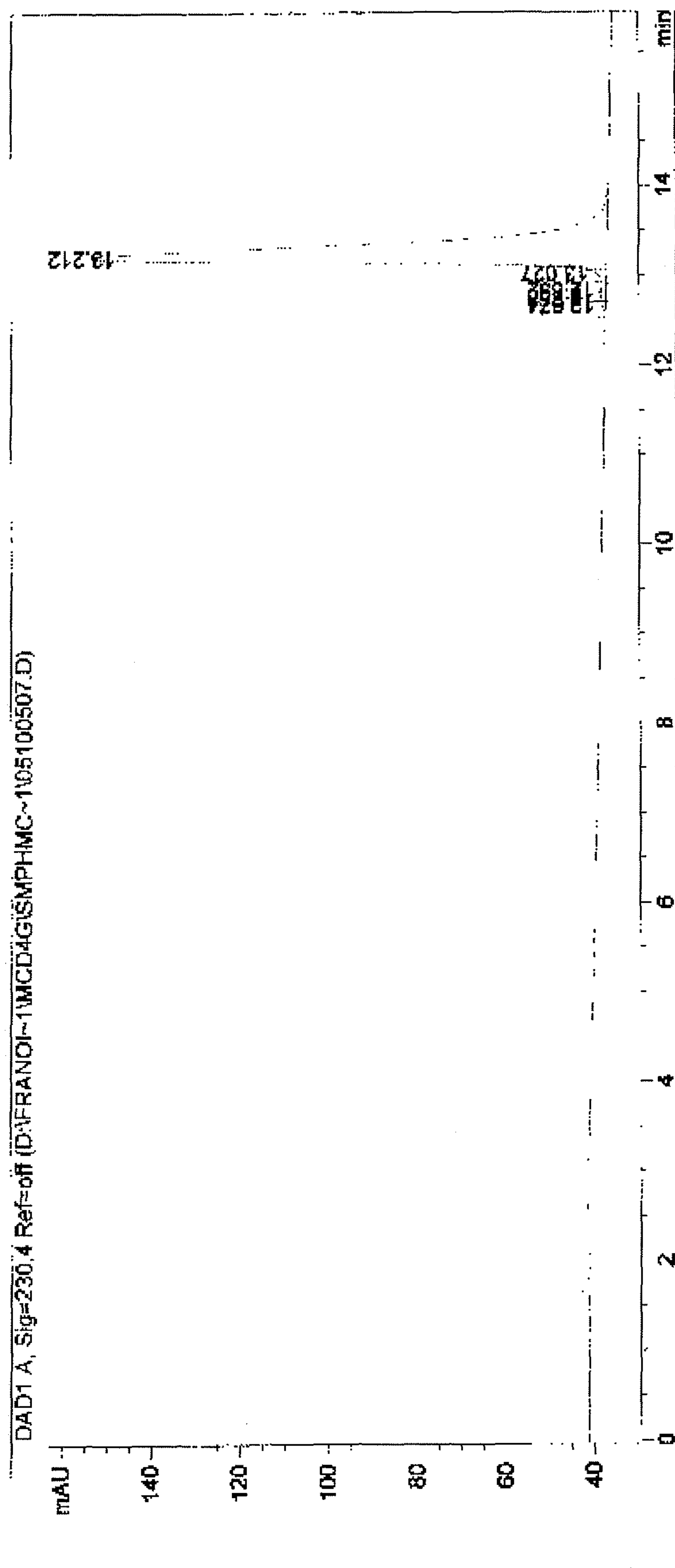


Figure 6

