

SYNTHÈSE PEPTIDIQUE

2018

Gilles Subra, PR UM

Muriel Amblard, DR CNRS

Synthèse Peptidique

I - Fondamentaux de la synthèse peptidique

II- Protections

III - Synthèse sur support solide

IV -Activation

V – Synthèse de peptides difficiles

VI- Stratégie de ligation

VII- Analyse et purification de peptides

VIII- Modifications pseudopeptidiques

IX- Exemples

I. Fondamentaux de la synthèse peptidique

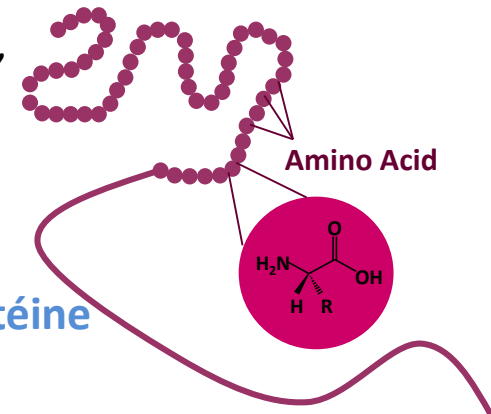
Généralités – Qu'est-ce qu'un peptide

Définition: peptide

Du grec 'pepsis' la digestion

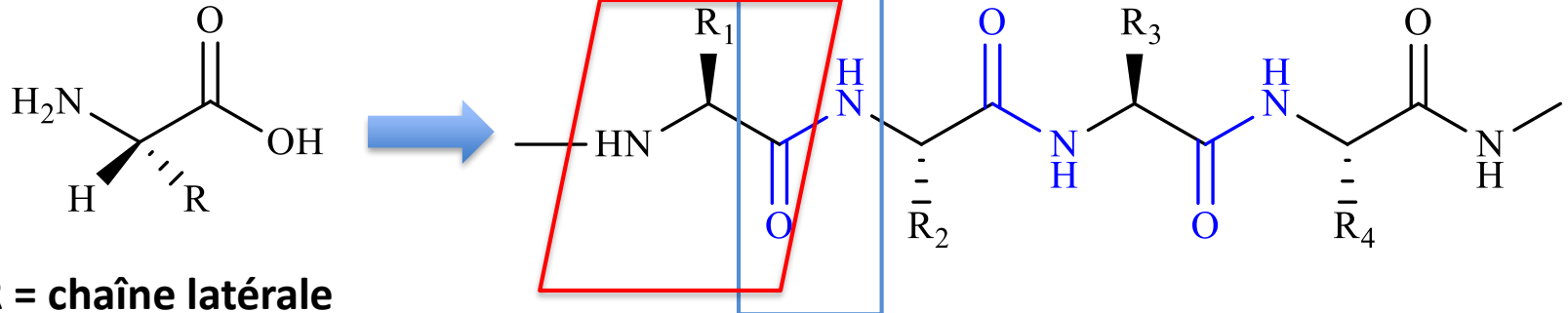
Composé naturel ou synthétique formé par l'union d'acides aminés, unis par les liaisons peptidiques

Peptide = Protéine de < 50 aminoacides



Aminoacide

Peptide/Protéine



R = chaîne latérale

(aliphatique, aromatique, acide, basique, ...)

Résidu

Liaison peptidique

Peptide < 50 aa

Protéine > 50 aa

2 grandes classes de peptides

Peptides ribosomaux

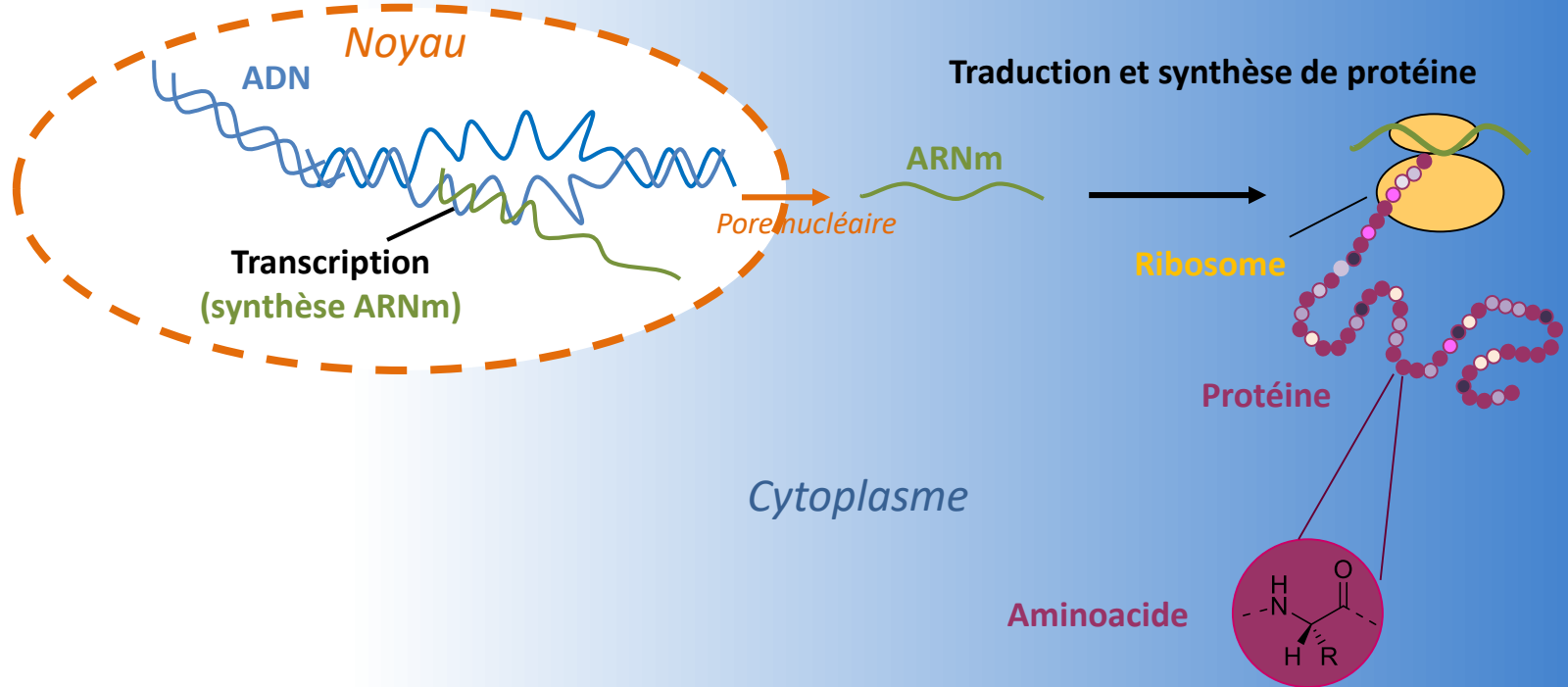
- synthétisés par traduction d'ARNm
- modifiés par des enzymes protéolytiques à partir de propeptides pour obtenir leur forme active.
- sujets à de multiples modifications post-traductionnelles (phosphorylation, hydroxylation, palmitoylation, glycosylation, formation de pont disulfure...)

Peptides non ribosomaux

- ils sont synthétisés par des complexes multienzymatiques spécifiques indépendantes des ARNm: enzymes appelées NRPS (de l'anglais *non-ribosomal peptides synthetase*)
- très souvent produits par des microorganismes (bactéries, champignons). La plupart de ces peptides ont des activités biologiques: antibiotiques, antifongiques, immunosuppresseurs
- grande diversité structurale: linéaires, cycliques, branchés

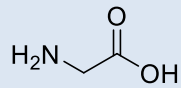
Biosynthèse des peptides ribosomaux

La synthèse ribosomale des protéines se produit sous contrôle génétique, de la partie N-terminale vers la partie C-terminale avec les α -aminoacides protéinogéniques.

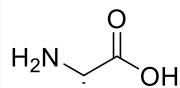


Peptides et protéines jouent un rôle crucial dans presque tous les processus fondamentaux de la cellule vivante. Ils présentent un éventail remarquable de propriétés biologiques.

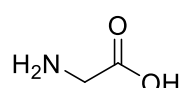
Liste des aminoacides protéinogéniques



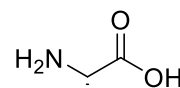
G, Gly



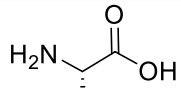
A, Ala



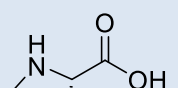
V, Val



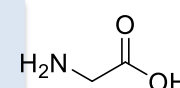
L, Leu



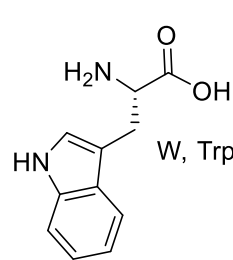
I, Ile



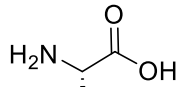
P, Pro



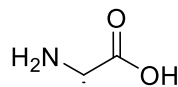
F, Phe



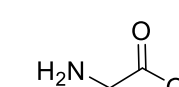
W, Trp



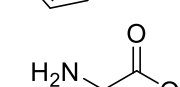
K, Lys



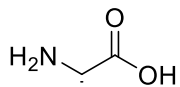
R, Arg



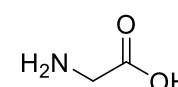
H, His



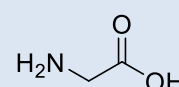
Y, Tyr



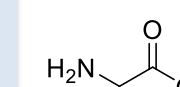
S, Ser



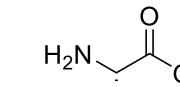
T, Thr



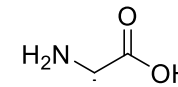
C, Cys



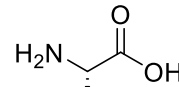
M, Met



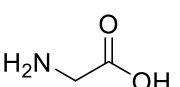
D, Asp



N, Asn



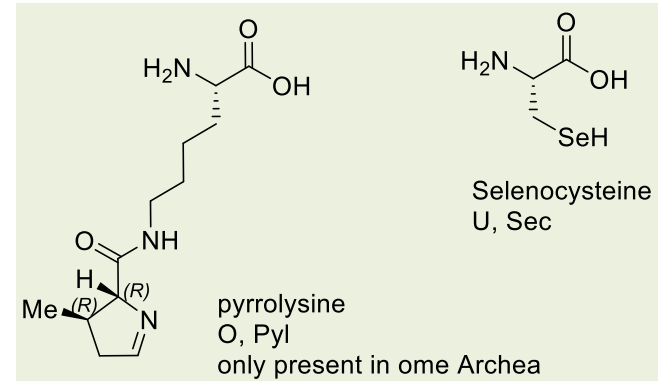
E, Glu



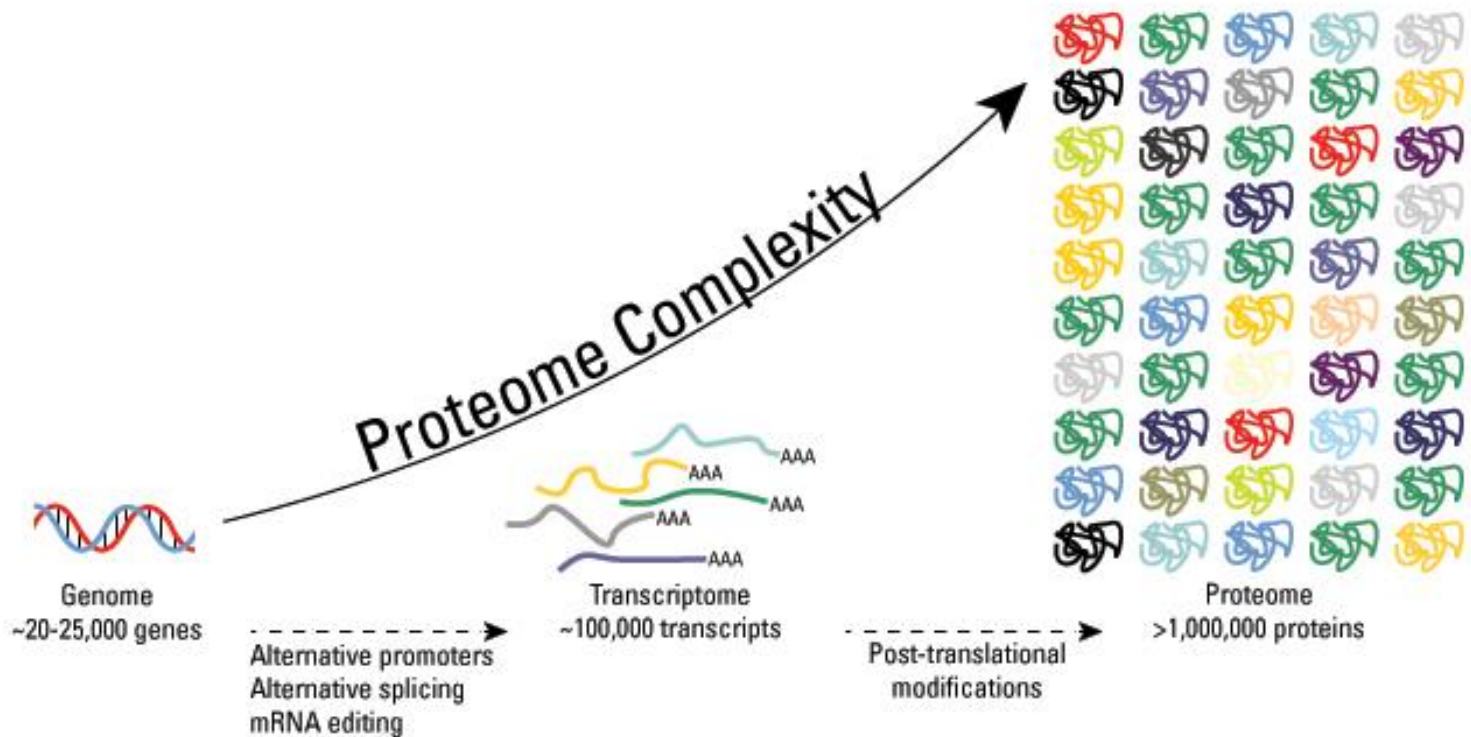
Q, Gln

Protéinogénique : 22 AA

Directement codés et insérés dans la chaîne peptidique (pour Sec codé par un codon stop). Pas de modifications post-traductionnelles.



Modifications post-traductionnelles

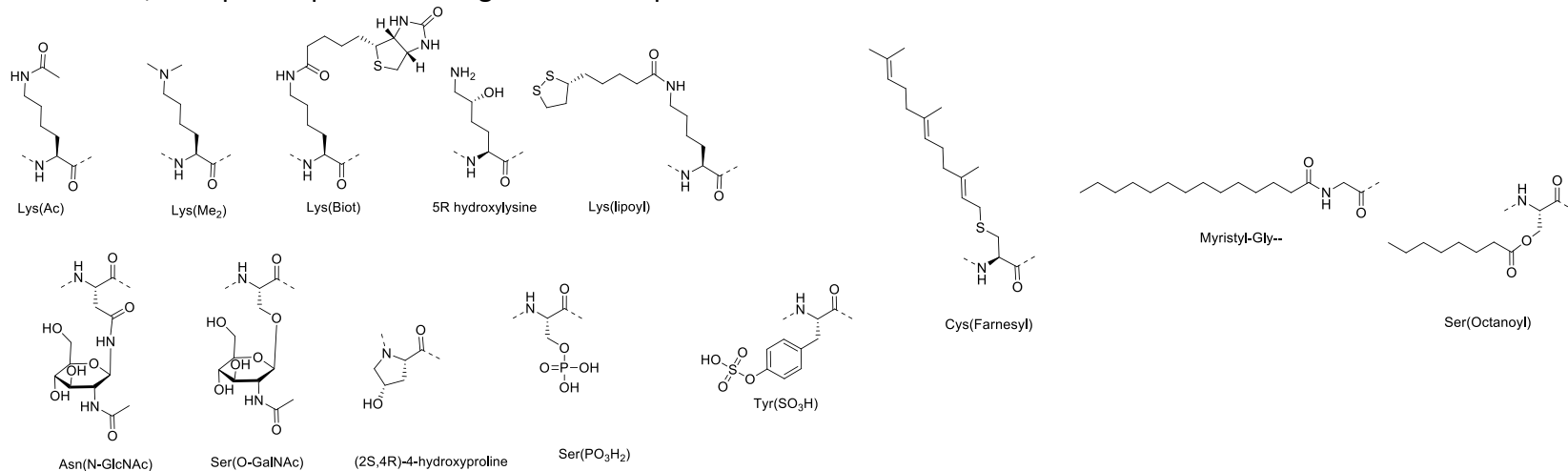


<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-post-translational-modification.html>

Modifications post-traductionnelles

Effectuées dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi

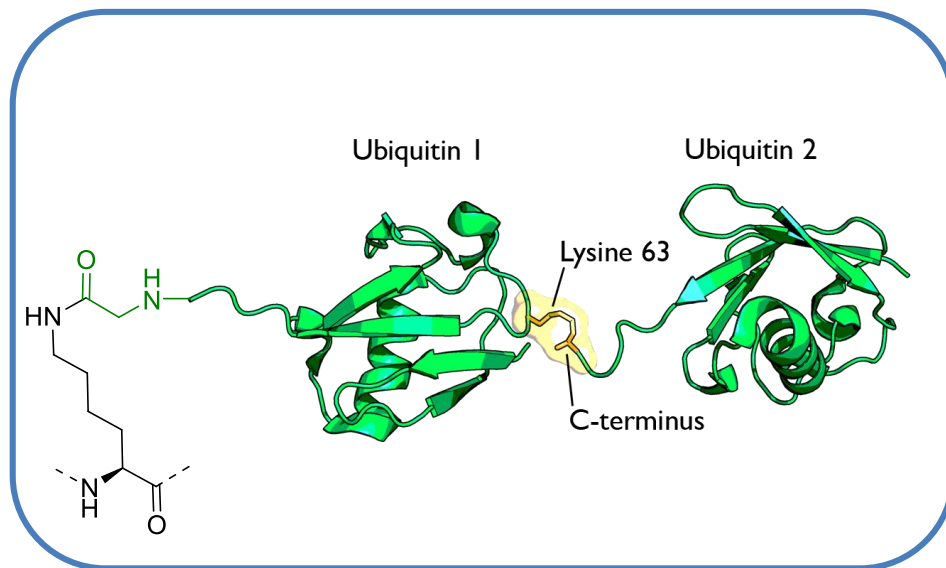
- Formation de ponts S-S
- Acétylation (Lys, favorise la transcription en neutralisant les charges des histones: moins bonne affinité pour l'ADN)
- Méthylation (Arg, Lys, observé chez les histones, modulation de l'expression de gènes)
- N-glycosylation (Asn) N-acétylglucosamine dans le réticulum endoplasmique: futures glycoprotéines membranaires: point d'accroche
- O-glycosylation (Ser, Thr, Tyr) N-acétylgalactosamine : futurs protéoglycans de l'ECM.
- C-glycosylation (Trp)
- N-Myristoylation, palmitoylation, prenylation. Attachement à la partie intracellulaire de la membrane plasmique
- Hydroxylation (Lys, Pro): collagène
- Lipoylation (Lys) cofacteur red-ox
- Sulfatation (Tyr), phosphorylation (Ser, Thr, Tyr) (augmentent les liaisons H et modulent les interactions Prot/prot)
- C-ter amidation, Citrullination de l'arginine (inflammation ou myéline), Deamidation de Asn ou Gln en Glu, isoasp ou aspartimide: dégradation des protéines



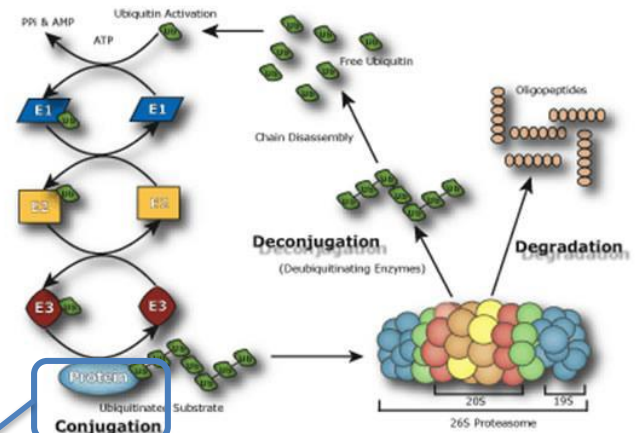
Modifications post-traductionnelles

Ajout de protéines sur les chaînes latérales de Lysine: SUMO, Nedd, Ub

- Sumoylation (Lys) : régule le trafic intracellulaire (noyau->cytosol) , module les interactions avec les autres protéines et l'ADN, régulation transcription
- Neddylaton (Lys): module les interactions avec les autres protéines. Régulation du cycle cellulaire : impliqué dans Alzheimer (mort neurones), et cancer (prolifération)
- Ubiquitylation (Lys) : mécanisme de dégradation par le protéasome. Une protéine doit être ubiquitylée 4 fois au moins pour être reconnue et dégradée

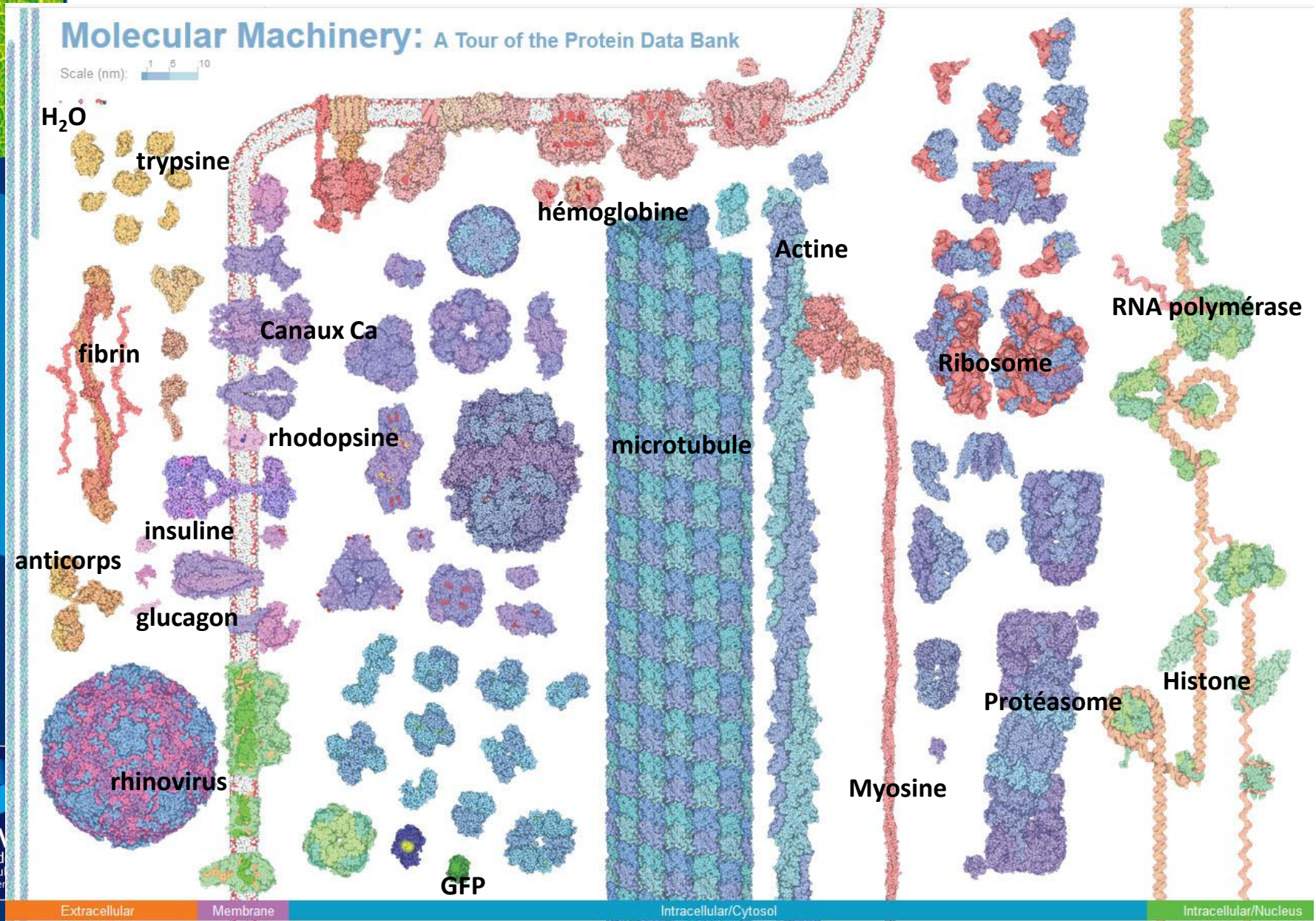


Ubiquitin Cycle and Protein Degradation



Protéines et peptides

<http://mm.rcsb.org/>



Les peptides : acteurs majeurs du vivant

Peptides et protéines jouent un rôle crucial dans presque tous les processus fondamentaux de la cellule vivante

- **Structure** : kératine, actine, collagène (muscles, tendons, os, ongles, cheveux...)
- **Transport** : hémoglobine, cytochromes, sérum albumine
- **Régulation** : hormones et leurs récepteurs

Insuline

Bradykinine : douleur, allergie, hypotension

Angiotensine II : hypertension

- **Catalyse** : enzymes

Enzyme de conversion de l'angiotensine ACE : Angio I → Angio II (forme active)

Transcriptase inverse du VIH : RNA viral → ADN

- **Immunologique** : anticorps

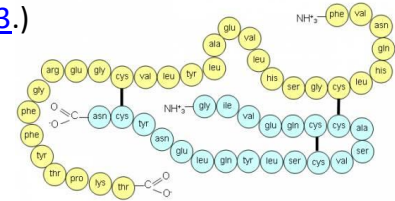
Venins, toxines, antimicrobiens

Les peptides : acteurs majeurs du vivant

Premier peptide bioactif découvert: **Insuline** (Macleod & Banting, 1923)

Synthétisé en 1964 (Katsoyannis PG, Fukuda K, Tometsko A, Suzuki K, Tilak M (1964). "Insulin Peptides.

X. The Synthesis of the B-Chain of Insulin and Its Combination with Natural or Synthetic A-Chain to Generate Insulin Activity". Journal of the American Chemical Society. **86** (5): 930–932. [doi:10.1021/ja01059a043](https://doi.org/10.1021/ja01059a043).)



Aujourd’hui, plus de **7000 peptides bioactifs naturels** ont été identifiés avec des rôles cruciaux dans les mécanismes physiologiques en tant que :

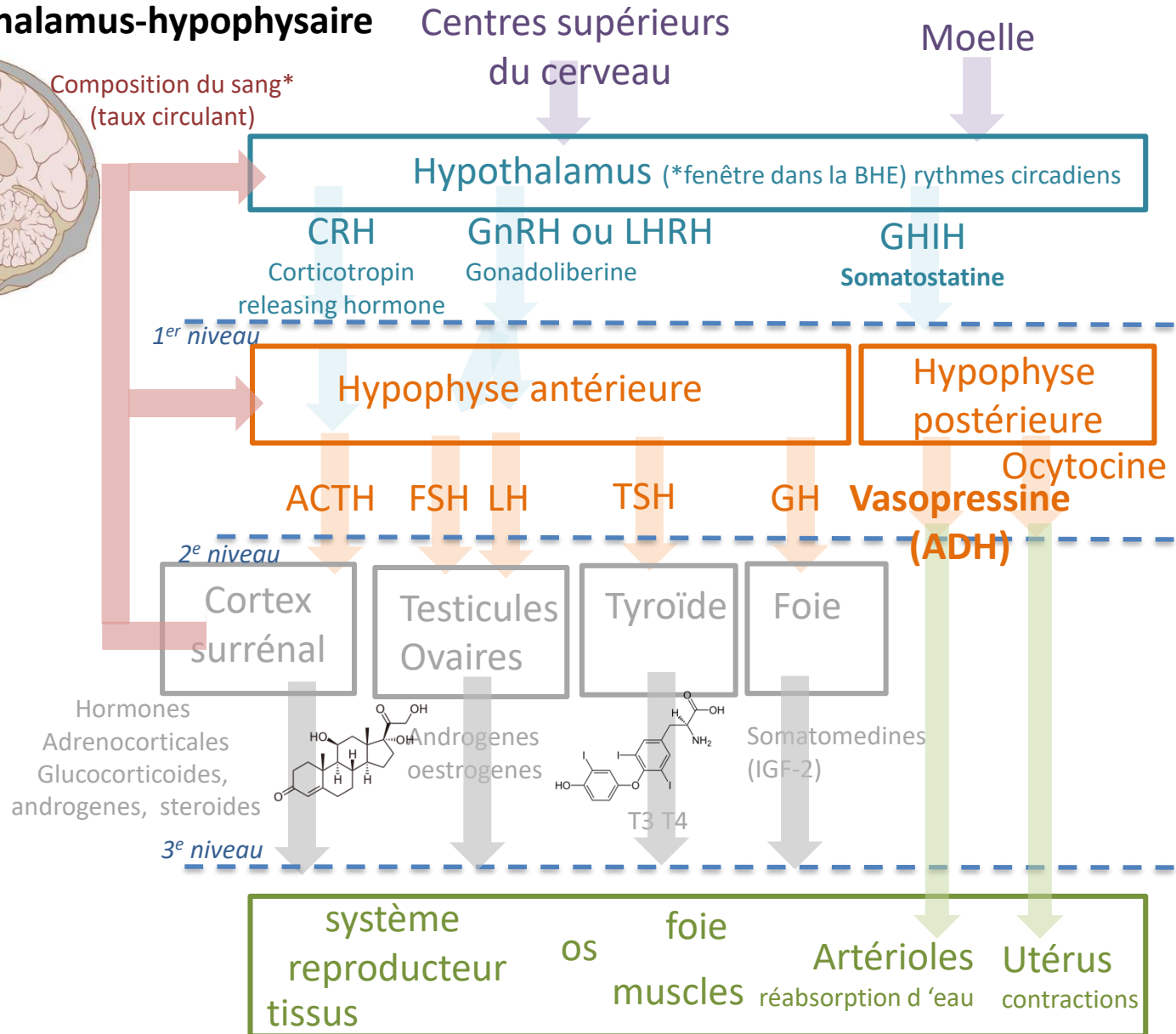
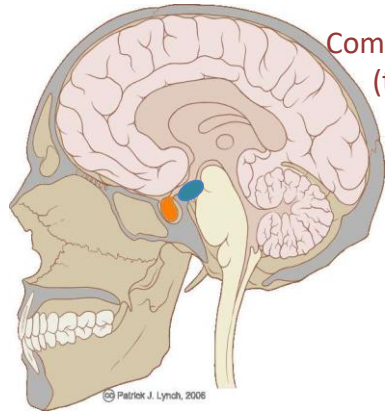
- Hormones communication chimique et coordination: sécrétés par les cellules neuroendocrines (libération dans la sang) -> circulation pour stimuler une réponse sur un autre organe.
- Neuropeptides**: hormones mais qui sont sécrétés et utilisés dans le SNC. Contrairement aux neurotransmetteurs, ne sont pas recyclés.
- Facteurs de croissance et de différenciation,
- Ligands de canaux ioniques
- anti infectieux
- Transporteurs de substances au travers des membranes

Review [Keld Fosgerau](#), [Torsten Hoffmann](#)

Peptide therapeutics: current status and future directions.

Les hormones peptidiques

1. Axe hypothalamus-hypophysaire



Somatostatine

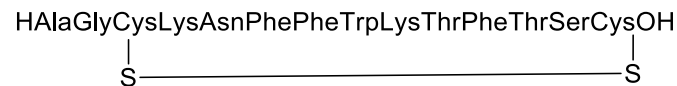
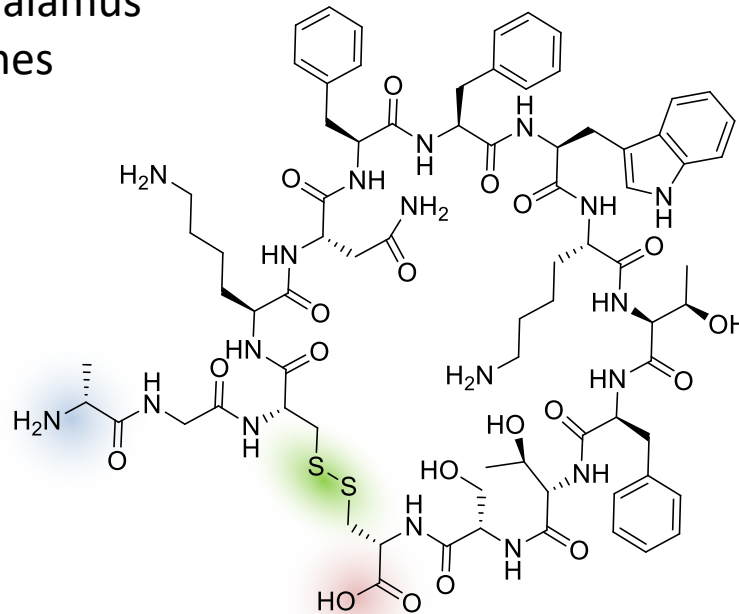
Somatostatine ou Growth hormone inhibitory hormone (GHIH)

Produit par l'hypothalamus

14 AA (28AA) 2 formes

Pont Disulfure

14 AA de plus sur la
somatostatine 28



Principales activités : Inhibition sécrétion d'insuline de l'hormone de croissance, des hormones gastriques, inhibition sécrétion acide estomac, contraction vésicule biliaire...

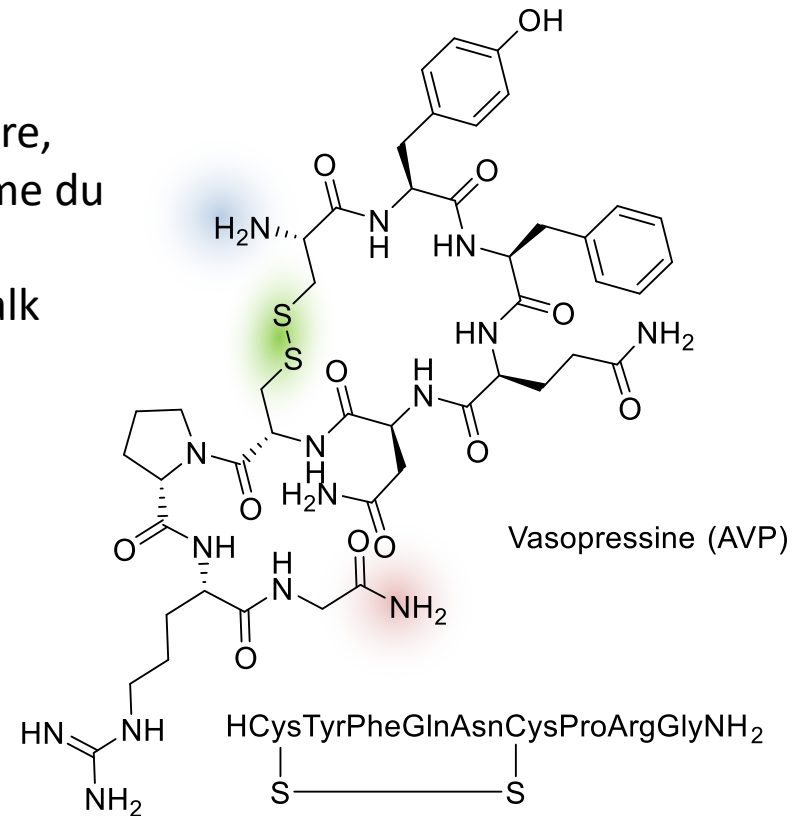
Vasopressine

Arginine vasopressine (AVP) chez l'homme
ou ADH (*Antidiuretic hormone*)

9AA, Cter amide, un pont SS

Sécrété par l'hypophyse postérieure,
stimulée par la réduction de volume du
plasma sanguin.

Très proche de l'ocytocine (crosstalk
possible)



Principales activités : antidiurétique , induit la re-adsorption d'eau.
Vasoconstricteur.

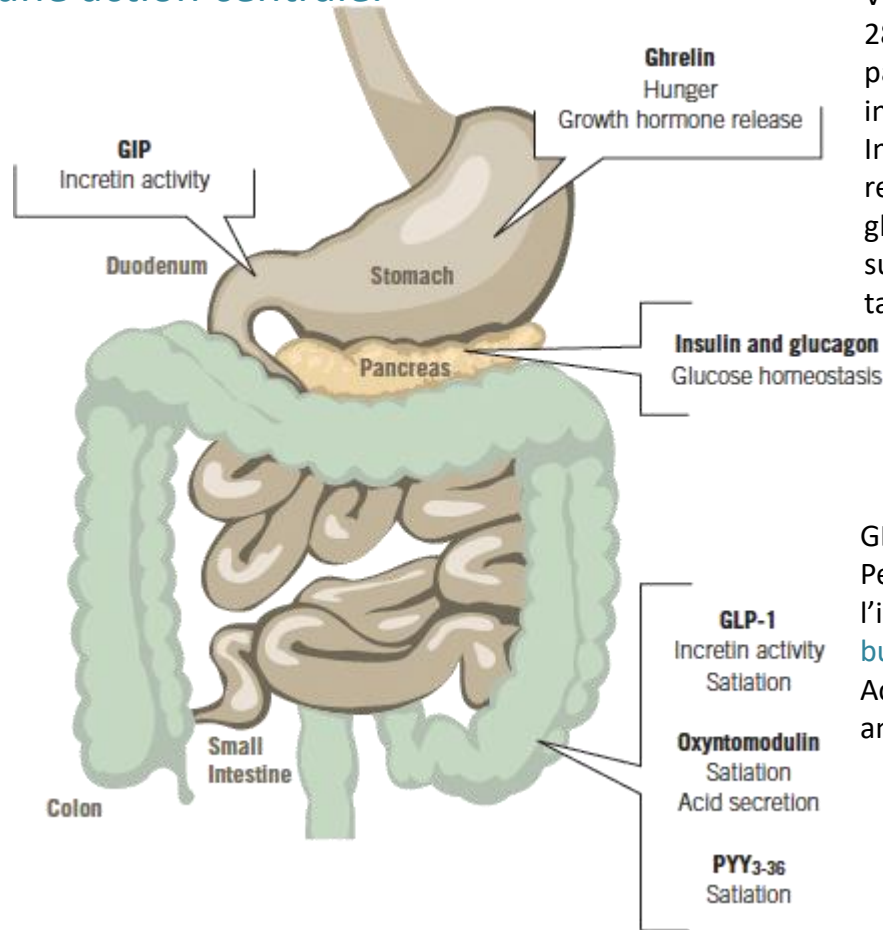
Les hormones peptidiques

2. Axe gastroentéro-pancréatique : plus de 100 peptides bioactifs identifiés régulant la digestion

Beaucoup fonctionnent comme **neuropeptides**, sont aussi produits dans le **SNC**, ont des récepteurs et une action centrale.

GIP (**G**astric inhibitory peptide, 42AA) produit dans le duodénum.

Incrétine: induit la production d'insuline par le pancréas et contribue à descendre le taux de sucre dans le sang (insulinotrope)



VIP (Vasointestinal peptide 28AA) produit dans le pancréas, l'estomac et les intestins et l'**hypothalamus**. Induit la motilité intestinale, relaxation des muscles lisses, la glycogénolyse (libération de sucres) et augmentation du taux dans le sang

GLP-1 (Glucagon-like Peptide1, 30AA) sécrété dans l'iléon (small intestin) et le **bulbe rachidien**. **Incrétine**. Action dans le CNS: effet anorexigène

Les hormones peptidiques

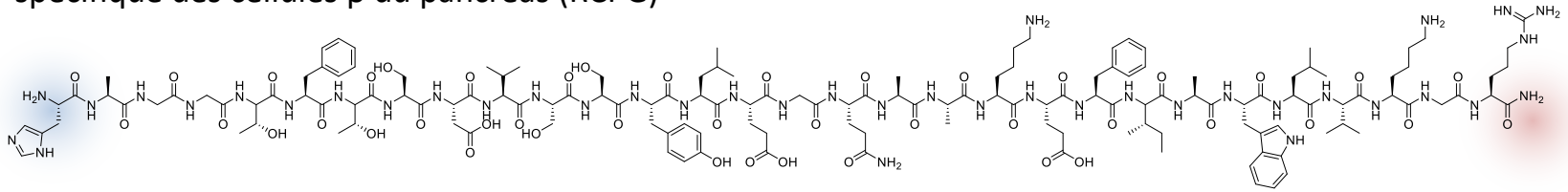
2. Axe gastroentéro-pancréatique

HORMONE	SOURCE	ACTIONS	Forme active	T ½ vie
GLP-1	Ileum L cells	Incrétine, diminue la sécrétion du glucagon, régule la motilité gastro-intestinal, effet anorexigène	7-36 amide, 7-37	90 s à 2 min
GIP	Duodénum Cellules K	Incrétine, augmente la sécrétion de glucagon, stimule la croissance des cellules beta.	1-42	7 min
PYY	Colon Cellules L	Réduit la prise de nourriture, inhibe la sécrétion acide et la vidange gastrique	3-36	
Glucagon	Pancreas α -cells îlots de Langerhans	Augmente le taux de glucose dans le sang, stimule la libération d'insuline	1-29	6 à 7 min
Oxyntomoduline	Colon L cells	Réduit la prise de nourriture, inhibe la sécrétion acide. Pas d'effet sur la vidange gastrique	1-37	6 à 7 min
Ghréline	Estomac Cellules pariétales des glandes gastriques	Augmente l'appétit, la prise de nourriture la prise de poids et l'adipogenèse	N-octanoylé (Ser3)	9 à 13 min
VIP Vasointestinal Peptide	Pancréas, Estomac et les intestins	Induit la motilité intestinale, relaxation des muscles lisses, la glycolyse (libération de sucres) et augmentation du taux dans le sang	1-28	
Gastrine	Estomac Cellules G de la muqueuse antrale, Pancréas + duodénum	Stimule la sécrétion acide des cellules pariétales en se liant au CCKB-R	Plusieurs (1-17)	3 minutes
CCK	Duodénum	Stimule la production de peptidases du pancréas et de bile de la vésicule biliaire. Favorise la digestion des protéines et des graisses. CNS: satiété	Plusieurs (1-8)	

Quelques exemples

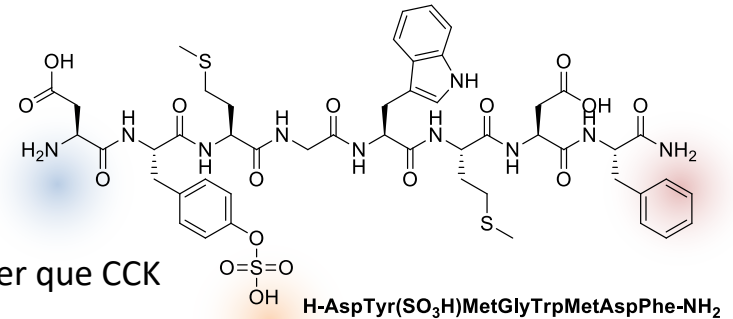
Glucagon-like peptide 1 GLP1

Principales formes actives 30 et 31 AA: GLP-1 (7-37) et GLP-1 (7-36) qui se lient au récepteur spécifique des cellules β du pancréas (RCPG)



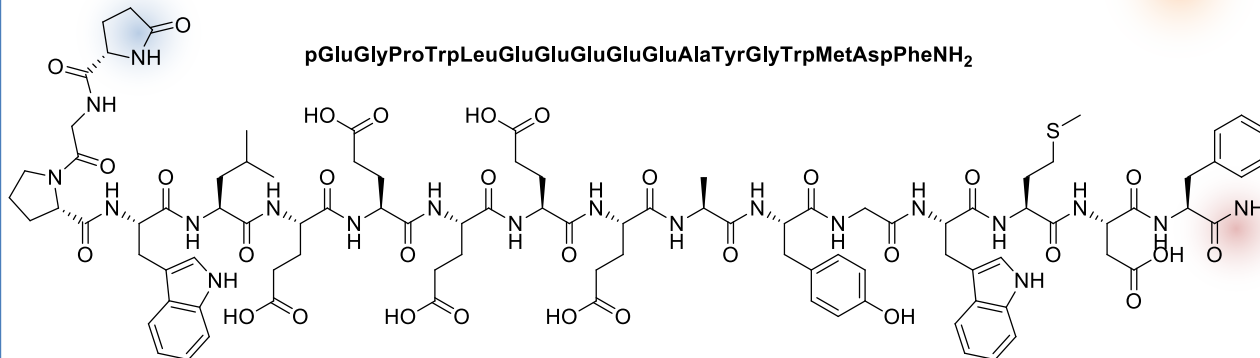
Cholécystokinine, CCK

Principale forme active: CCK8 Tyr²(SO₃H) C-ter amide, sulfatation essentielle pour l'affinité au récepteur CCK-A



Gastrine

Principales formes actives 34, 17 et 14 AA, mêmes 5AA C-ter que CCK



Les hormones peptidiques

3. Système Cardiovasculaire

Angiotensine I

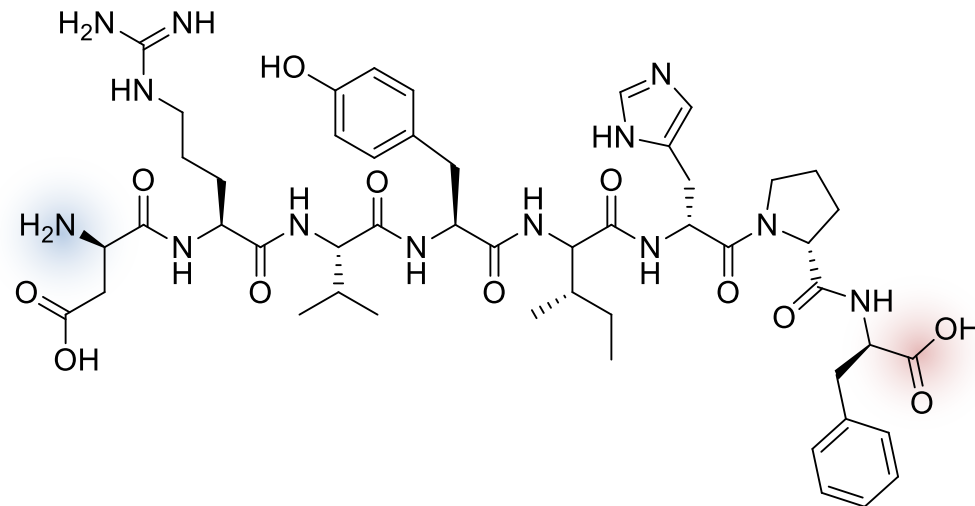
H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-OH



ACE (angiotensine converting enzyme)

Angiotensine II 8 AA

H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH



Les neuropeptides

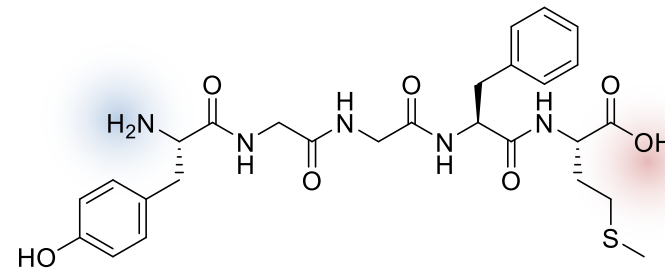
4. Système Nerveux Central

Neuropeptides: contrairement aux hormones, ils sont exprimés et libérés par les neurones (et pas relargués dans la circulation), modulent la communication neuronale via des récepteurs membranaires.