7/11

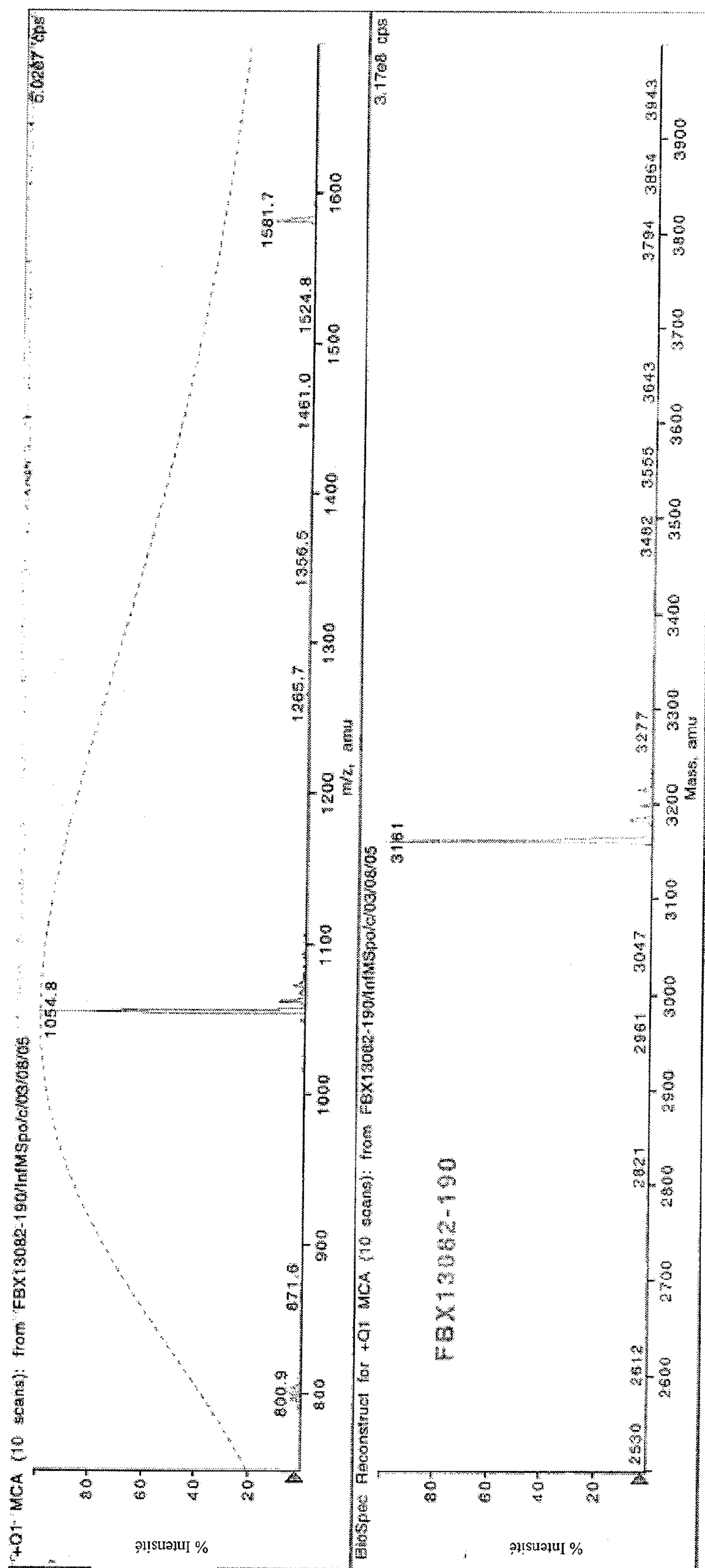


Figure 7

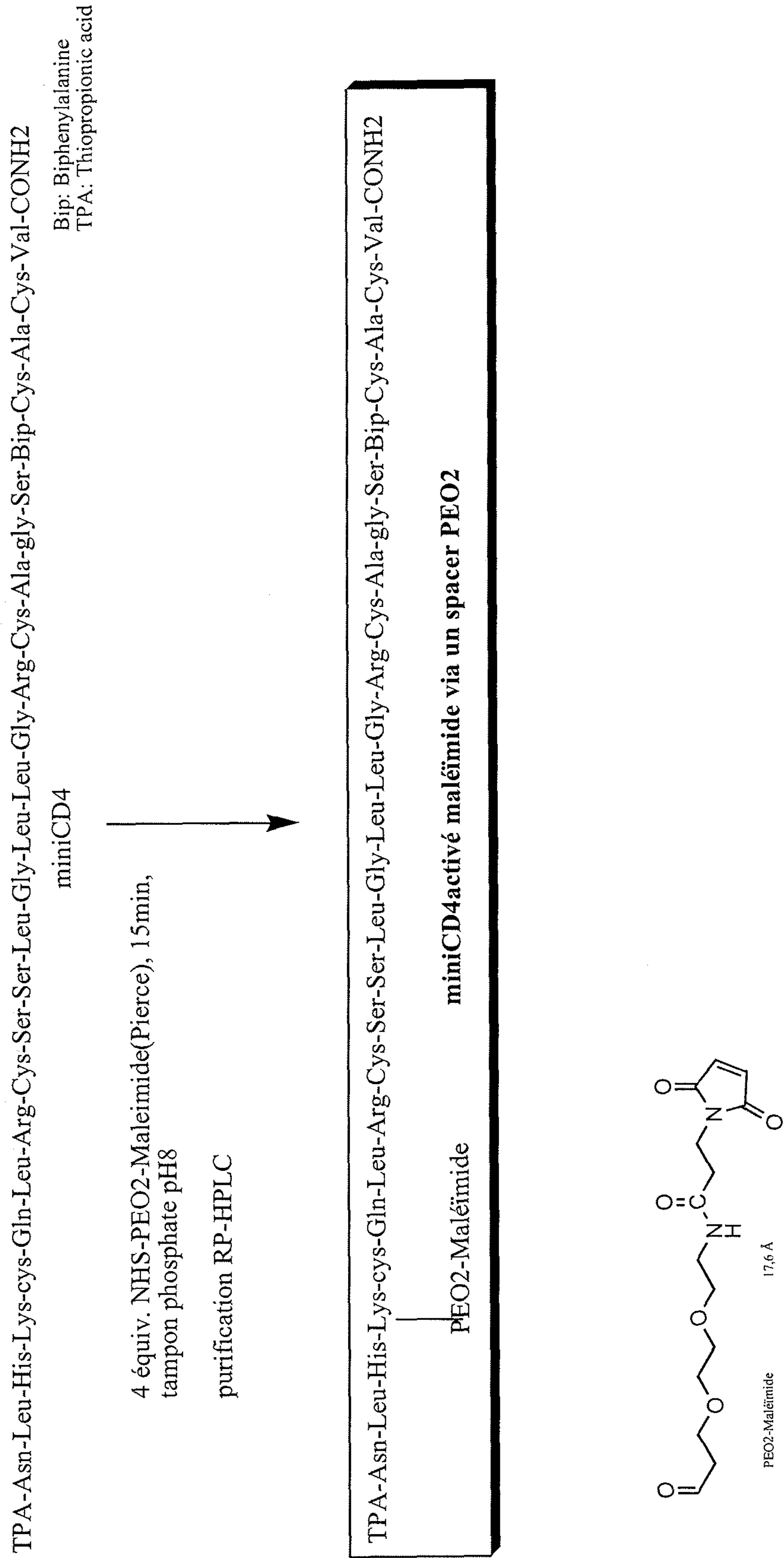