Peptides opioïdes

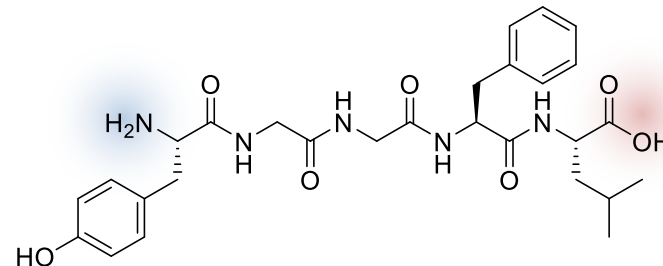
Met-Enkephalin
récepteurs δ -opioïde
analgésie

HTyrGlyGlyPheMetOH



Leu enképhaline

HTyrGlyGlyPheLeuOH



Peptides Actifs

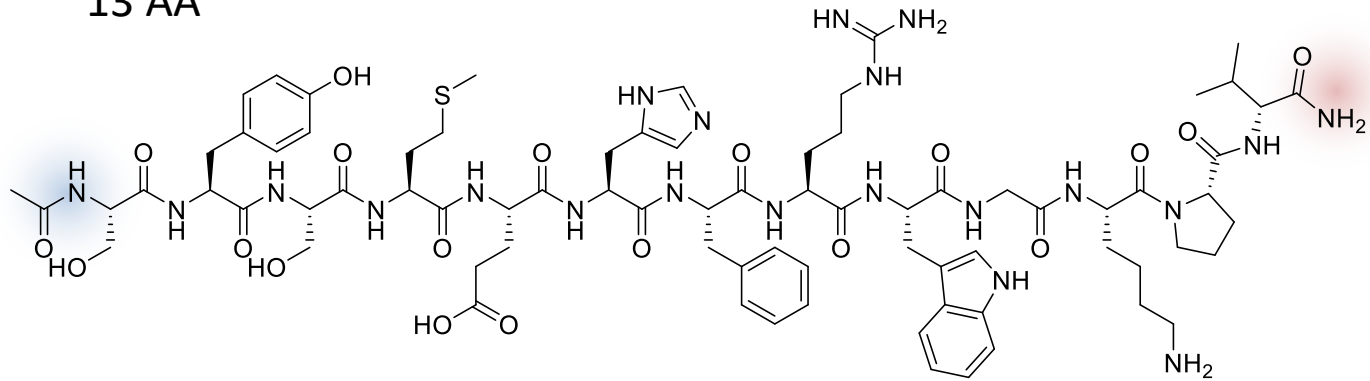
Autres Exemples Peptides actifs et médicaments

α -MSH

alpha-melanocyte stimulating hormone

Ac-SerTyrSerMetGluHisPheArgTrpGlyLysProVal-NH₂

13 AA



Sur la peau produit la synthèse de la mélanine par stimulation UV
Dans le cerveau: appétit, comportement sexuel



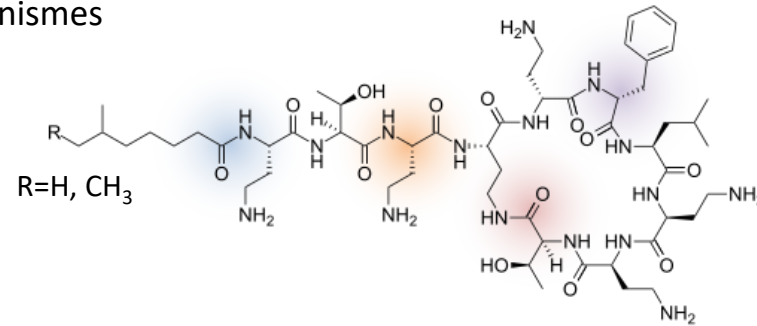
Largement conservée dans le règne animal (ex: xénope)

Peptides antibiotiques

Essentiellement produits par les bactéries, champignons
Tuent ou inhibent la croissance des microorganismes

Polymyxin B

(*Bacillus polymyxa*)



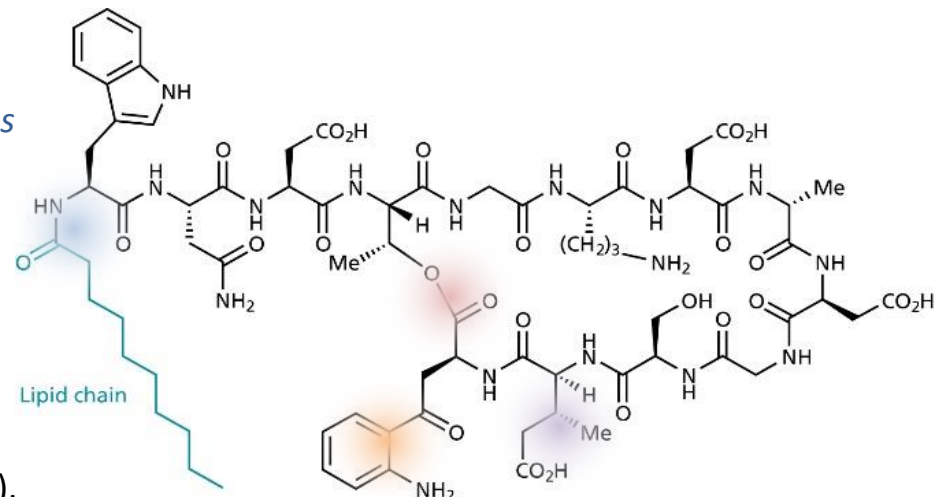
N terminal acylé par chaîne grasse, cyclisation C ter Lys, présence de **Dab**, et de **DPhe**
Perturbe l'intégrité de la membrane bactérienne (gram négatif)

Daptomycin (1980 Eli Lilly)

13 AA

Issu du champignon *Streptomyces Roseosporus*

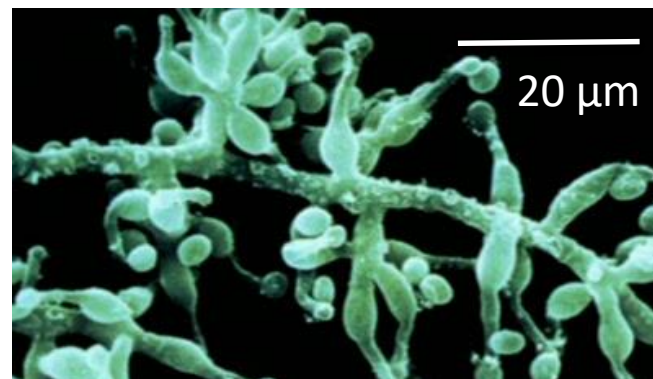
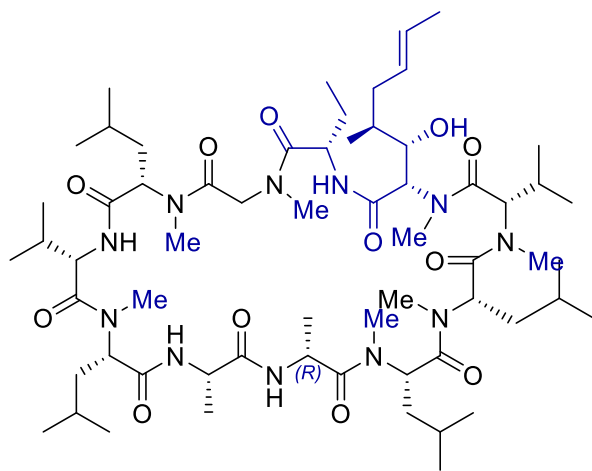
Actif contre Gram positif



Nter acylé par une chaîne grasse (lipopeptide),
Cyclisation C-ter chaîne latérale Thr via une liaison ester: depsipeptide
2 AA non naturels **L-kynurenine** (Kyn), **L-3-methylglutamic acid** (mGlu).

Cyclosporine: immunosuppresseur

11 AA, peptide utilisé pour traiter les maladies auto-immunes et les rejets de greffe
isolé d'un champignon microscopique (1976), synthétise non ribosomale



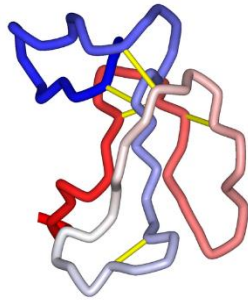
c[MeLeu-MeVal-MeBmt-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-DAla-MeLeu]

Abu= aminobutyric acid
MeBmt = Butenyl-methyl-L-threonine
Sar= sarcosine (i.e. N-Methyl Glycine)

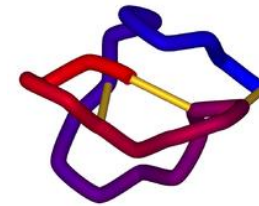
cyc[MeLeu-MeVal-MeBmt-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-Dala-MeLeu]

Peptides venins et toxines

Défense contre les prédateurs ou prédation: souvent de multiples ponts SS
 Isolés de serpents, grenouilles, araignées, abeille, anémones, bactéries, champignons



α -bungarotoxin (74-mer isolated from venom snake *Bungarus*)

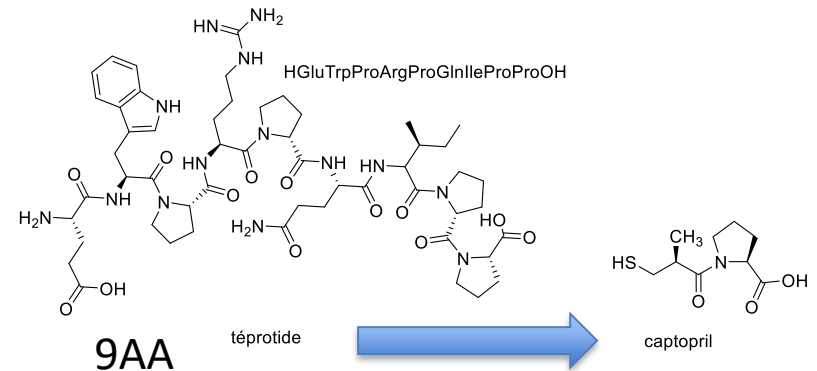


ω -conotoxin (l'escargot *Conus magus*)
 > Ziconotide (Prialt®)



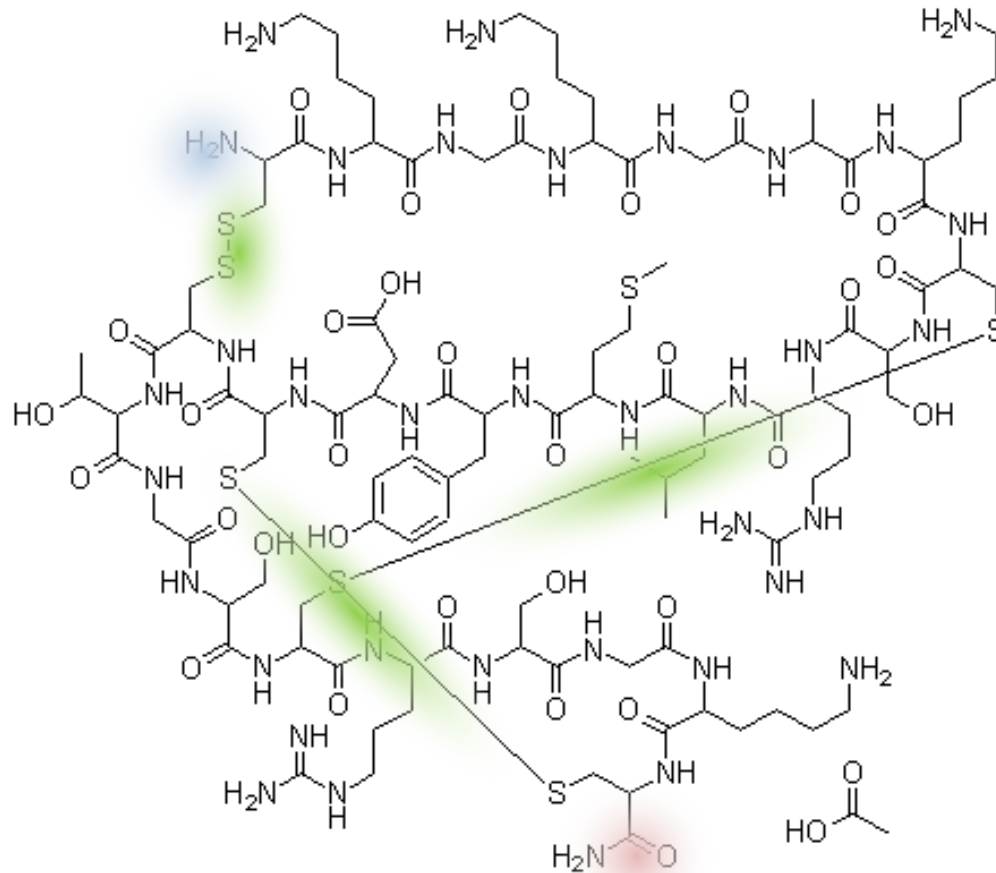
Bothrops jararaca

Inhibition de l'ACE:
 hypotenseur, potentialise les effets de la bradykinine



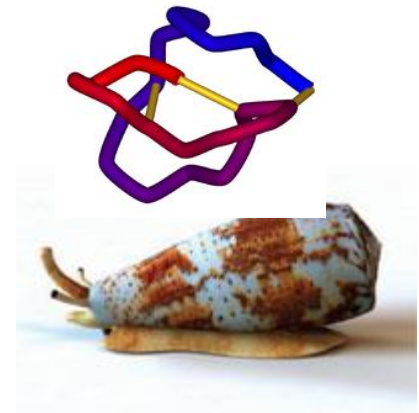
Ziconotide

ω -Conotoxine MVII A



H-Cys-Lys-Gly-Lys-Gly-Ala-Lys-Cys-Ser-Arg-Leu-Met-Tyr-Asp-Cys-Cys-
Thr-Gly-Ser-Cys-Arg-Ser-Gly-Lys-Cys-NH₂

Ziconotide
Prialt 2004



Bloque les canaux ioniques
voltage-dépendants de type N
Anesthésique
Traitement Douleur Chronique

Pourquoi synthétiser des peptides ?

Étudier des processus biochimiques ou biologiques (récepteurs, enzymes...)

Concevoir et préparer des composés biologiquement actifs à partir de peptides naturels: **médicaments, vaccins synthétiques, produits cosmétiques**

Concevoir des systèmes de ciblage ou de livraison de composés actifs
Cell interacting peptides, Cell penetrating peptides

Diagnostiquer des maladies

peptides antigènes pouvant lier des anticorps circulants du sang infecté

Comment synthétiser des peptides et protéines

Par purification

à partir d'extraits naturels (1mg pour 10000 sujets) (collagène bovin, hormone de croissance dans les années 80, hypophyse humaine)

Par biologie moléculaire

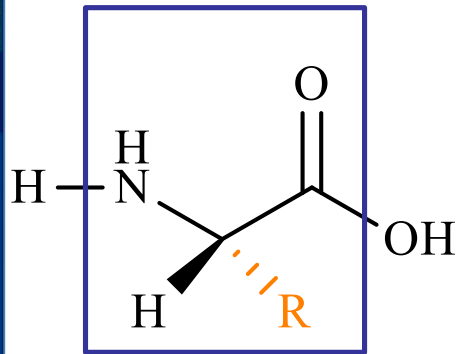
(protéines recombinantes: e.g. insuline, e.g. hormone de croissance recombinante, somatotropine 191 acides aminés)

Par synthèse chimique

en solution

sur support solide

Nomenclature

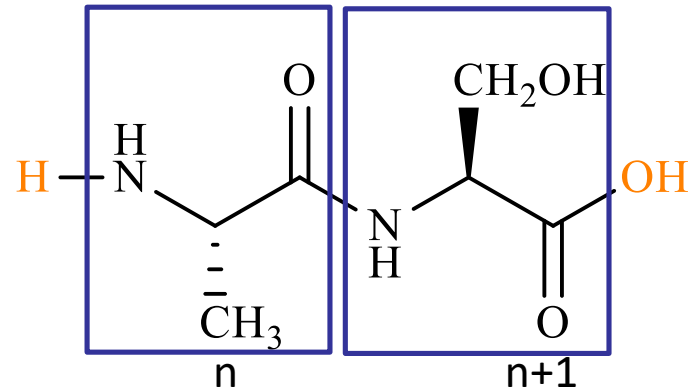


R = chaîne latérale

Résidu d'acide aminé :
code 1 lettre ou 3 lettres
Acide aminé :

Ex si R=CH₃ (Alanine), A ou Ala

H-Ala-Ser-OH ou H-AS-OH



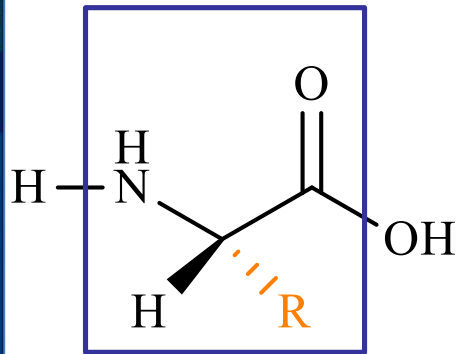
N-terminal  C-terminal

Sens de biosynthèse et sens d'écriture de la
liaison peptidique CONH et numérotation



Sens de la synthèse chimique C-ter vers N-ter

Nomenclature



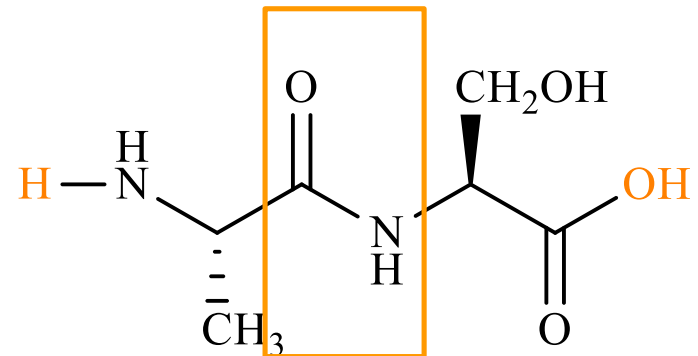
R = chaîne latérale

Résidu d'acide aminé:
code 1 lettre ou 3 lettres

Acide aminé :

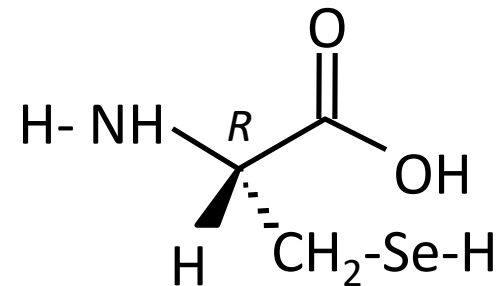
Ex si R=CH₃ (Alanine), A ou Ala

H-Ala-Ser-OH ou H-AS-OH

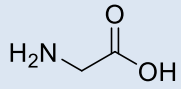


Liaison Amide
liaison peptidique

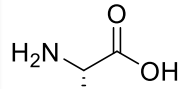
A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
et ...U: sélénocystéine



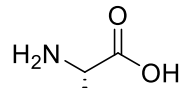
Liste des aminoacides protéinogéniques



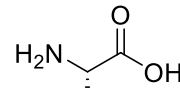
G, Gly



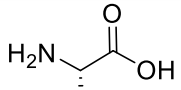
A, Ala



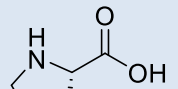
V, Val



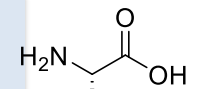
L, Leu



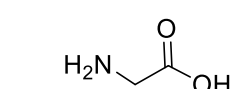
I, Ile



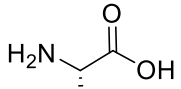
P, Pro



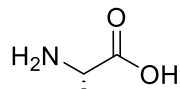
F, Phe



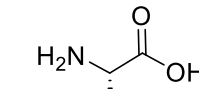
W, Trp



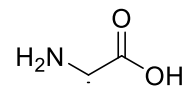
K, Lys



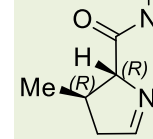
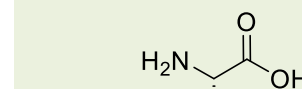
R, Arg



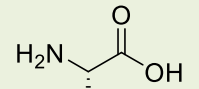
H, His



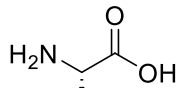
Y, Tyr



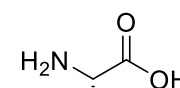
pyrrolysine
O, Pyl
only present in some Archea



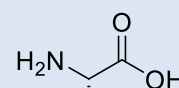
Selenocysteine
U, Sec



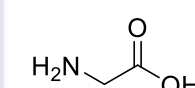
S, Ser



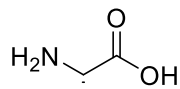
T, Thr



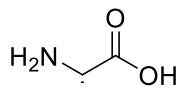
C, Cys



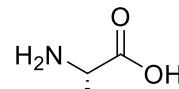
M, Met



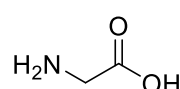
D, Asp



N, Asn

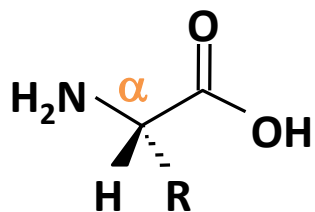


E, Glu

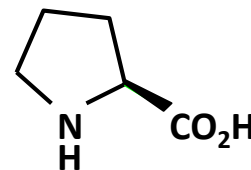


Q, Gln

Stéréochimie



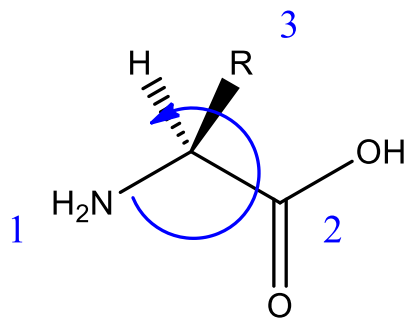
Sauf Proline



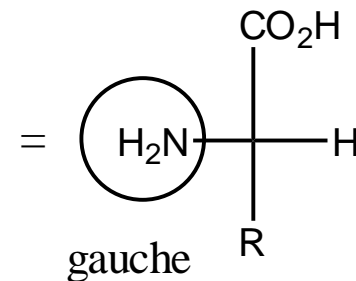
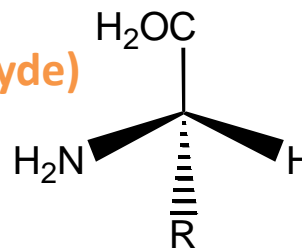
a-aminoacides (fonction amine et acide portées par le même carbone (**a**))

Optiquement actifs

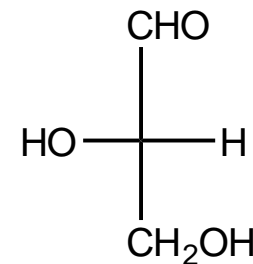
Configuration **L*** (par analogie **L** glycéraldéhyde)



Stéréochimie : **S** (sauf Cys, R)



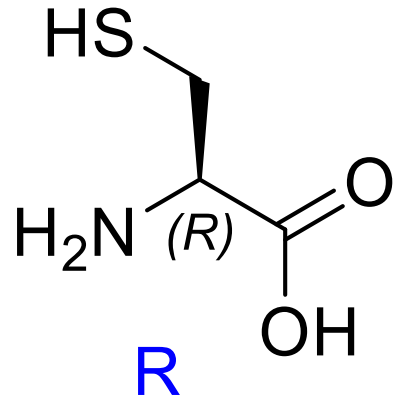
glyceraldéhyde



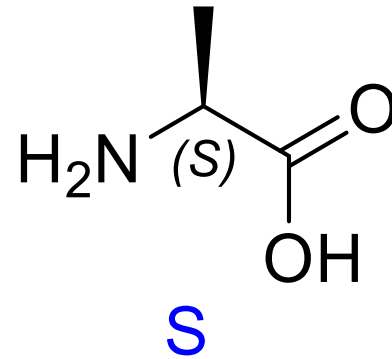
*Représentation de Fisher:

Chaîne carbonée principale verticale avec atome plus oxydé en haut

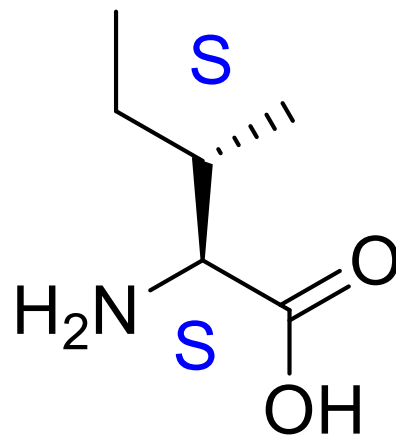
Stéréochimie : cas particuliers



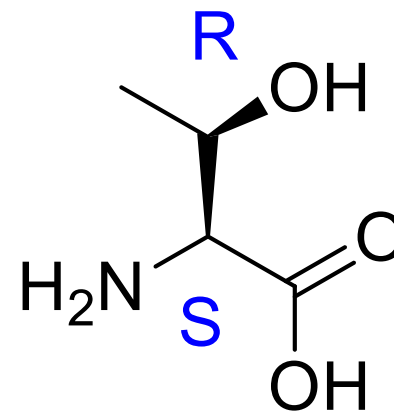
Cys



Ala



Ile

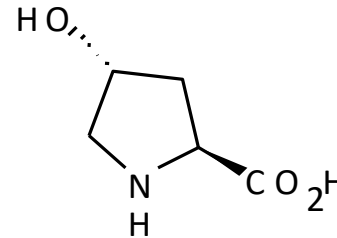


Thr

Aminoacides non-protéinogéniques

Modifiés **après** l'incorporation dans la chaîne peptidique

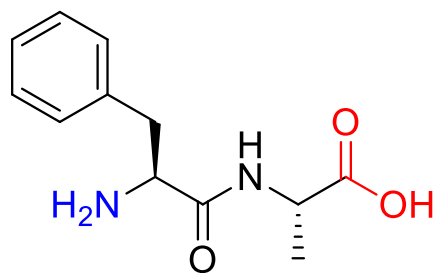
hydroxyproline constituant du collagène, formée par oxydation de la proline



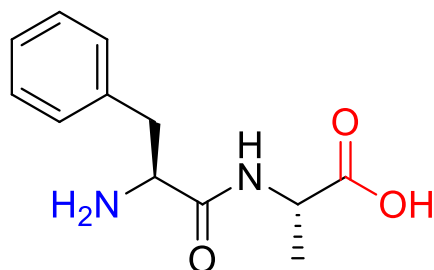
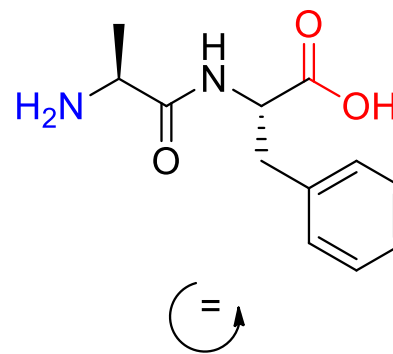
- **β -aminoacides** : β -alanine ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$), précurseur de vitamine
- **γ -aminoacides** : GABA ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$), neurotransmetteur
- **D-amino acides** : constituants de certains antibiotiques
- **Sarcosine** : constituant de peptides microbiens $\text{CH}_3\text{-NH-CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$
- **Acide α -amino butyrique (Aib)** : α, α' disubstitué $\text{H}_2\text{N-C}(\text{CH}_3)_2\text{-CO}_2\text{H}$
- Ornithine, Norvaline, Norleucine, dehydroalanine..

Le sens d'écriture est important

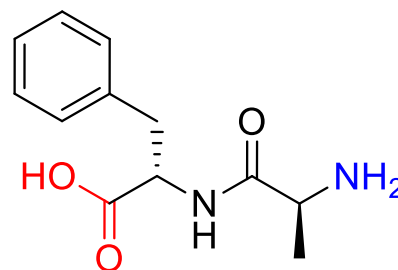
H-Phe-Ala-OH



H-Ala-Phe-OH (retro peptide de H-Phe-Ala-OH)

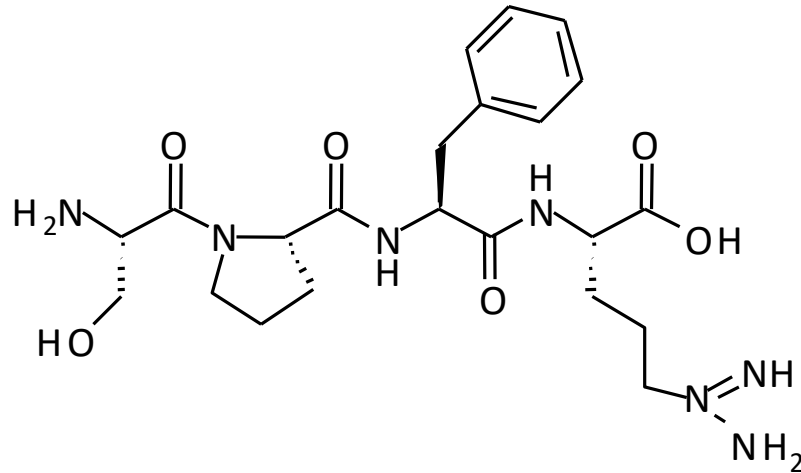


≠



Nomenclature : Systèmes de protection

H-Ser-Pro-Phe-Arg-OH



- protection C-terminale

H-Ser-Pro-Phe-Arg-OBzl

(O-CH₂-C₆H₅)

- protection N-terminale

Boc-Ser-Pro-Phe-Arg-OH

(tBu-O-CO-)

Nomenclature : Systèmes de protection, cycles

- protections N- et C-terminales

Boc-Ser-Pro-Phe-Arg-OBzl

- protection des chaînes latérales

H-Ser(Bzl)-Pro-Phe-Arg(Pbf)-OH

- protection totale

Boc-Ser(Bzl)-Pro-Phe-Arg(Pbf)-OBzl

- peptide cyclique

Ser-Pro-Phe-Arg

Plusieurs types de cyclisation

Cyclisation:

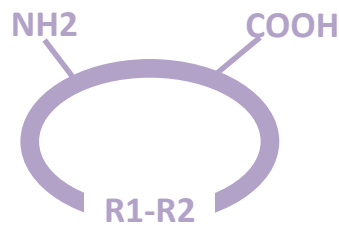
- ✓ introduit des contraintes conformationnelles
- ✓ réduit la flexibilité des peptides,
- ✓ augmente la résistance aux dégradations enzymatiques
- ✓ Augmente la perméabilité et augmente la chance d'obtenir un composé biodisponible par voie orale
- ✓ Augmente la sélectivité pour la cible

Plusieurs types de cyclisation:

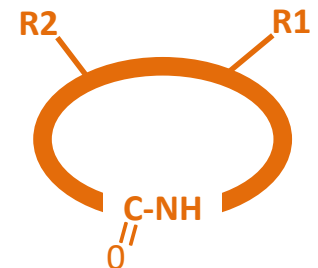
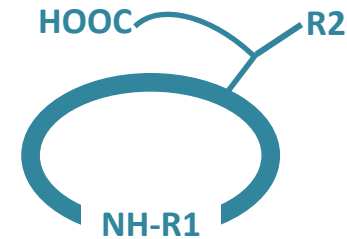
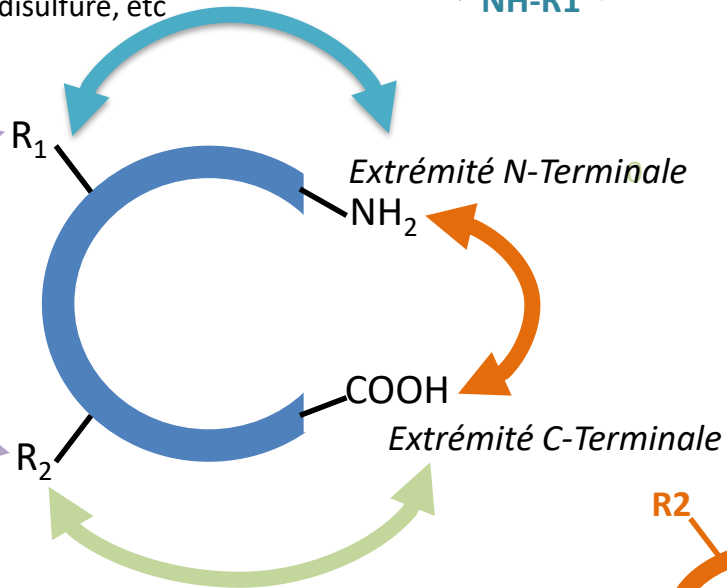
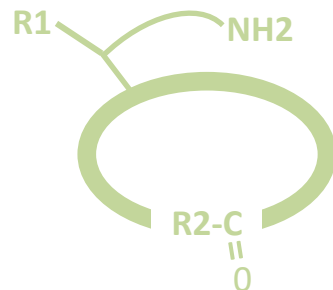
- ✓ tête-à-queue
- ✓ tête à chaîne latérale
- ✓ Chaîne latérale à chaîne latérale

Cyclisation effectuée en solution ou SPPS:

lactamisation, lactonisation, formation de pont disulfure, etc

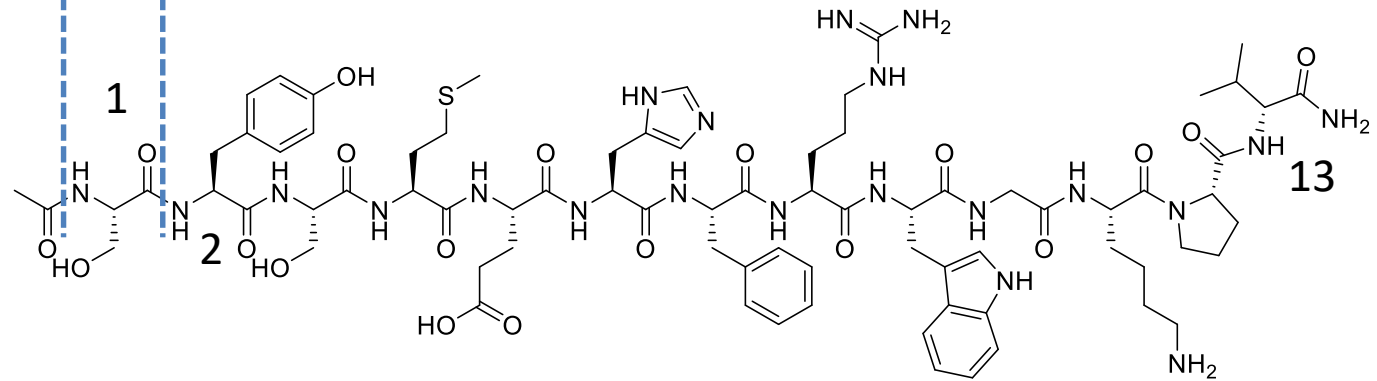


CONH, S-S, C=C,....

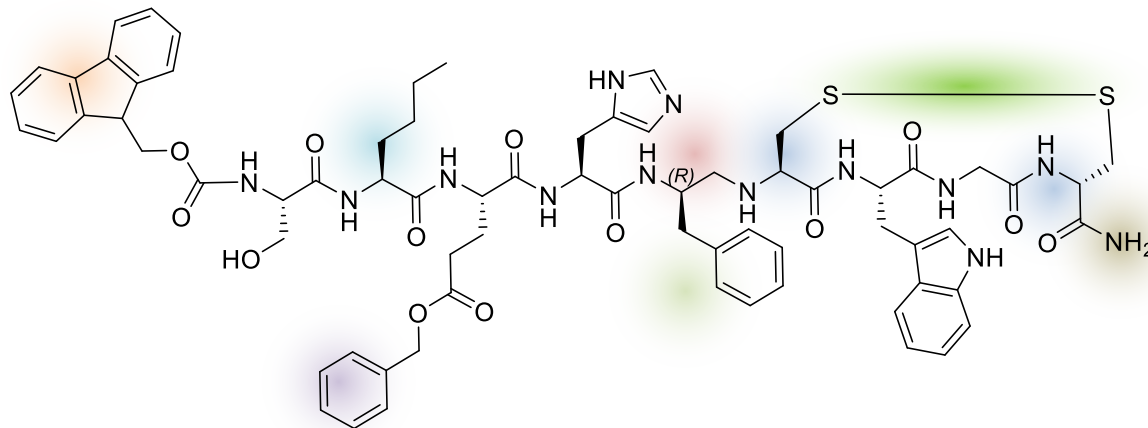


Numérotation, écriture, codage

α -MSH: Ac-Ser¹Tyr²Ser³Met⁴Glu⁵His⁶Phe⁷Arg⁸Trp⁹Gly¹⁰Lys¹¹Pro¹²Val¹³-NH₂



Cyclo8/11 Fmoc[Nle⁴,Glu(OBzl)⁵,(D)Phe⁷- ψ (CH₂NH) Cys⁸,Cys¹¹-NH₂] α -MSH(3-11)



I. Fondamentaux de la synthèse peptidique

Stratégie de synthèse Contrôle de l'épimérisation

Exigences de la synthèse peptidique

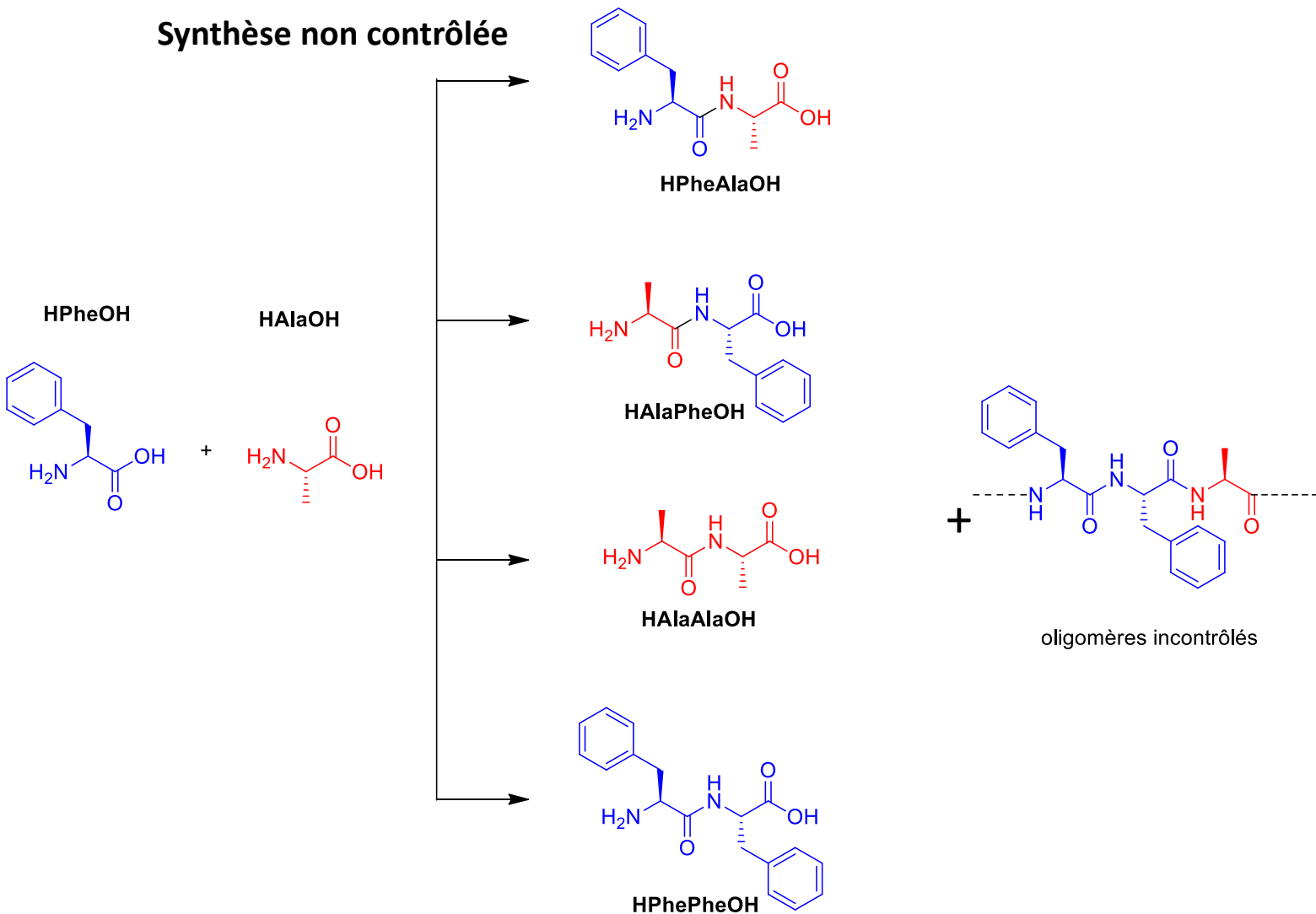
Protection des fonctions non engagées dans
la liaison peptidique
Système d'orthogonalité

Activation de la fonction acide pour former
la liaison peptidique

Contrôle de **l'épimérisation**

Protections

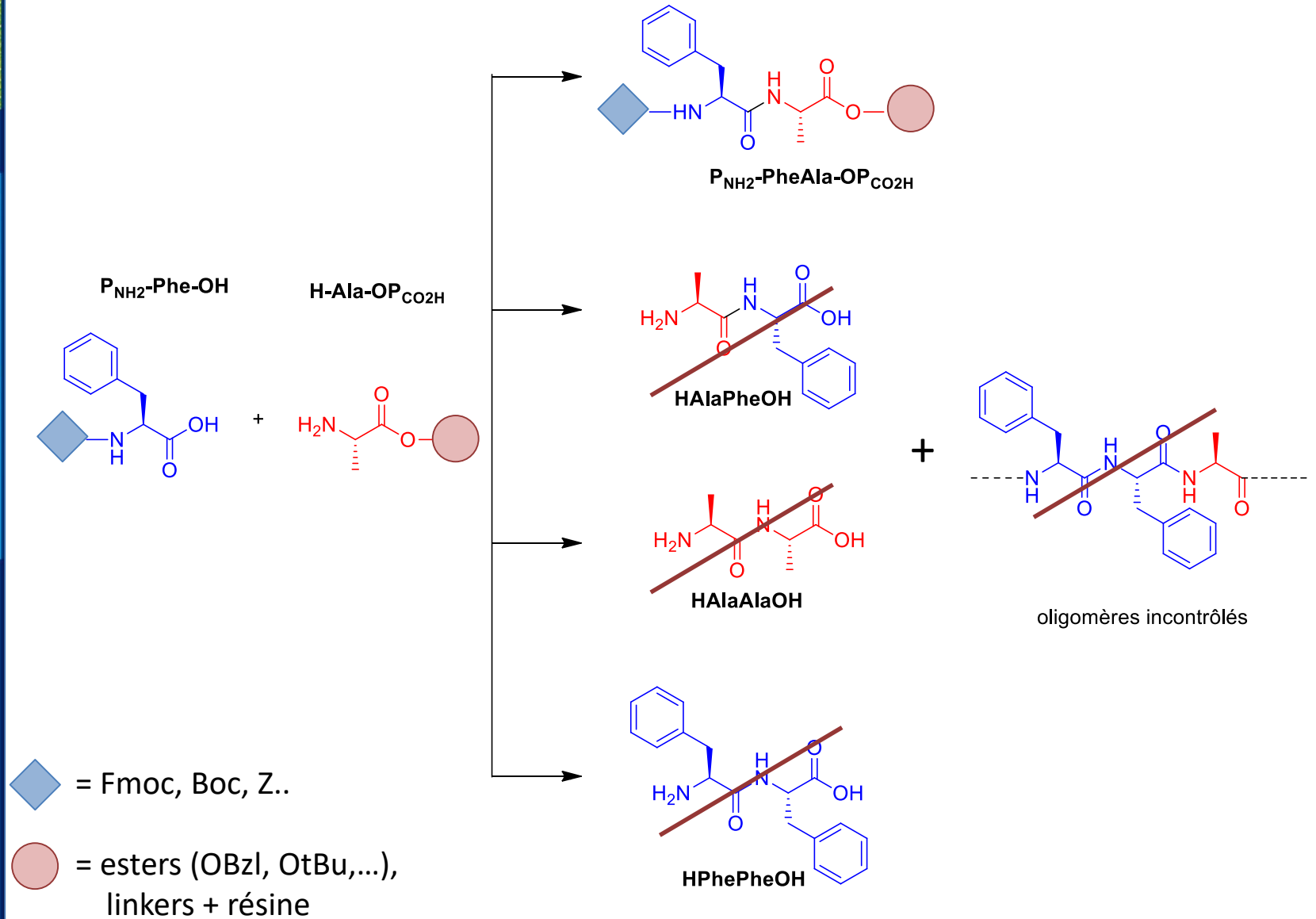
Synthèse non contrôlée



Au moins
4 peptides*

+ si chaînes latérales
fonctionnalisées

Protections






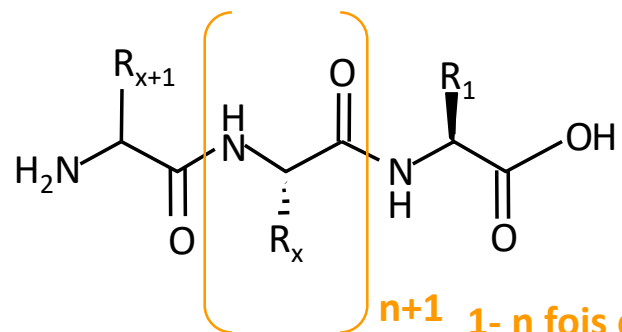
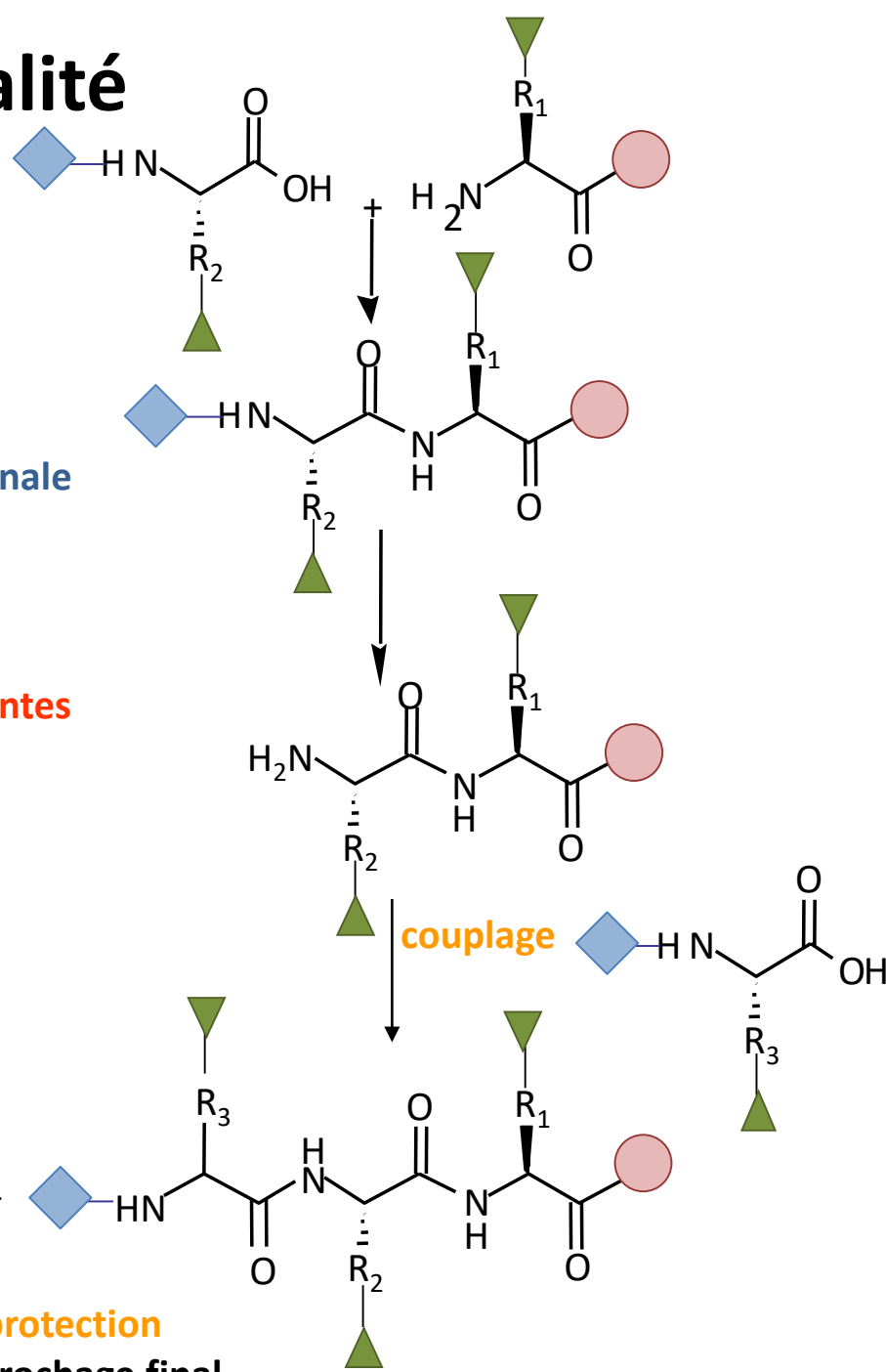
Nature des protections: critères à remplir

- introduction et élimination ne doivent **pas entraîner des réactions secondaires**
- **stables** durant le couplage
- **élimination facile**
- protections de l'acide et de l'amine doivent être **orthogonales**



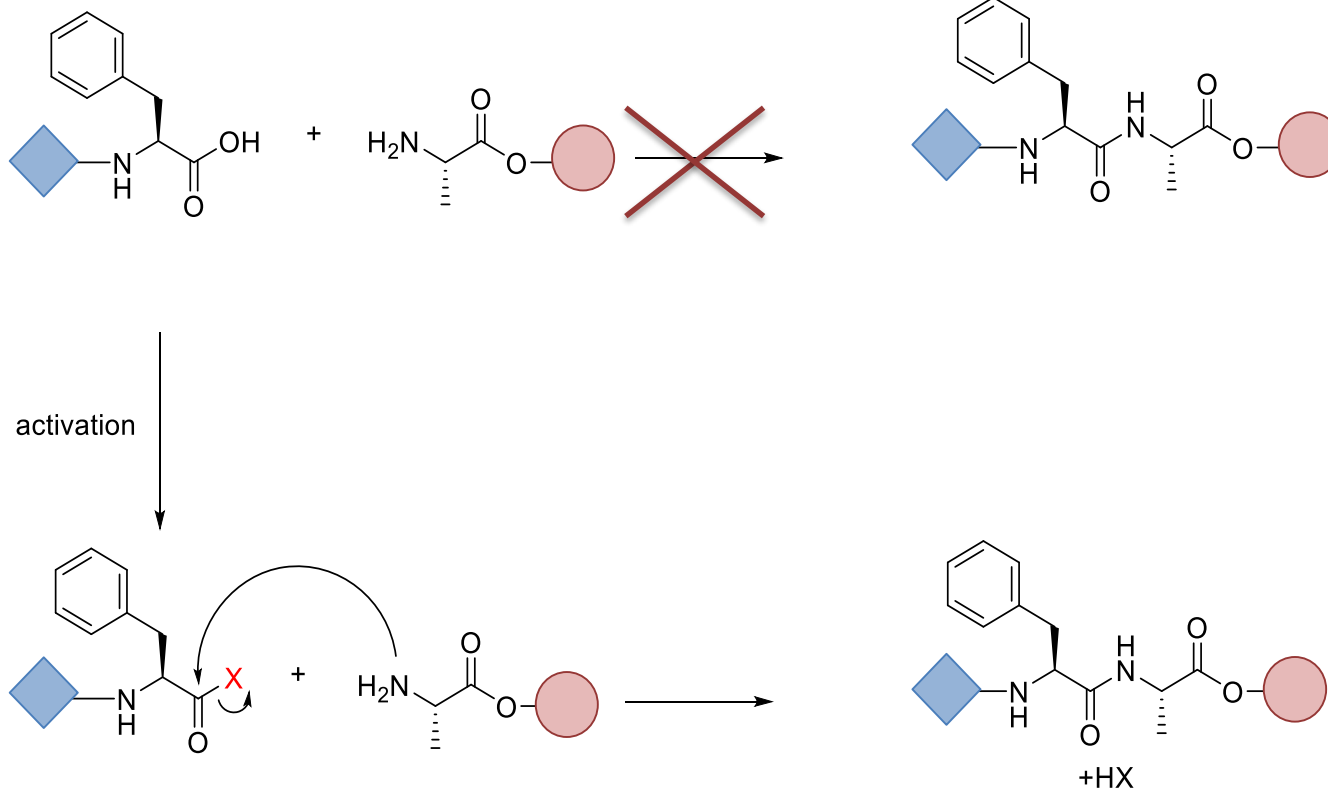
Protections et orthogonalité

-  Protection ou **support solide**
 -  Protection chaîne latérale
 -  Protection de l'amine α
- Permanentes**
- Temporaires**