Figure 8

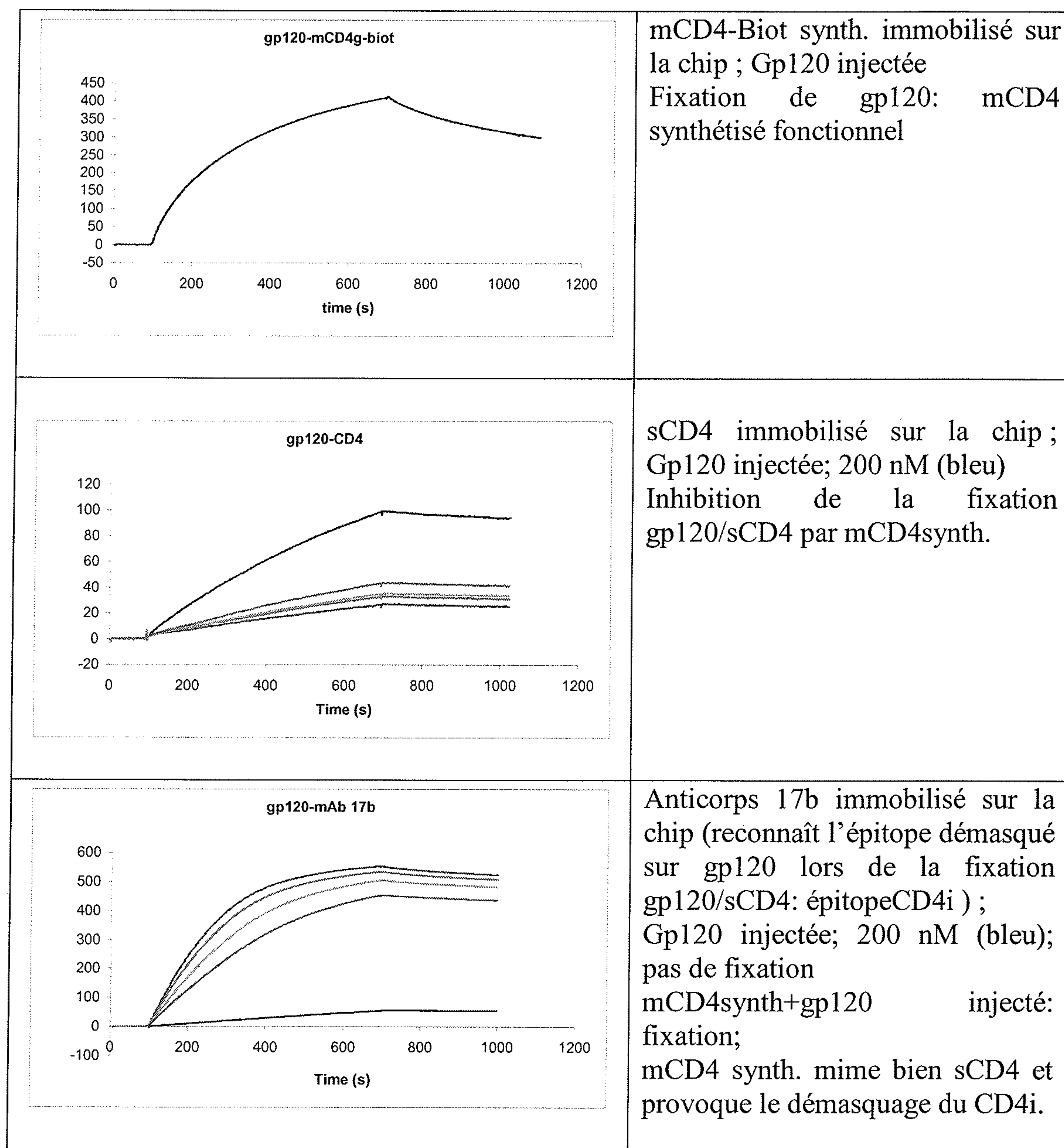