1- n fois couplage, déprotection
2- déprotection et décrochage final

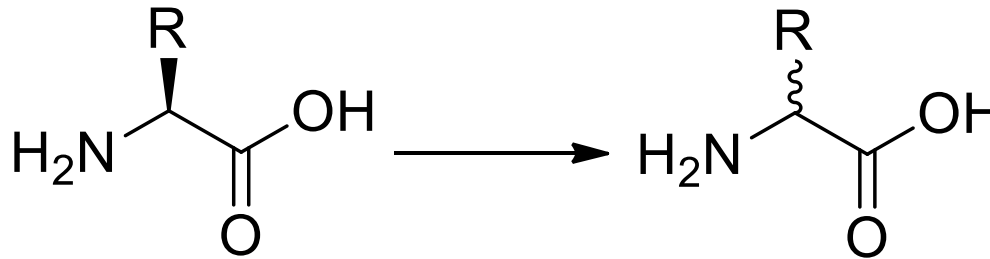
Activation



X : électroattracteur et bon groupement partant

Activation en milieu basique (amine déprotonée et formation d'un carboxylate préalablement au couplage)

Contrôle de l'épimérisation



Perte de l'intégrité chirale
(épimérisation*)

En synthèse peptidique si les conditions ne sont pas contrôlées:
L+L- \rightarrow LL +DL **diastéréoisomères** (épimérisation)

Si épimérisation : obtention de mélanges difficilement séparables aux propriétés différentes

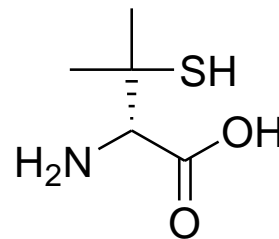
Ex: 100 AA, 0.2% à chaque étape donne 18 de mélange de 100 **diastéréoisomères**

* **épimérisation**: et pas racémisation qui est: LL- \rightarrow LL+ DD **énantiomères**

En synthèse peptidique si les conditions ne sont pas contrôlées:
L+L- \rightarrow LL +DL diastéréoisomères

Importance de la stéréochimie

Ex: D-pénicillamine **médicament** cirrhose biliaire chélatant Cu^{2+}
L **atrophie** le nerf optique



D pénicilamine

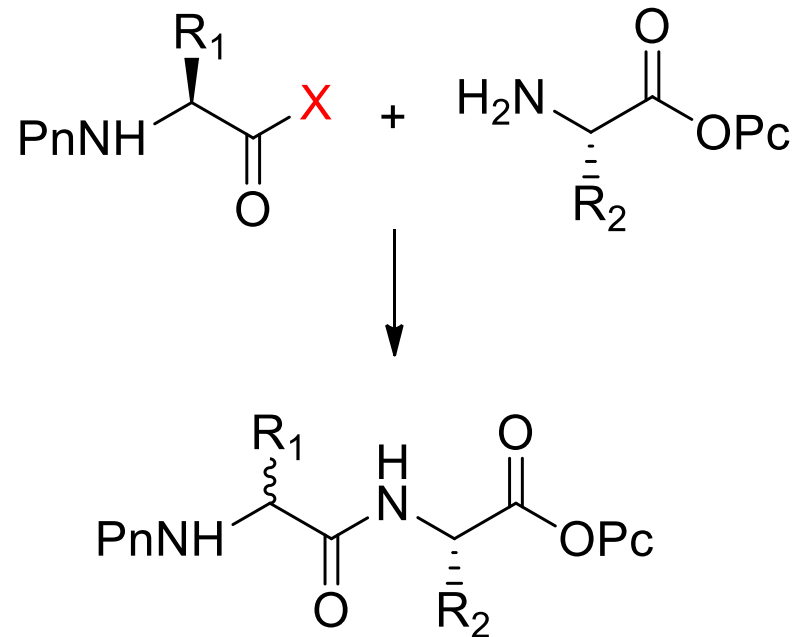
Ex: Aspartame H-Asp-Phe-OMe **sucré** (x 150 par rapport au sucre)
H-D-Asp-D-Phe-OMe **amer**

Epimérisation

Deux mécanismes possibles peuvent conduire à l'**épimérisation** qui a **essentiellement lieu lors de l'étape de couplage**

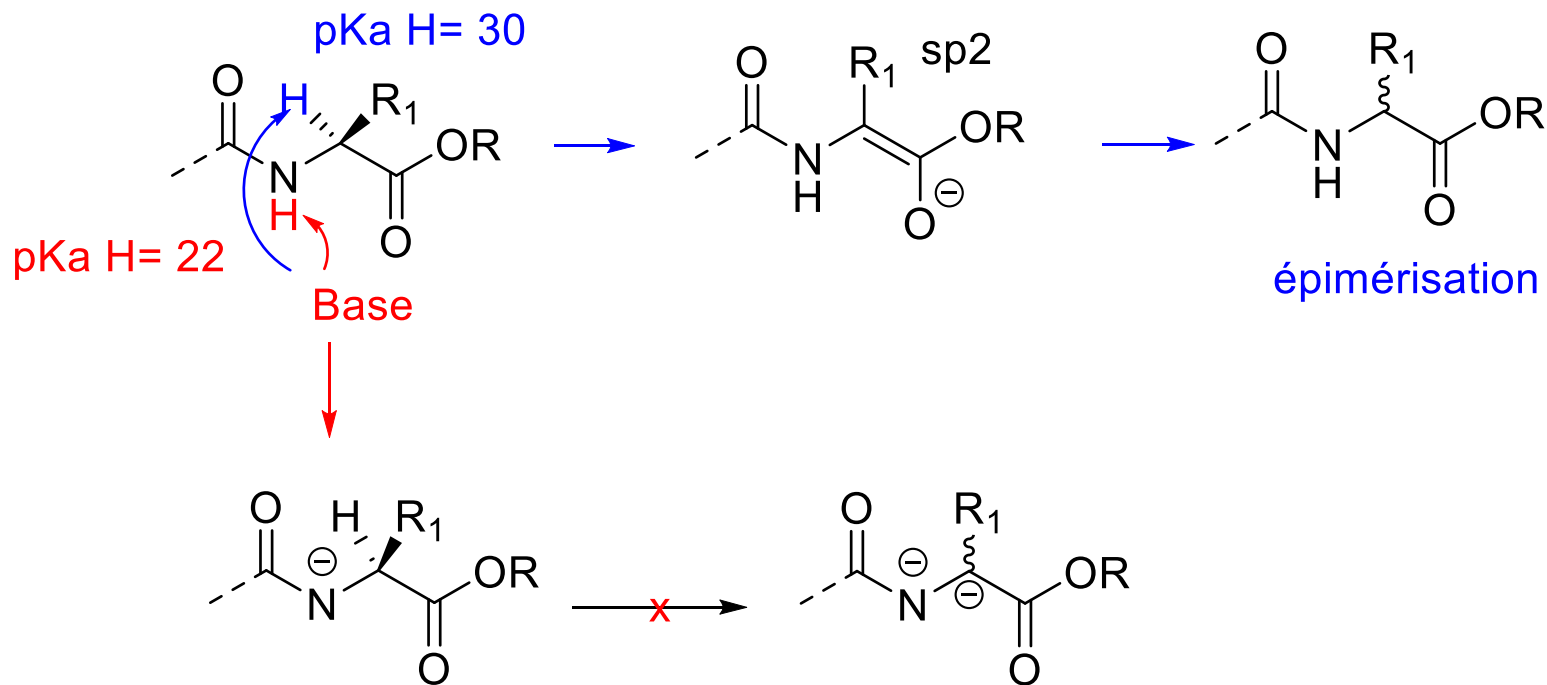
* l'abstraction directe du proton α

* **formation d'oxazolones (mécanisme principal)**



Epimérisation par abstraction directe du proton

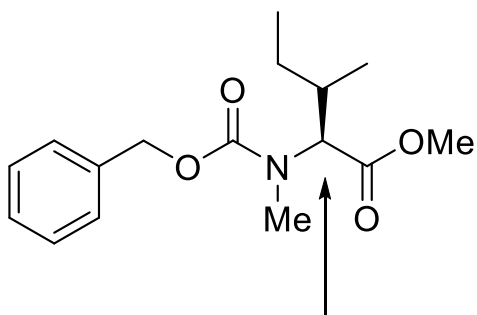
L'abstraction directe du proton alpha **n'est pas le mécanisme général d'épimérisation** car le proton $H\alpha$ n'est pas le plus acide (le mécanisme bleu n'est généralement pas possible). C'est le H amidique le plus acide habituellement.



Si $R = H$ le carboxylate prévient de l'abstraction du proton α , pas d'épimérisation
 $R = \text{attracteur d'e}^-$: c'est le cas pendant l'activation de l'acide aminé (aide à la stabilisation du carbanion) : abstraction directe est un peu plus favorisée mais le H amide ou uréthane reste plus acide ($pK_a \approx 30$). L'abstraction directe n'est possible que dans des cas particuliers où R_1 stabilise le carbanion.

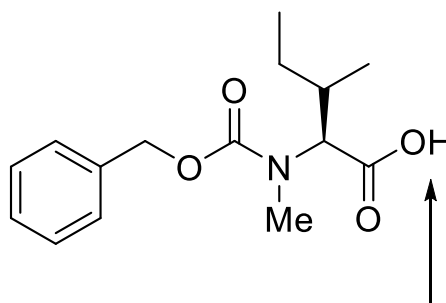
Epimérisation par abstraction directe du proton

Etude d'un modèle pour prouver que l'abstraction directe n'est pas favorisée
Cas d'un milieu basique extrême 1.1 équivalent de NaOH, 24h



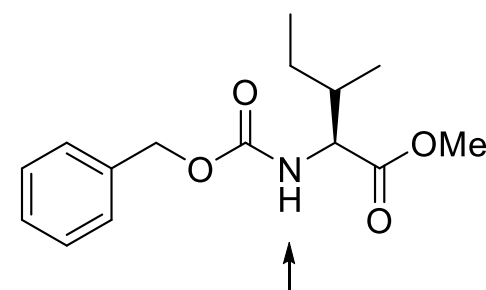
premier proton arraché

Z-(N α Me)Ile-OMe
12% épimérisation



premier proton arraché

Z-(N α Me)Ile-OH
0.8% épimérisation



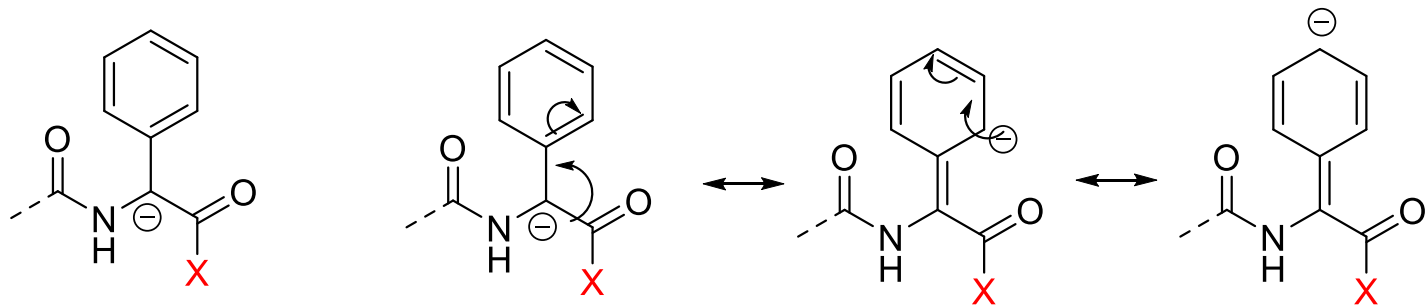
premier proton arraché

Z-Ile-OMe
1% épimérisation

Epimérisation par abstraction directe du proton

Cas particuliers

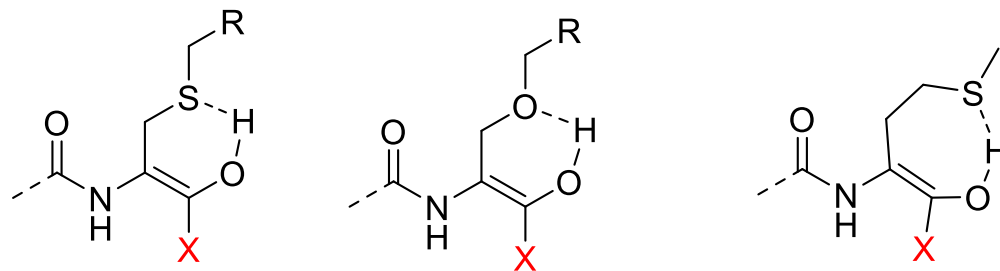
Phénylglycine (Phg)



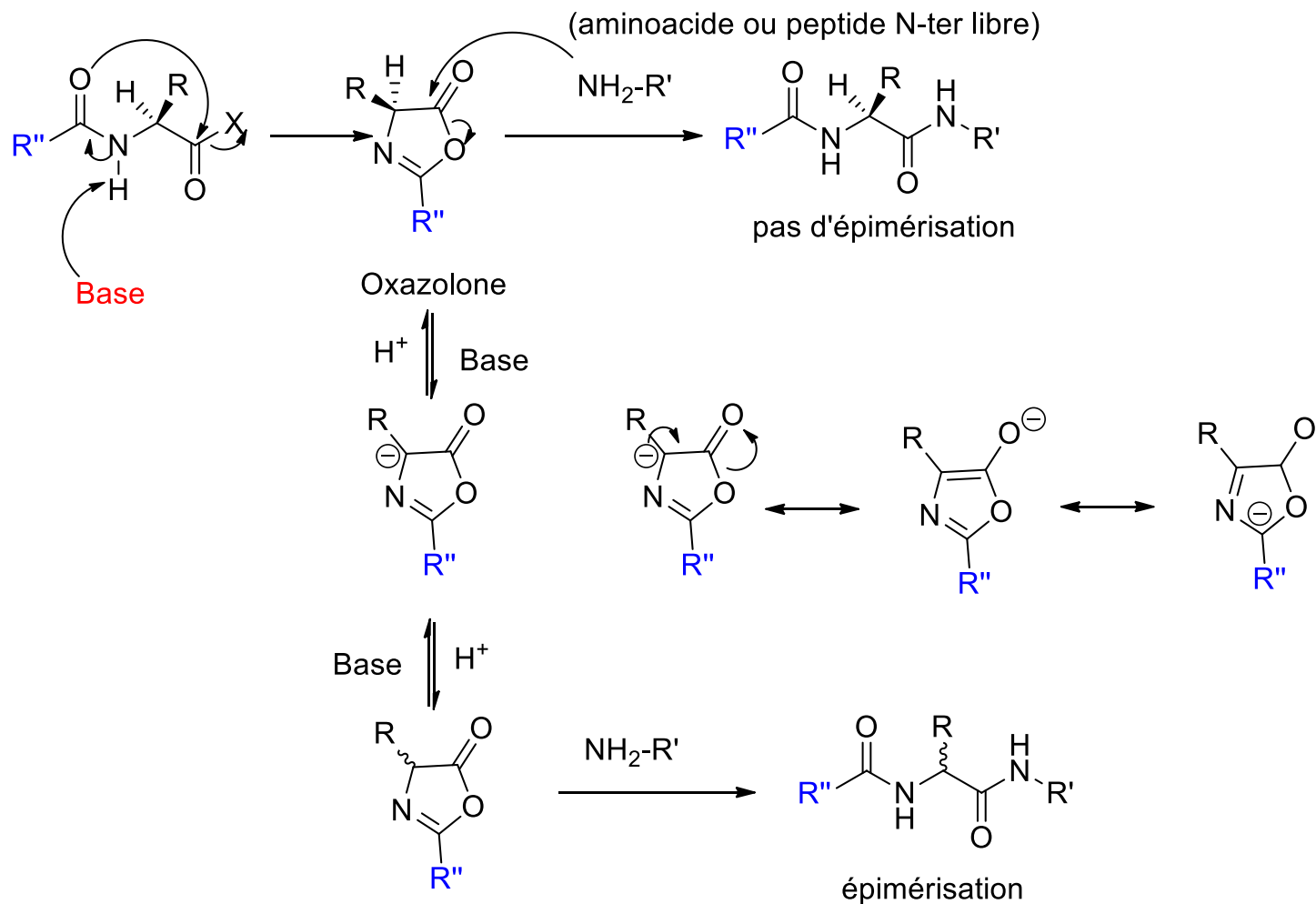
Cys ou Ser protégées ou Met : épimérisation favorisée par stabilisation

-pendant l'activation (**X= groupe activant électroattracteur et partant**)

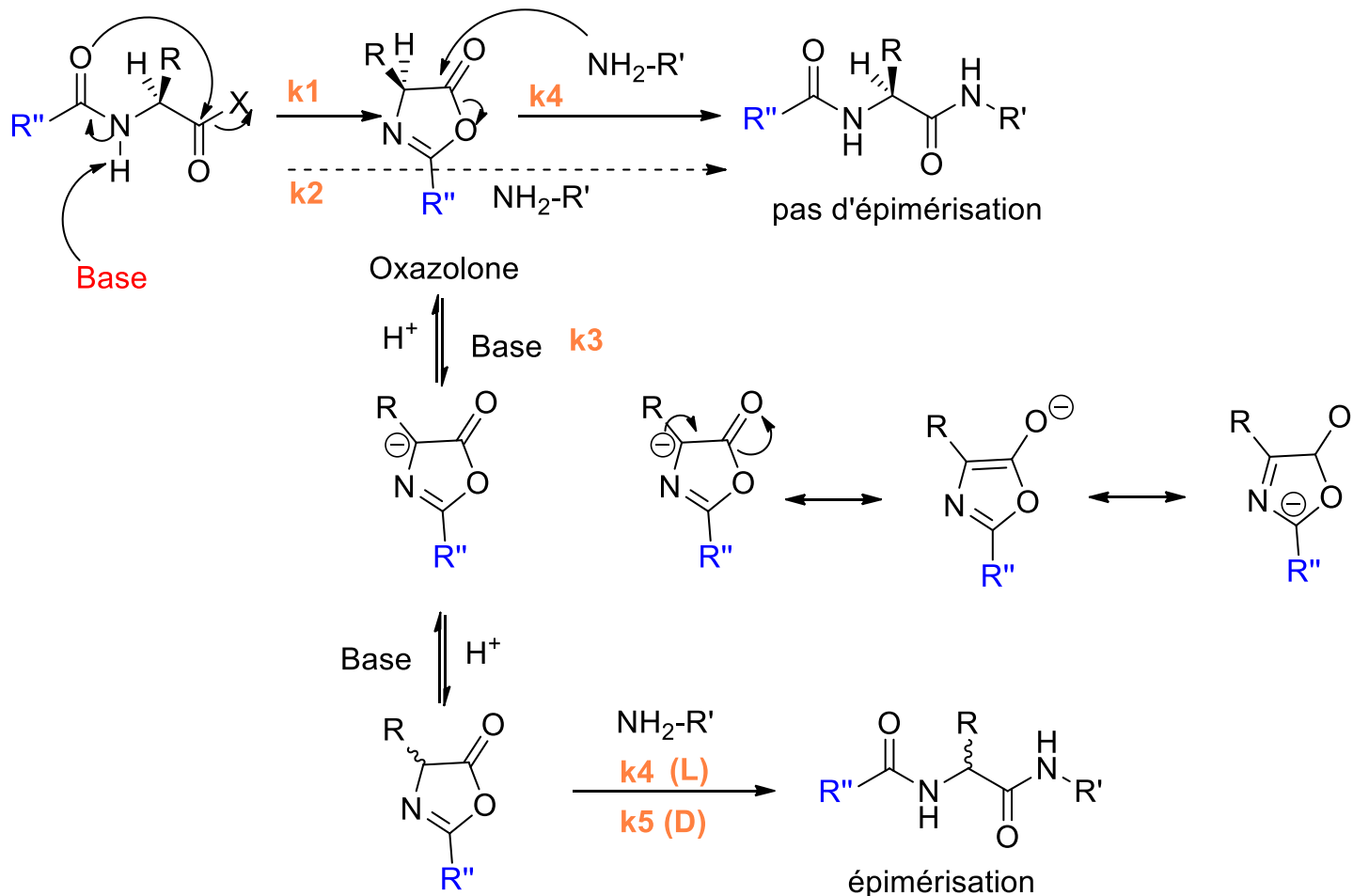
-en cours de synthèse si Cys, Met ou Ser sont ancrés sur une résine **via un lien ester (X=O-linker)**



Epimérisation par formation de 5(4H)-oxazolone



Influence des vitesses relatives

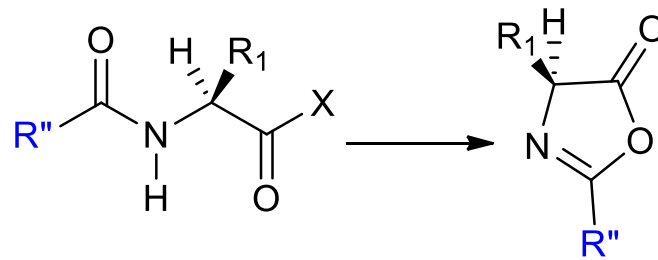


$k_2 \gg k_1$: on ne passe pas par l'oxazolone: pas d'épimérisation

$k_1 = k_2$ mais $k_4 \gg k_3$: on passe par l'oxazolone mais elle n'épimérise pas

$k_1 \gg k_2$, $k_3 \gg k_4$ épimérisation et si $k_5 \gg k_4$, on peut même avoir épimérisation totale

Epimérisation par formation d'oxazolone: Conséquences



➤ R'' = alkyl (*cas des acyl-aminoacides (N-acétyl), des fragments peptidiques C-ter activés*): formation de l'oxazolone favorisée -> épimérisation
Synthèse **pas à pas du C-terminal vers N-terminal**,
Couplage par fragments possible si **Gly ou Pro** dans la séquence

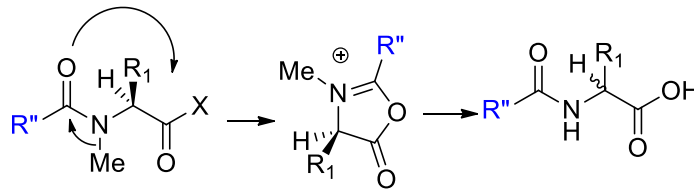
➤ R'' = alkoxy (Alk-O-) (*aminoacides C-ter activés N-protégés uréthane*)
formation de l'oxazolone non favorisée (diminution de l'acidité du NH et déstabilisation de l'anion par effet donneur) →
Protection de l'amine α par groupement de type **uréthane (Boc, Fmoc..)**

Utilisation de **bases faibles** (amine III) pendant le couplage.

Minimisation du temps de couplage (pas de préactivation, **concentration élevée** pour favoriser l'intermoléculaire au détriment de l'intramoléculaire)

Oxazolone Favorisée à T° élevée -> on travaille à **TA ou 0°C**

Epimérisation par formation d'oxazolonium N-méthyl aminoacides

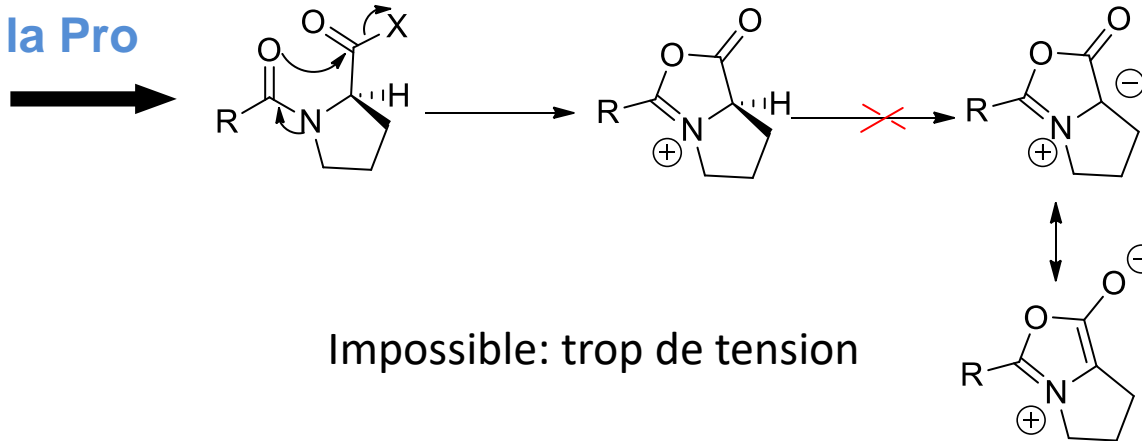


augmente nucléophilie
de l'oxygène



oxazolonium

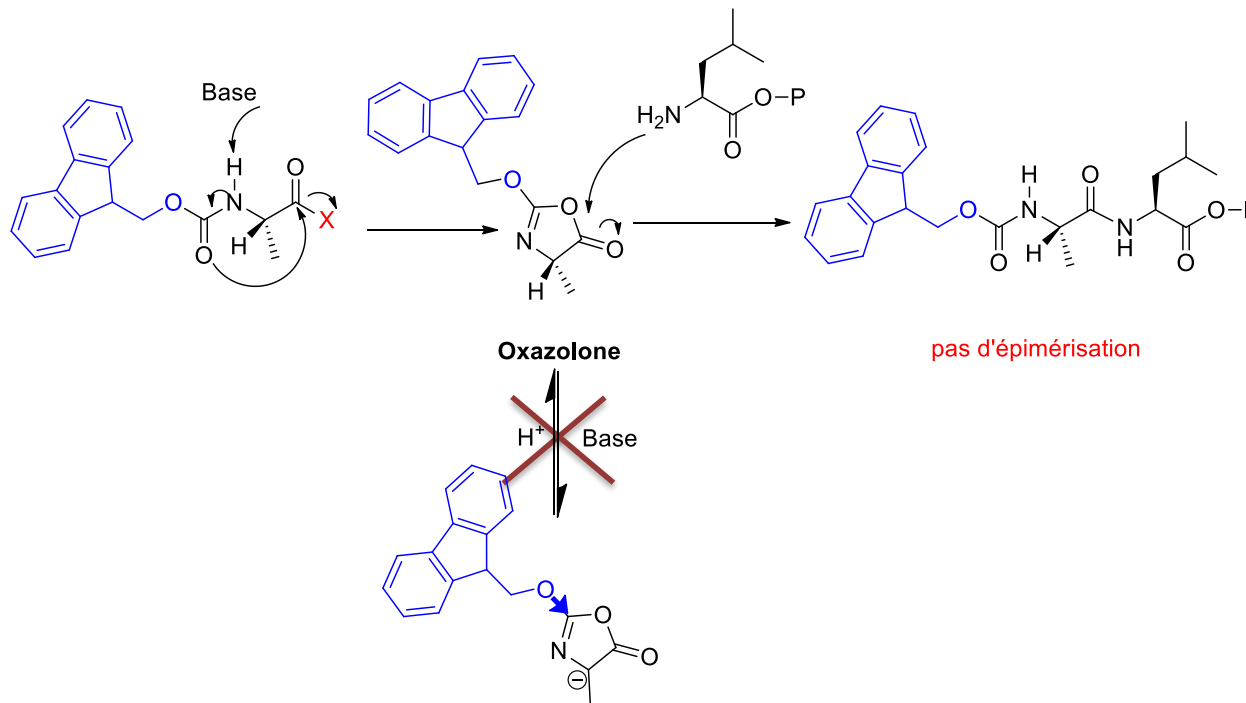
Cas de la Pro



Impossible: trop de tension

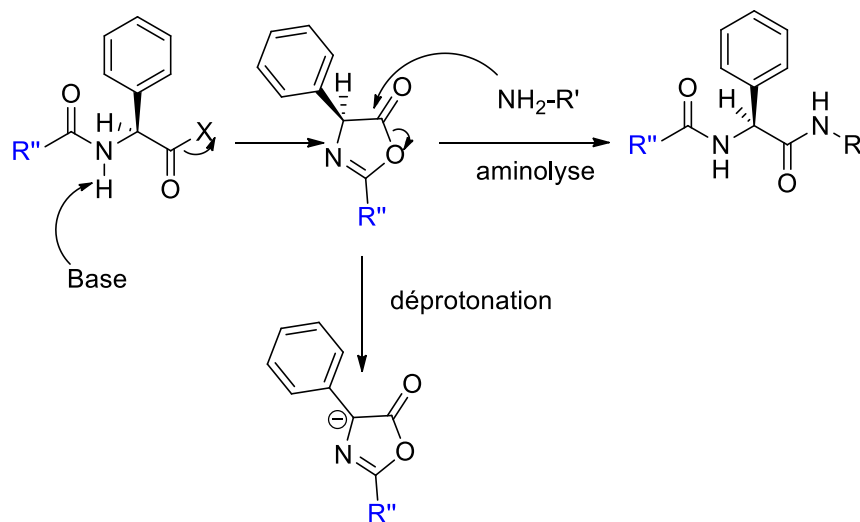
Groupement protecteur uréthane

Groupement uréthane (carbamate) : Fluorénylméthoxycarbonyl ou Fmoc



effet critique de l'oxygène: déstabilisation du carbanion →
la déprotonation de l'oxazolone n'est pas favorisée

Etude de l'épimérisation de la phénylglycine



Phg: carbanion α stabilisé par effet mésomères cas défavorable

R''	Vitesse épimérisation	Vitesse aminolyse
Amide Ph	850	1
Amide Me	21	25
Uréthane Z (PhCH ₂ O)	1	250



Protection **uréthane** : risque nul sauf si la vitesse de couplage est vraiment **très faible**

Eviter l'épimérisation

Amine α doit être protégée sous forme d'**uréthane**

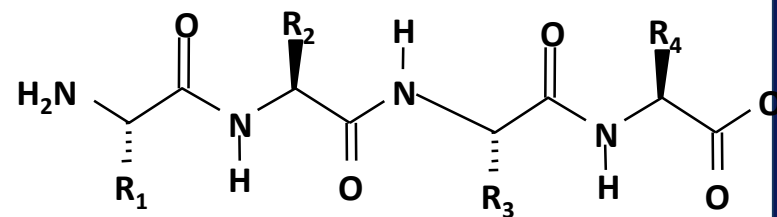
Utilisation de **bases faibles** (amine III) pendant le couplage

Minimisation du temps de couplage (agent de couplage puissant, concentration élevée pour favoriser l'intermoléculaire au détriment de l'intramoléculaire

Oxazolone favorisée à T° élevée -> **travailler à TA ou 0°C**

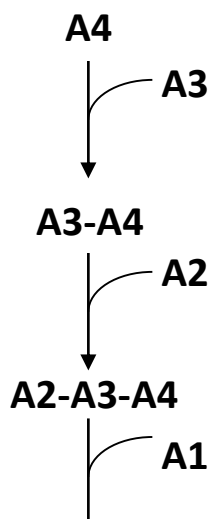
Pas de préactivation: car seule la réaction intra moléculaire est possible pendant avant l'ajout de la résine.

Stratégies générales

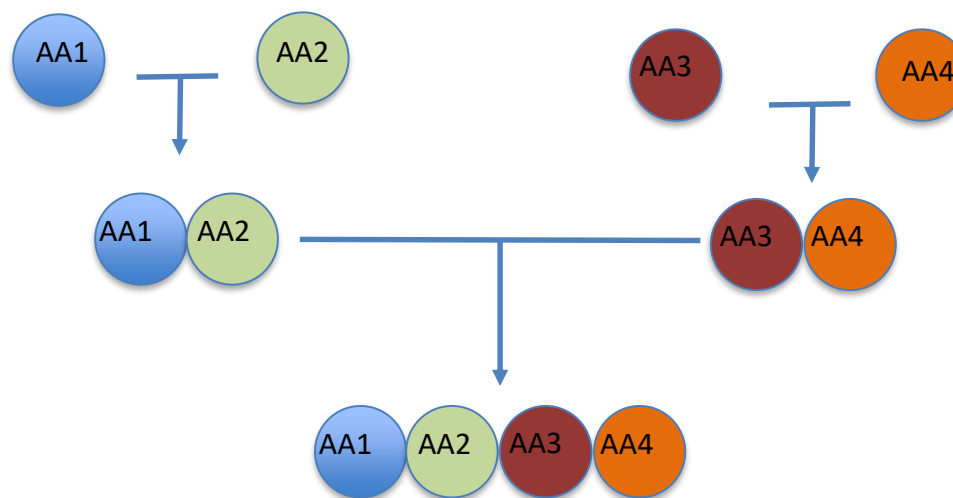


H-A1-A2-A3-A4-OH

pas à pas



Convergente ou par fragments



Synthèse par fragment (ou convergente)

Avantages

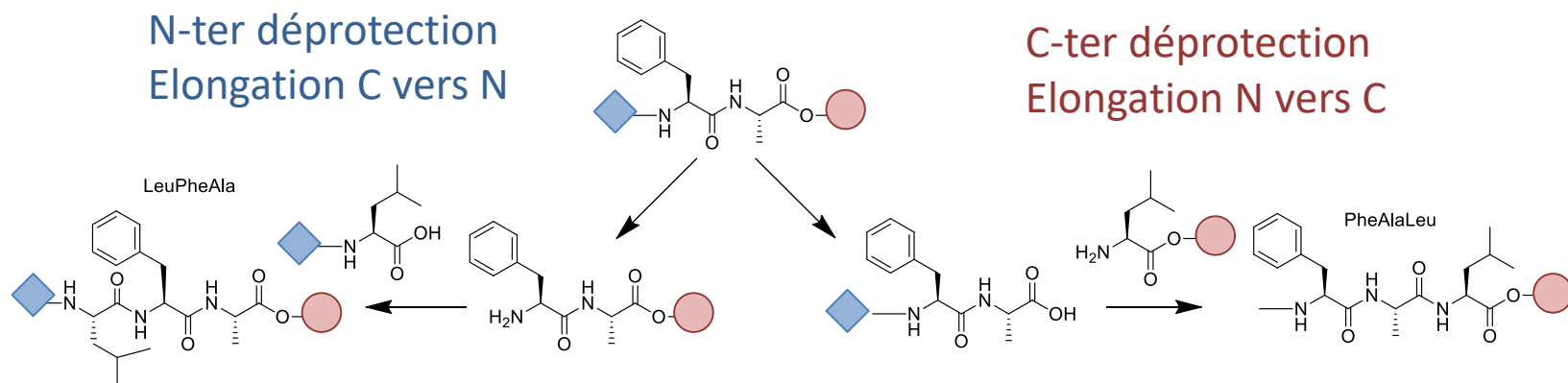
- plus rapide
- possibilité de purification des intermédiaires
- différence de taille entre segments et produit de condensation : séparation plus facile
- en cas de problème de synthèse, le segment est plus facile à re-préparer.
- en synthèse linéaire :
 - * pas de moyen de contrôle facile en cours de synthèse
 - * délétion d'aa conduit à un peptide très difficile à séparer du peptide attendu

Inconvénients

- difficulté de solubiliser les longs fragments
- faible concentration (problème de coût) des fragments : réactions lentes rendements bas
- **problème d'épimérisation** lors de l'activation de l'acide aminé C-terminal (oxazolone)*

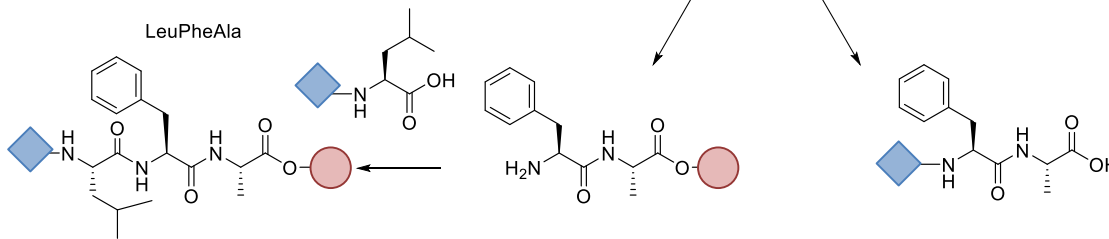
* sauf Pro et Gly

Pourquoi élongation C→N ter ?

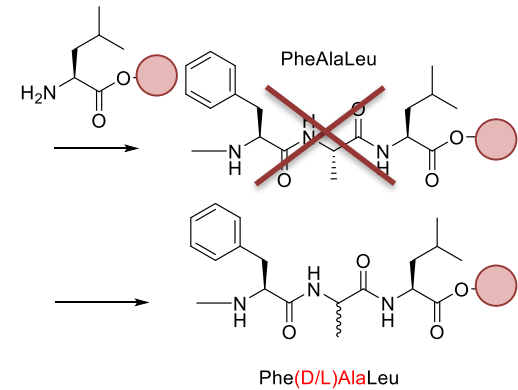


Pourquoi élongation C→N ter ?

N-ter deprotection
Elongation C vers N

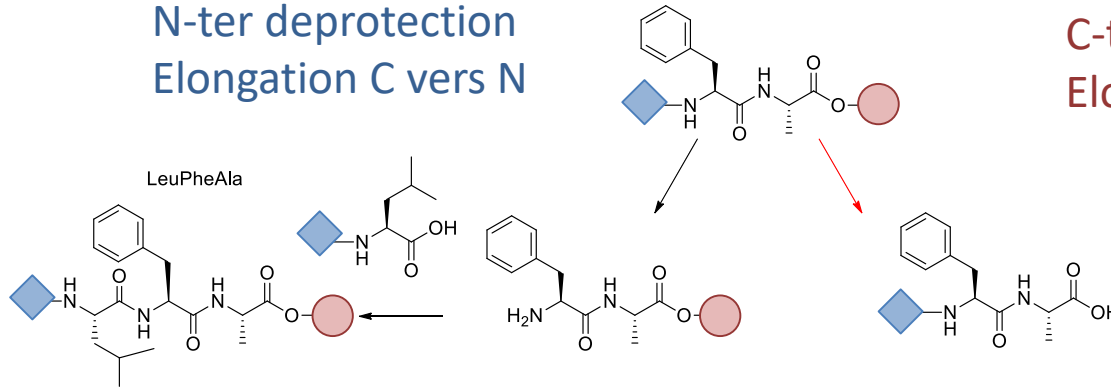


C-ter deprotection
Elongation N vers C

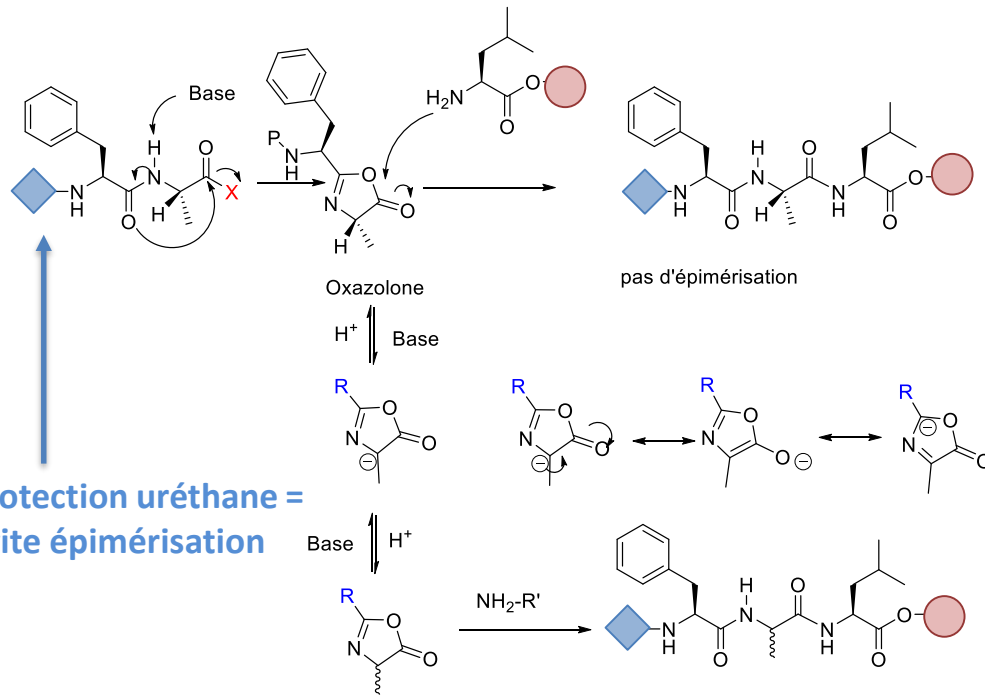
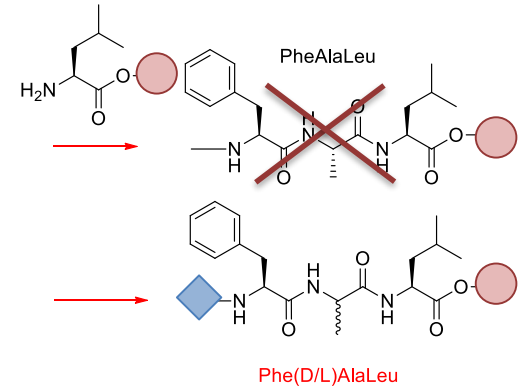


Pourquoi élongation C→N ter ?

N-ter deprotection
Elongation C vers N



C-ter deprotection
Elongation N vers C



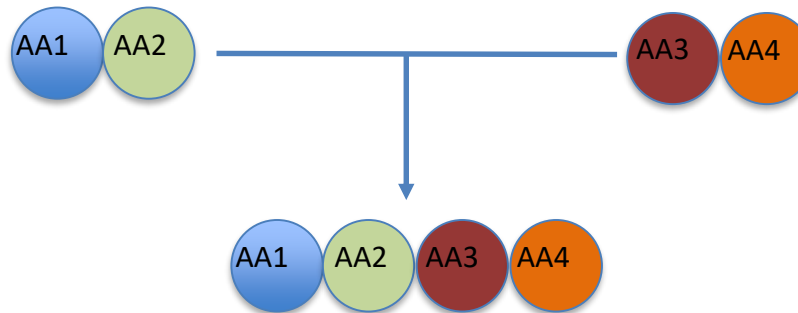
Protection uréthane =
Évite épimérisation

Epimérisation : mélange de
diastéréoisomères Phe Ala (D/L) Leu

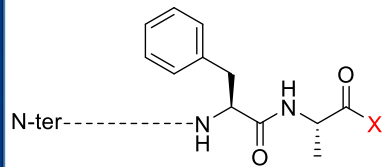
Exception:
Pas d'épimérisation
avec Gly et Pro

Epimérisation pendant le couplage de fragments

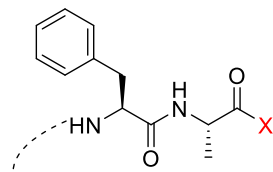
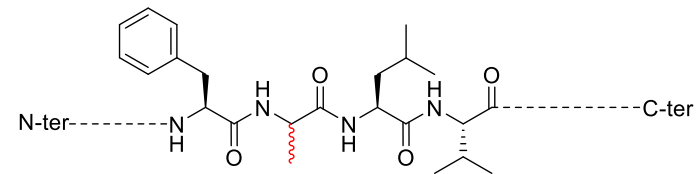
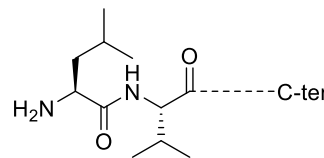
Synthèse convergente ou par fragments



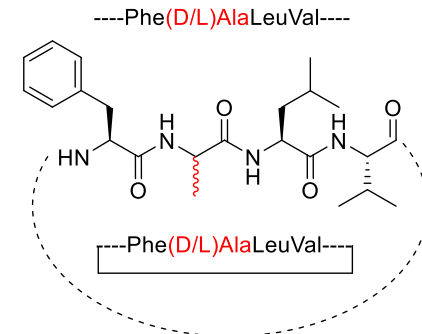
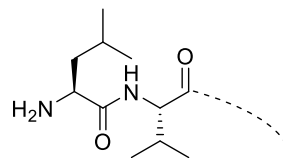
Fragment N ter, activé en Cterminal



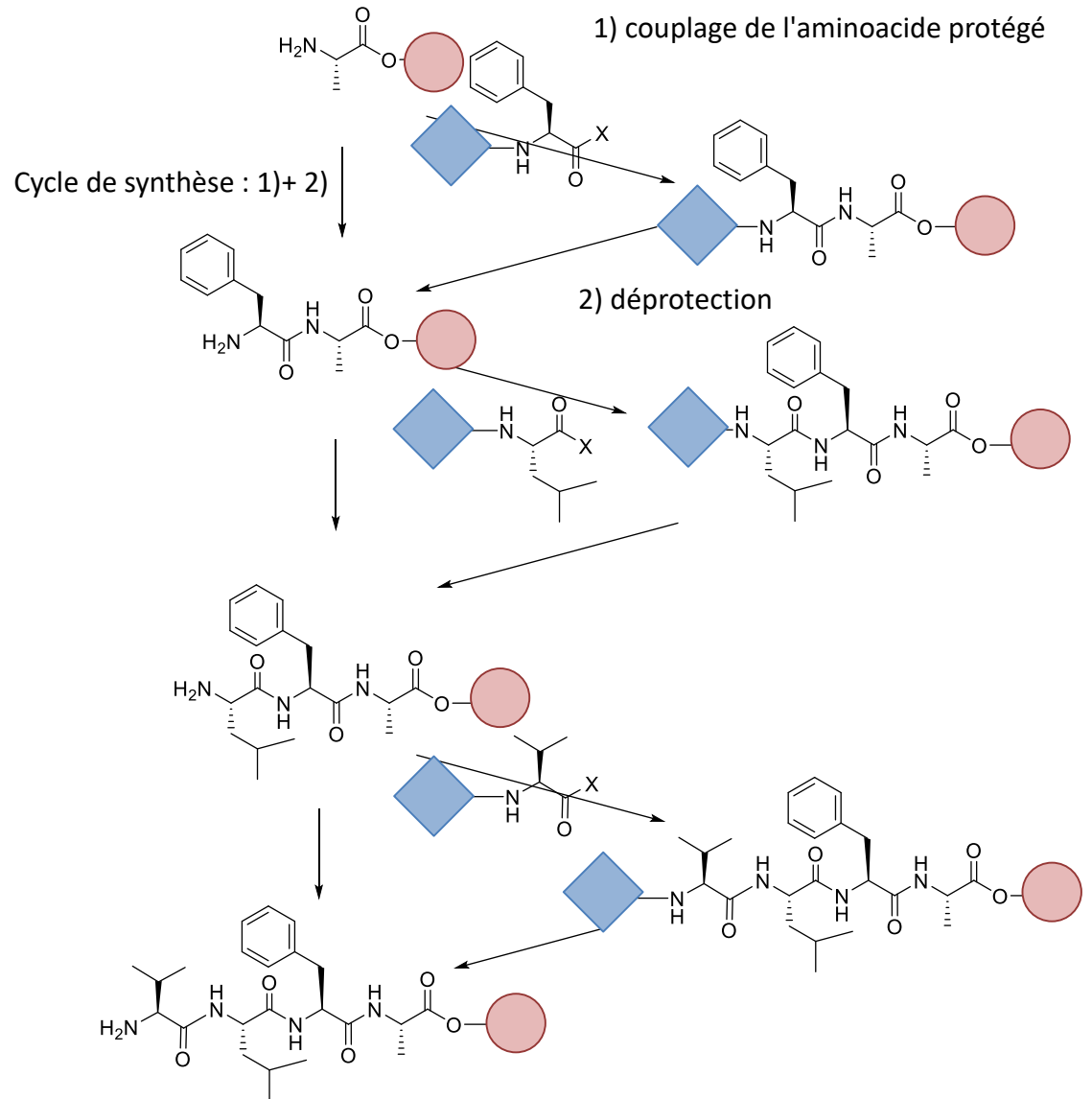
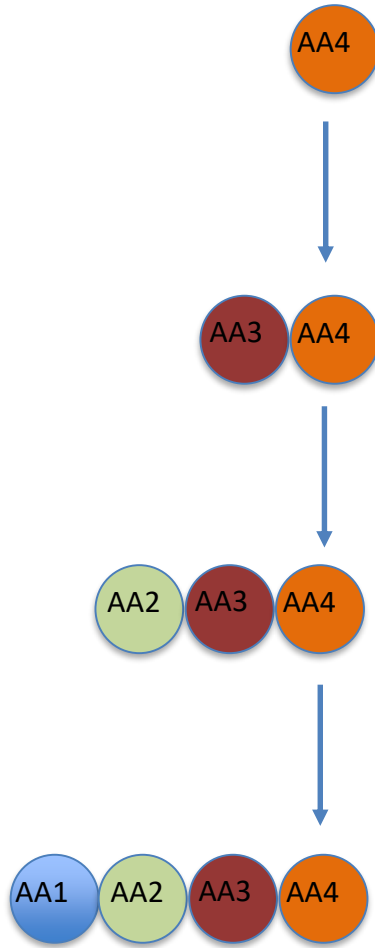
Fragment C ter, amine libre