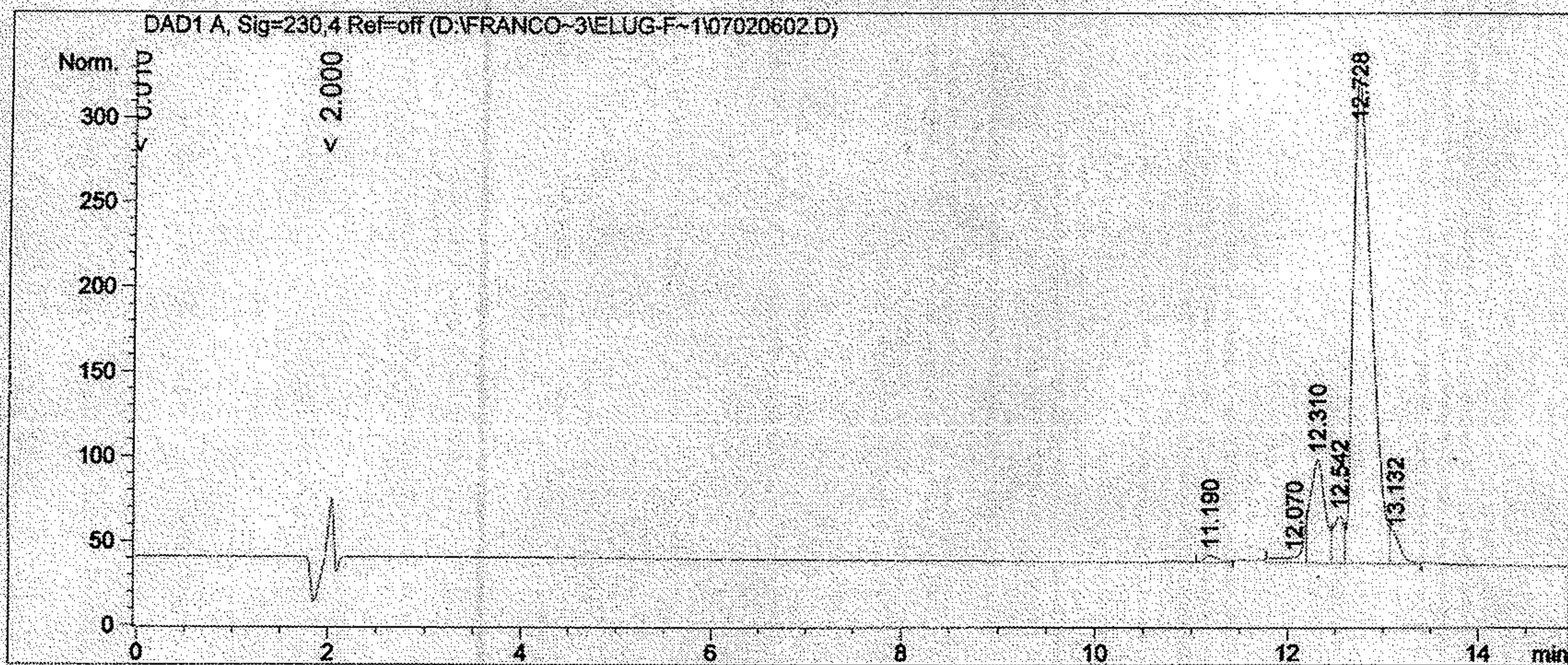


Figure 9

10/11

Data File D:\FRANCO~3\ELUG-F~1\07020602.D
 MN 5C18 300
 FBX15899-187; mCD4-PEO2-Maléimide; Elugramme final
 inj 20 µl ds 25-45

=====
 Injection Date : 2/7/2007 10:46:43 AM
 Sample Name : Location : Vial 1
 Acq. Operator : Françoise Baleux Inj Volume : 20 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MODIF.M
 Last changed : 2/7/2007 10:44:49 AM by Françoise Baleux
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ST4B.M
 Last changed : 6/20/2007 1:53:12 PM by Françoise Baleux
 (Current integration events modified)
 ST 0-20
 =====



Area Percent Report

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	11.190	BB	0.1484	45.15440	4.23630	0.8856
2	12.070	BV	0.4296	128.14589	3.58005	2.5132
3	12.310	VV B	0.1562	647.57355	60.81565	12.7001
4	12.542	VV	0.1090	205.10498	28.15248	4.0225
5	12.728	VV	0.2078	3927.09155	286.62152	77.0176
6	13.132	VB B	0.1192	145.88066	17.87896	2.8610

Totals : 5098.95103 401.28497

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 1 7/30/2007 11:26:09 AM Françoise baleux

Figure 10

11/11

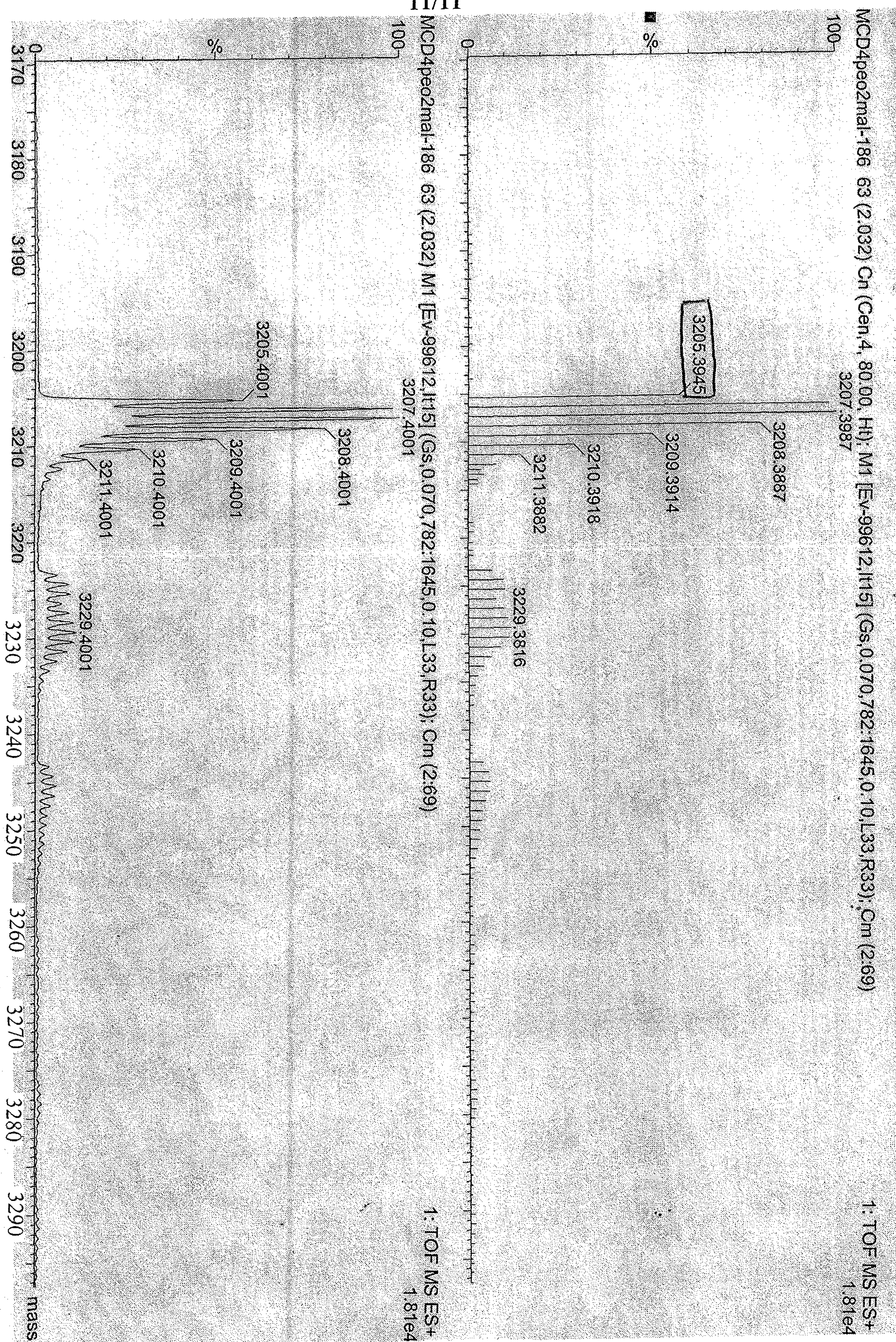


Figure 11