fermeture de cycle

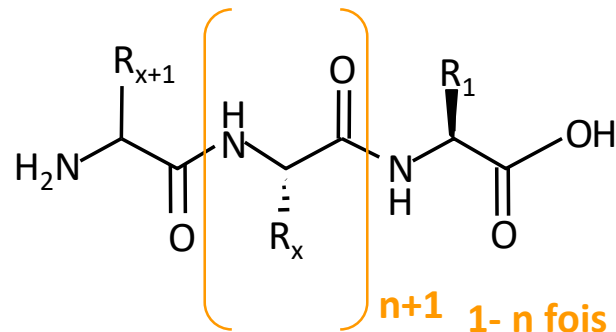
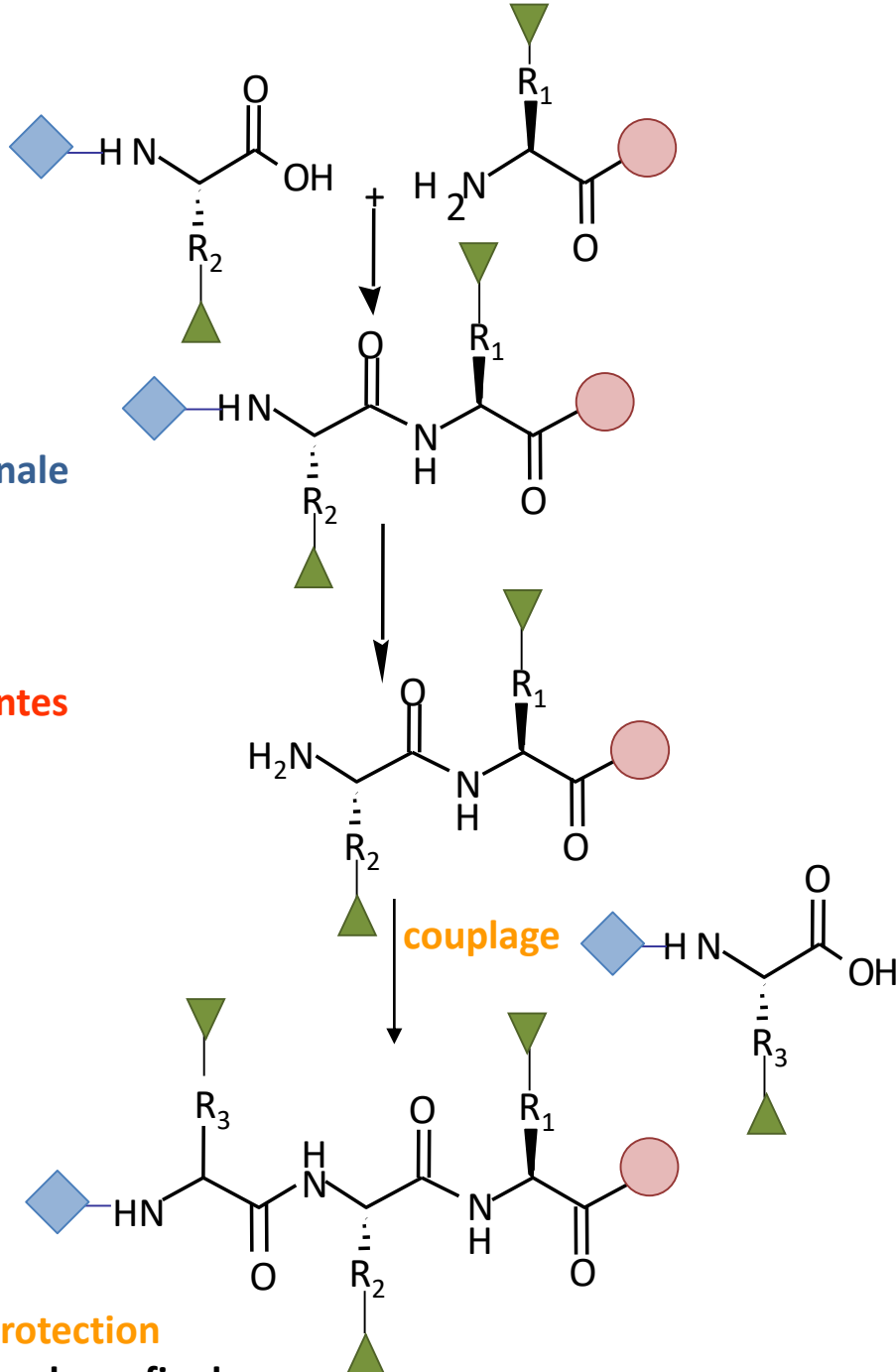


Synthèse pas à pas



Principe général de la synthèse peptidique

- Protection ou **support solide** } Permanentes
- ▼ Protection chaîne latérale } Permanentes
- ◆ Protection de l'amine α } Temporaires



n+1 1- n fois couplage, déprotection
2- déprotection et décrochage final

II- Protections des aminoacides

Protection de la **fonction amine** α

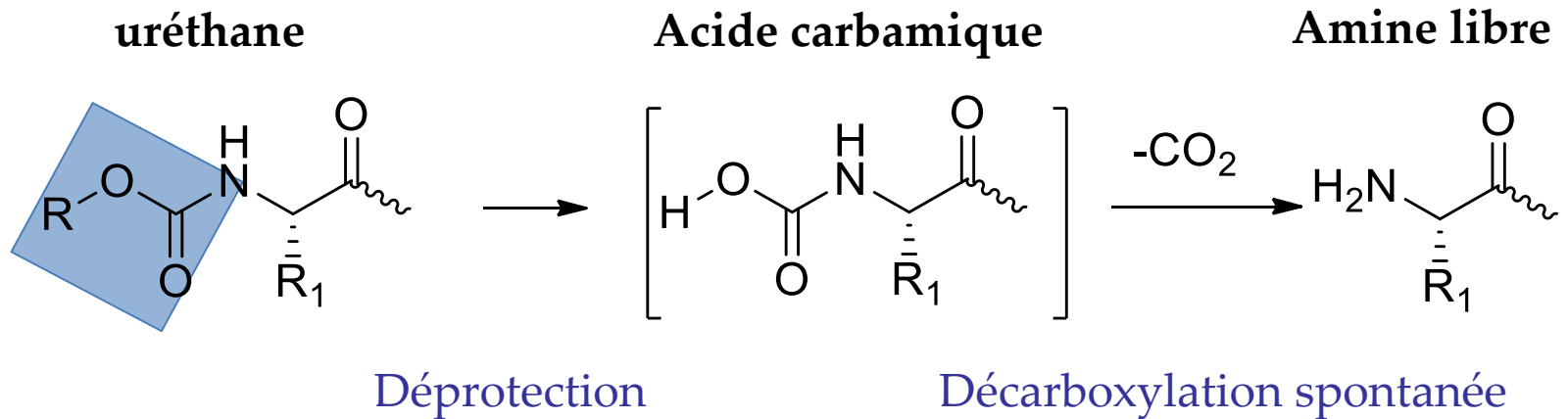
Protection de la **fonction acide** C-terminale ou **support solide**

Protection des **chaînes latérales**

Protection de la fonction amine α

Uréthane (ou carbamate)

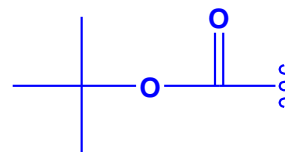
- minimise l'épimérisation
- liaison alkyl-oxygène facilement clivée dans diverses conditions



Protection de la fonction amine α

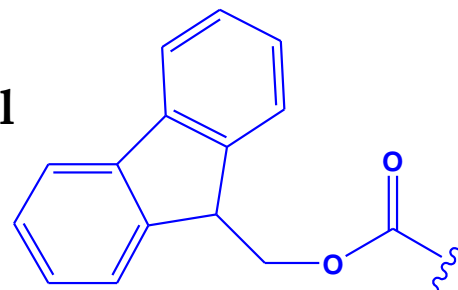
Boc, Fmoc, Z

Boc : *tert*-butyloxycarbonyl



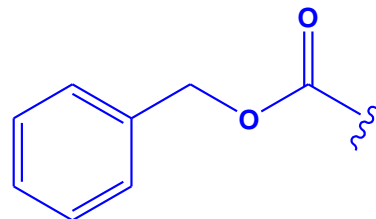
Acido labile
TFA

Fmoc : 9-Fluorénylméthoxycarbonyl



Baso labile
Secondary amine

Cbz ou Z : Benzyloxycarbonyl

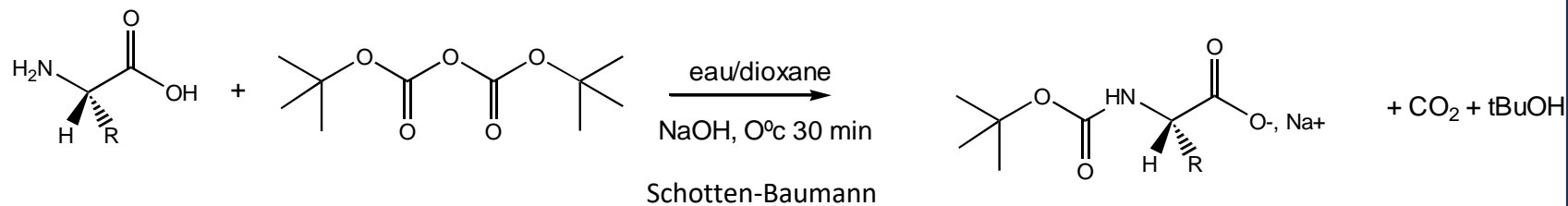


Hydrogéo labile
ou acide fort

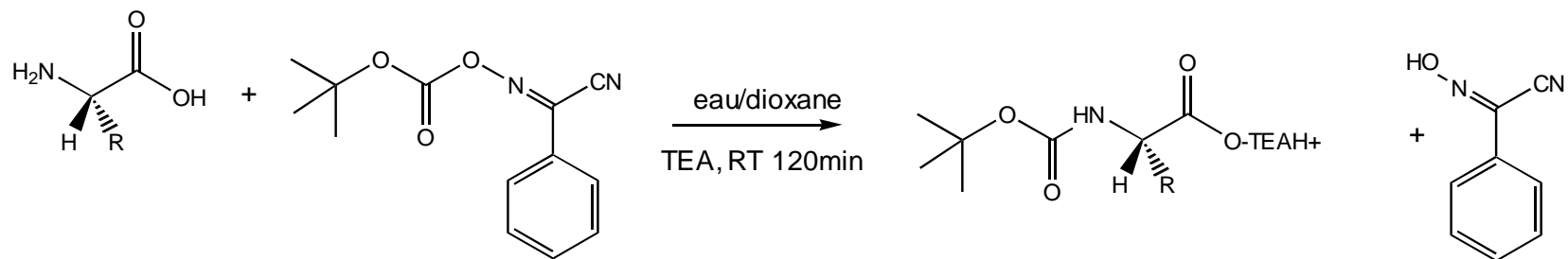
Boc (*tert*-butyloxycarbonyl)

Introduction: **Boc₂O pyrocarbonate de *tert*-butyle**

(Boc-Cl instable → isobutène CO₂ et Cl⁻. Azotures BocN₃ explosifs)



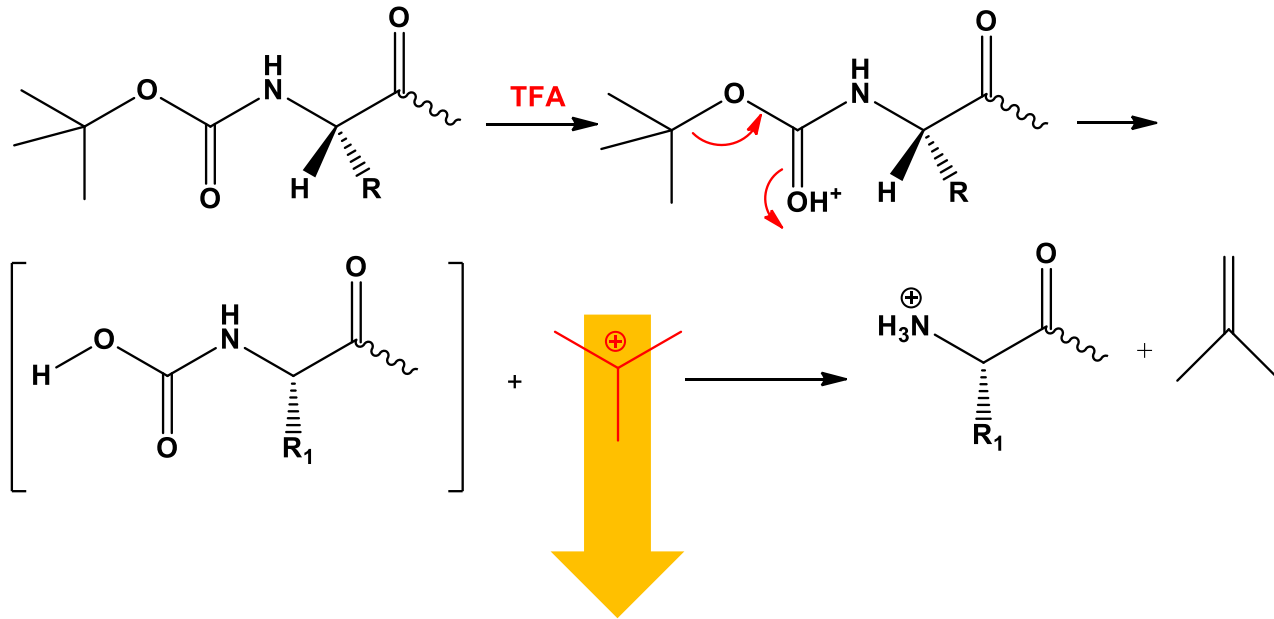
Introduction: **Boc-ON 2-*tert*butyloxy carbonyloximino-2-phenylacétonitrile**



Boc (*tert*-butyloxycarbonyl)

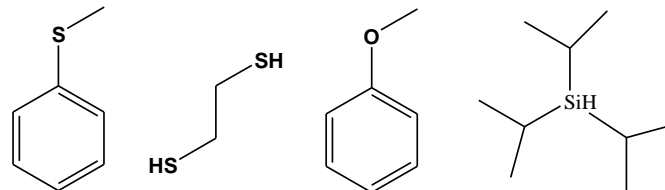
Elimination

Acidolyse TFA à T°Amb (TFA/DCM, HBr/AcOH, HF.....)



Alkylation de : **Trp, Tyr (friedel crafts), Met, Cys (S-alkylation)**

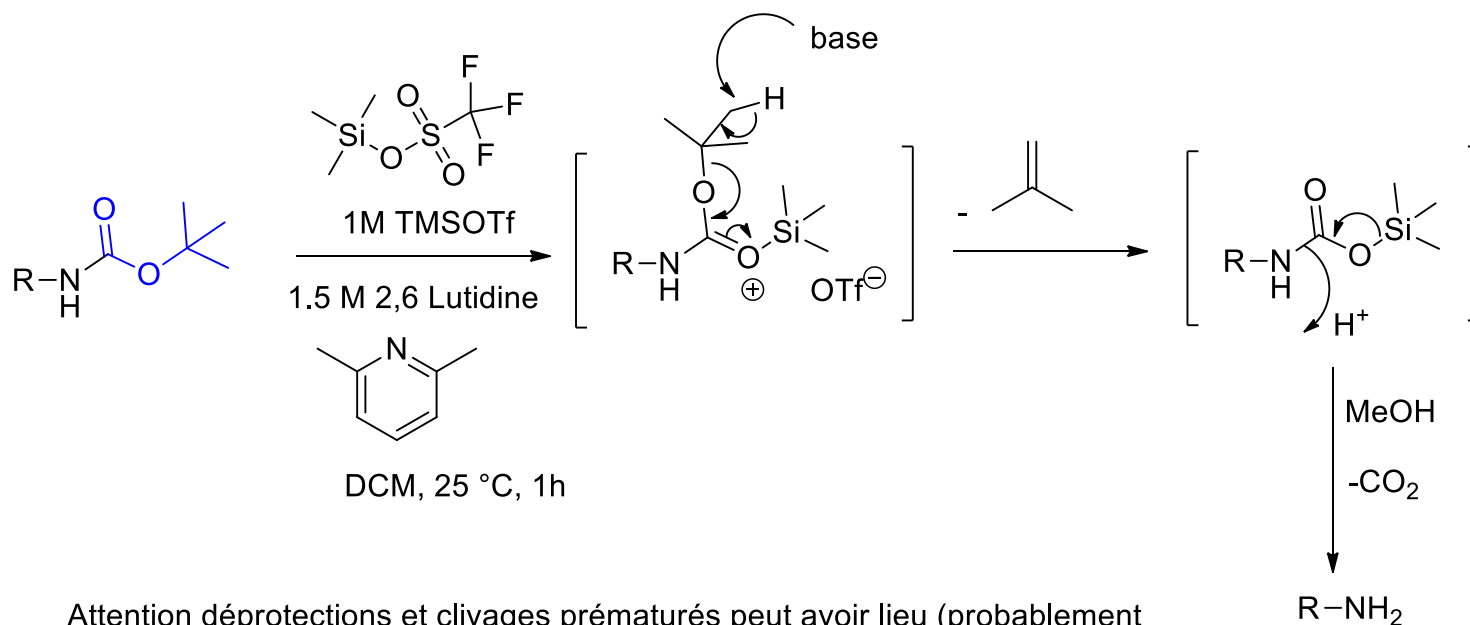
si présents, TFA + **scavengers** (EDT, anisole , thioanisole, TIS)



Boc (*tert*-butyloxycarbonyl)

Élimination **alternative** dans des conditions non acides:

Utile dans certaines stratégies où des fonctionnalisations multiples sont à prévoir

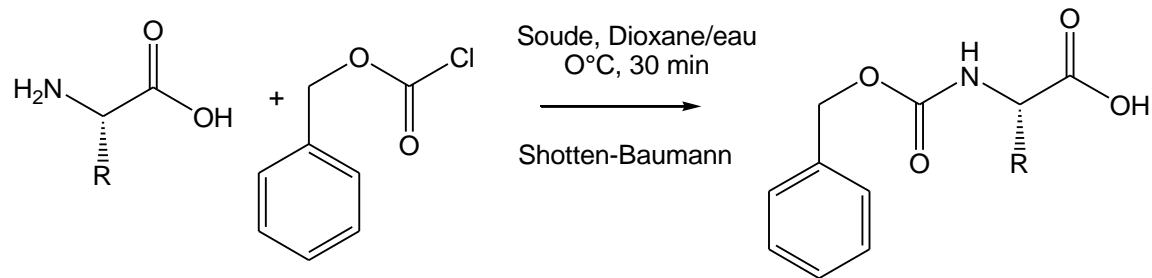


Attention déprotections et clivages prématurés peut avoir lieu (probablement dégagement d'acide triflique).

Cbz ou Z (Benzyloxycarbonyl)

Introduction

Z-Cl: chlorocarbonate de benzyle



Z₂O: pyrocarbonate de benzyle

Idem Boc₂O

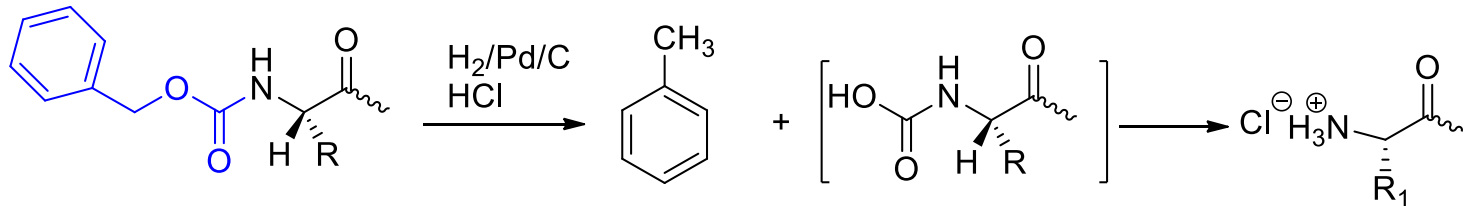
Stable: milieu acide TFA (orthogonal Boc), milieu basique

Instable : H₂, milieu acide fort ou réducteur NaNH₃

Cbz ou Z (Benzyloxycarbonyl)

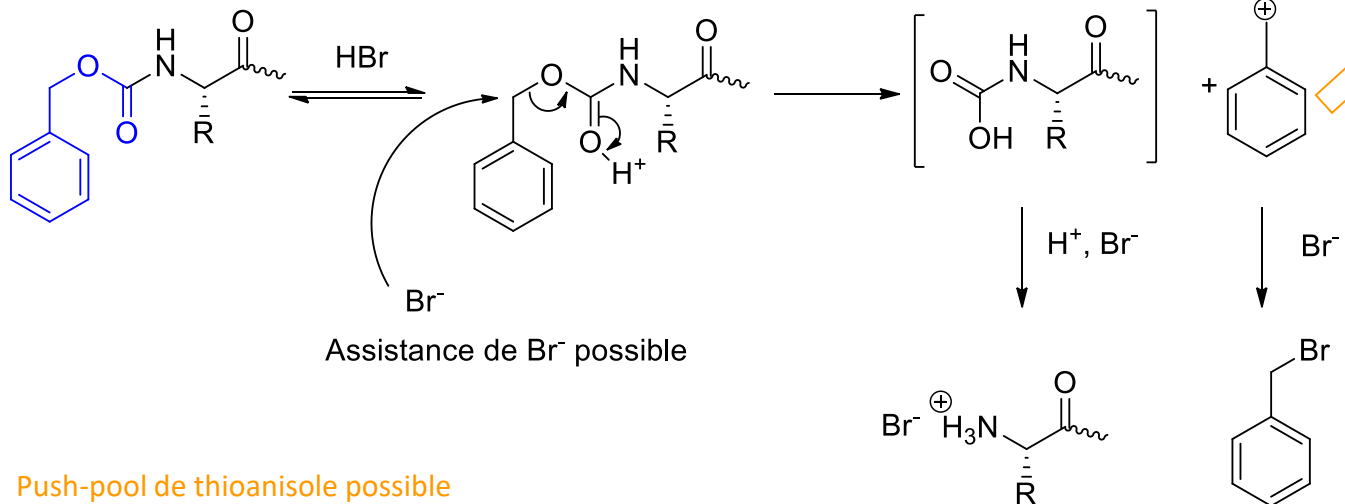
Élimination: hydrogénolyse H_2 Pd/C , EtOH 95% à T°A

avec 1eq HCl pour générer le sel d'amine



Si Met ou Cys, S= poison du catalyseur: on utilisera $H_2/Pd/BaSO_4$ ou autres méthodes

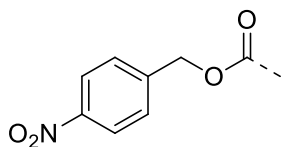
Élimination: acidolyse HBr/AcOH



Push-pool de thioanisole possible

Groupements dérivés du Boc et du Z

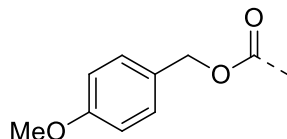
4-Nz



8 fois plus lent que Z à déprotéger HBr/AcOH

Moz

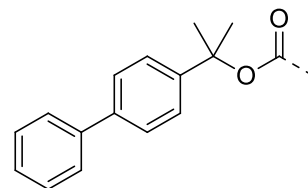
4-methoxybenzyloxycarbonyl



8 fois plus rapide que Z à déprotéger HBr/AcOH
TFA-labile

Bpoc

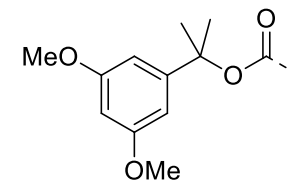
Biphenyl isopropoxyloxycarbonyl



3000 fois plus rapide que Boc à déprotéger TFA
AcOH labile

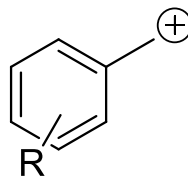
Ddz

Dimethoxybenzyl dimethyloxycarbonyl



14000 fois plus rapide que Boc à déprotéger TFA
AcOH labile et UV labile

Acidolyse facilitée



Clivage **acide favorisé** si le **carbocation** benzylique est **stabilisé**
R= électrodonneur

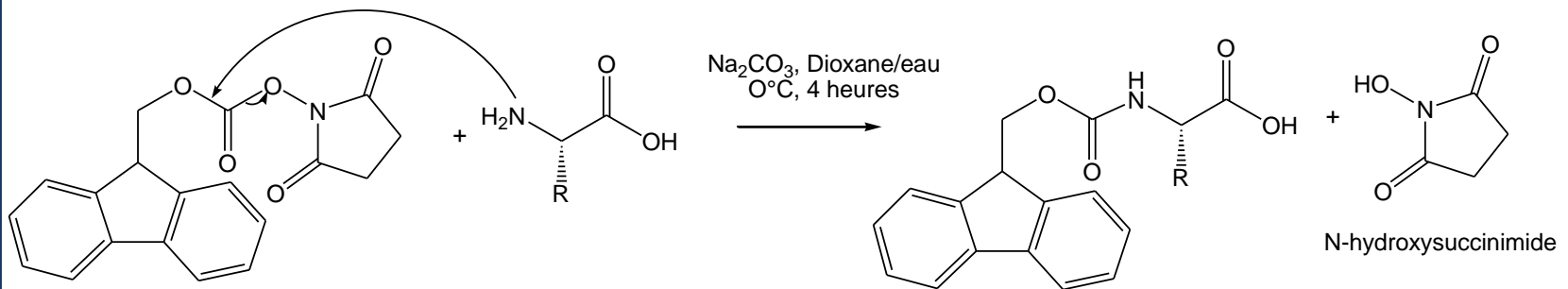
Fmoc (Fluorenylméthylxycarbonyl)

Introduction

Fmoc-Cl 9-Fluorènylméthyl chloroformate

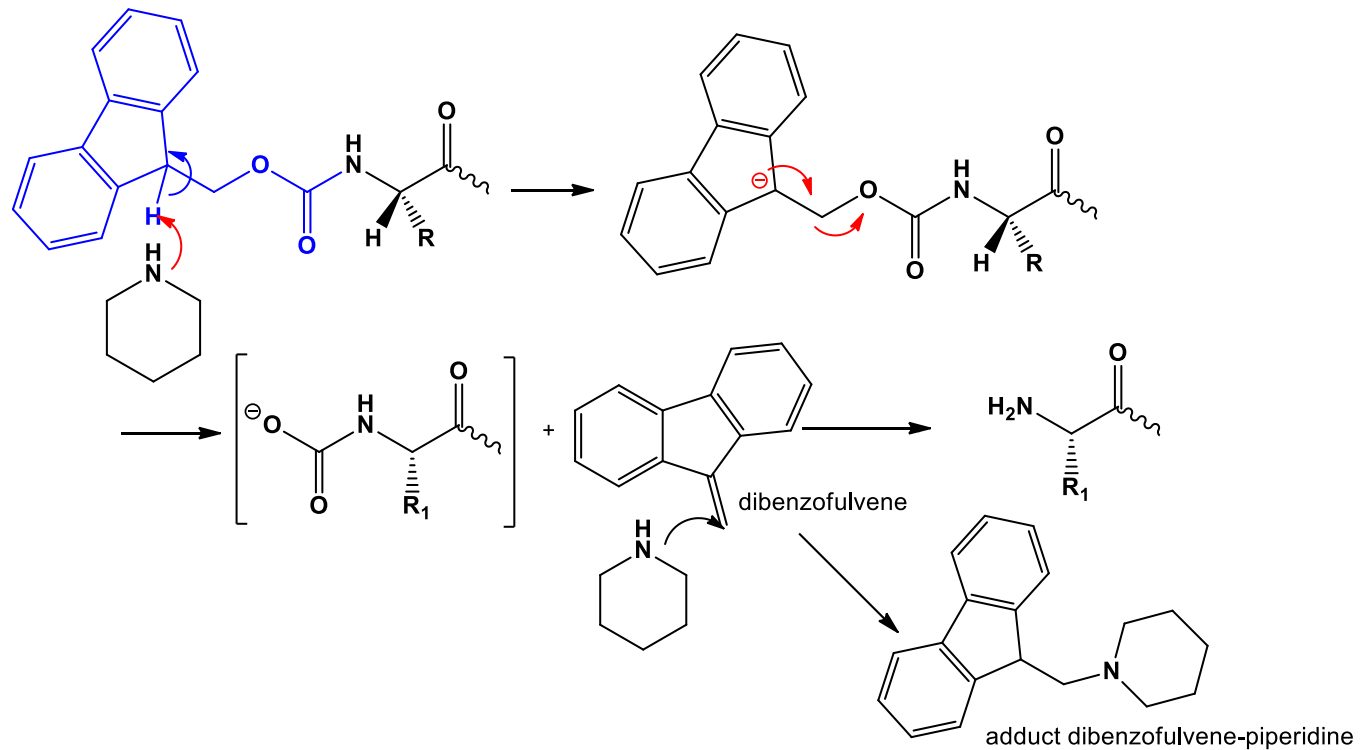
FmocOSu 9-Fluorènylméthyl succinimidyl carbonate

Ex: **Fmoc-Cl** (idem Z-Cl) ou **Fmoc-OSu**



Protection Fmoc

Élimination: amine secondaire à T°A (DEA, piperidine ...)



Stabilité aux autres amines pendant le couplage

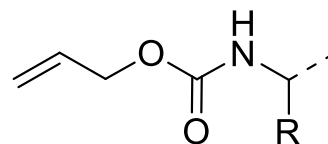
-amines I (AA) pas assez basiques

-amines III (DIEA etc...) trop encombrées

Stable: H₂, milieu acide fort (orthogonal à Z et à Boc)

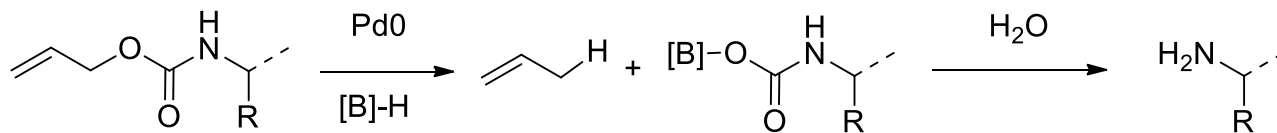
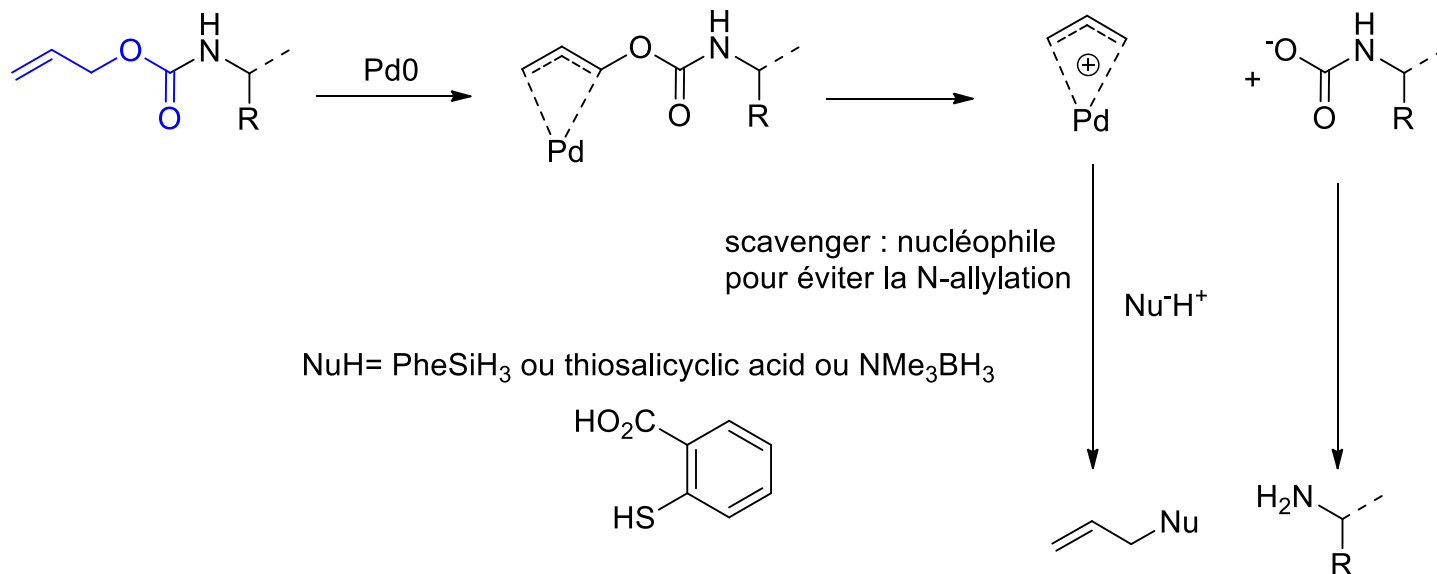
Autres protections uréthanes

Alloc (Allyloxycarbonyl)



Introduction: Alloc-Cl idem Fmoc et Z

Elimination: Pd⁰ (Pd (PPh₃)₄) en présence d'un nucléophile

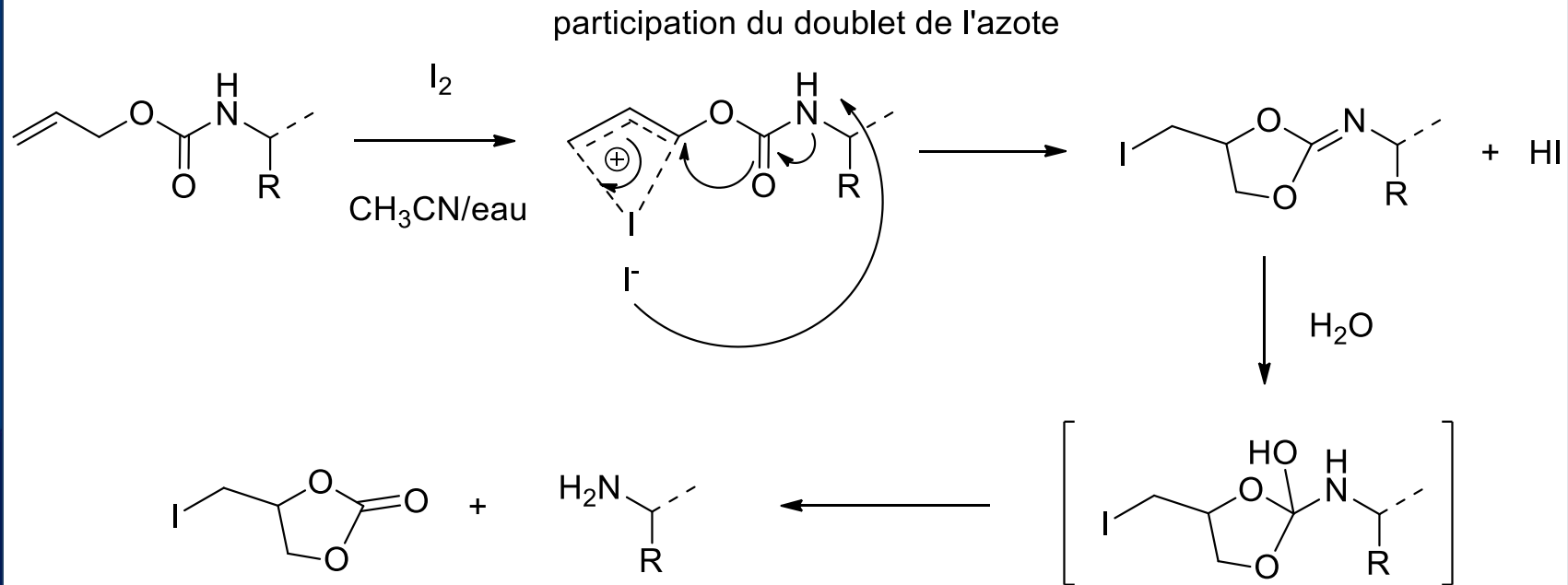


Autres protections uréthanes

Alloc

Autre élimination: I_2 en présence d'eau

Participation du doublet de l'azote: sélectivité vs ester allylique



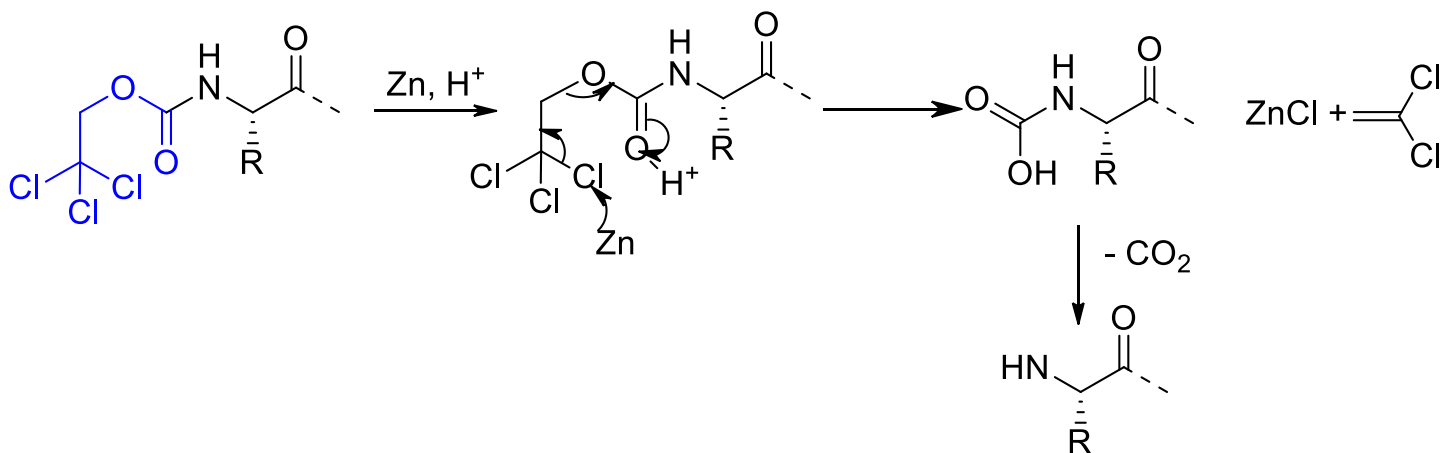
stabilité: acide, base, H_2 Pd/C: réduction de la double liaison
(orthogonal à Boc et Fmoc)

Autres protections uréthanes

Troc (Trichloroéthoxy-carbonyl)

Introduction: Troc-Cl idem Fmoc et Z

Élimination: Zn poudre dans 90% AcOH



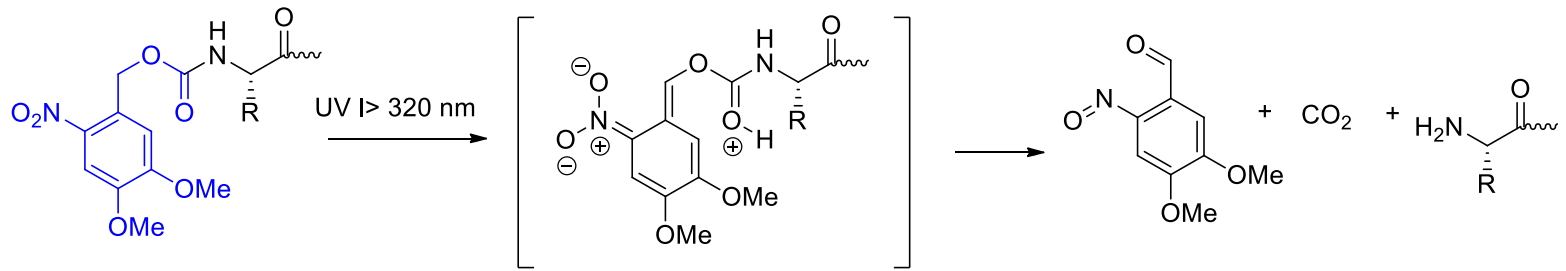
stabilité: acide, basique, instable par hydrogénolyse (mais peut être éliminé en présence de Z, Boc, Fmoc)
(orthogonal à Boc et Fmoc)

Autres protections uréthane

Nvoc (6-Nitroveratryloxycarbonyl)

Introduction: Nvoc-Cl idem Fmoc et Z

Elimination: photolyse $\lambda \geq 320$ nm

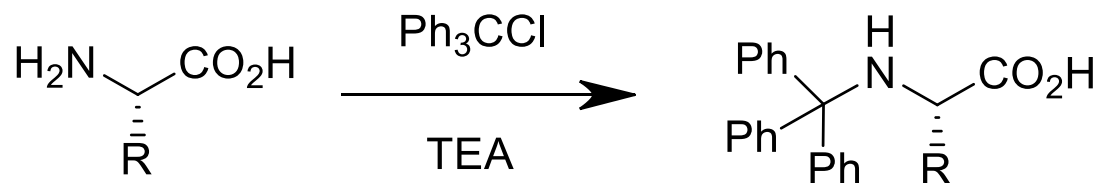


Stabilité: orthogonal à Boc, Fmoc, Trt, Alloc

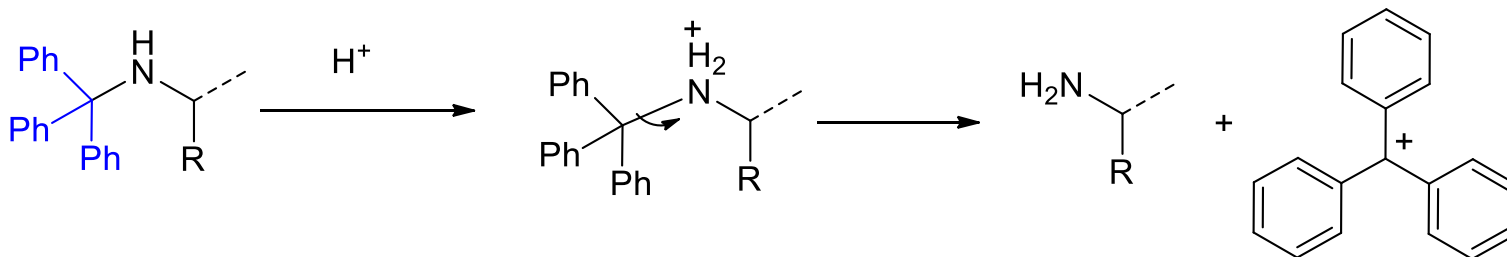
Protections non-uréthane de l'amine

Trityl (Ph₃C-) : pas de CO: pas de problème d'oxazolone

Introduction:



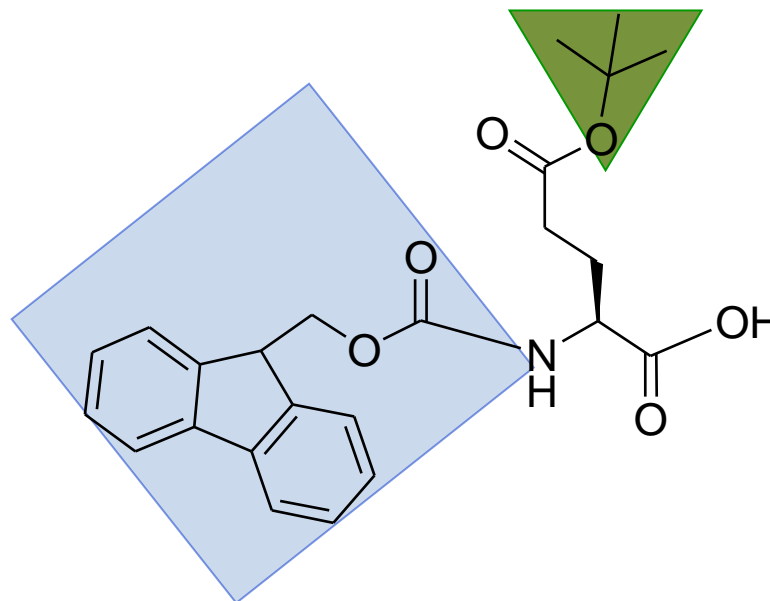
Elimination: milieu acide faible (1% TFA ou AcOH) (et évidemment fort!)



Jaune!

stabilité: basique , peu stable par hydrogénolyse
(orthogonal à Fmoc)

Protection Fmoc



temporaire

Fmoc-Glu(OtBu)-OH

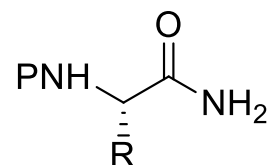
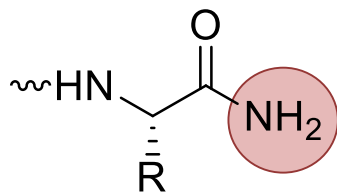
La stratégie Fmoc s'est imposée dans tous les laboratoires grâce aux support solide notamment et à la facilité et non dangerosité des traitements

Stratégie Fmoc/tBu

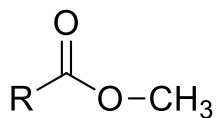
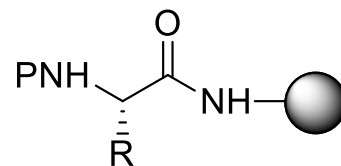
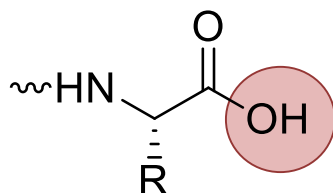
-> est entrée en production (2003 Fuzeon)

Protection de la fonction acide α

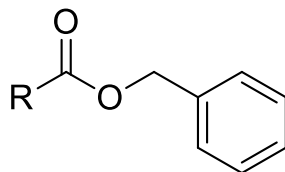
➤ Peptides amides



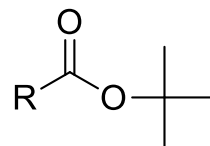
➤ Peptides acides



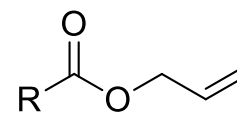
RCOOMe



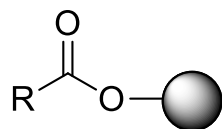
RCOOBzl



RCOOtBu



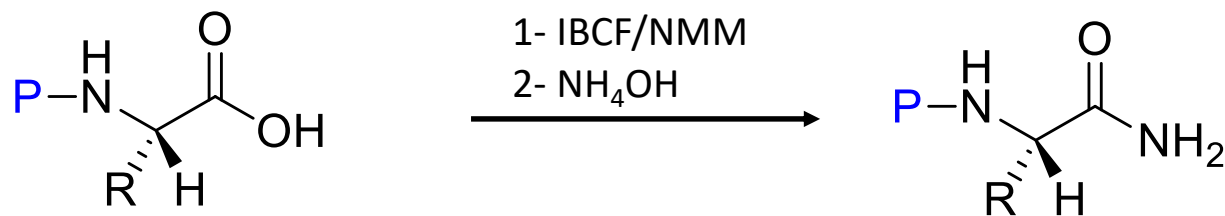
RCOOAllyl



Support solide, résine

Protection de la fonction acide C-terminale Amide

Introduction



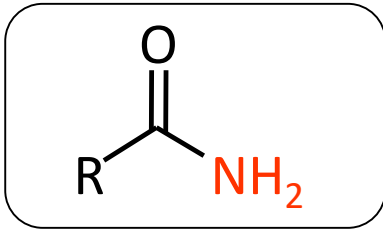
P=protection uréthane

Activation de la fonction acide puis traitement à l'ammoniaque

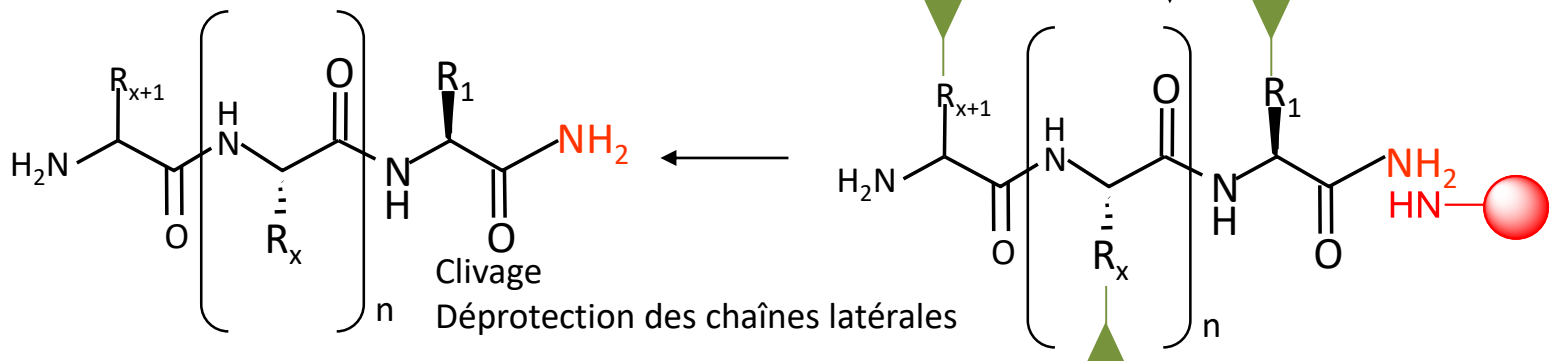
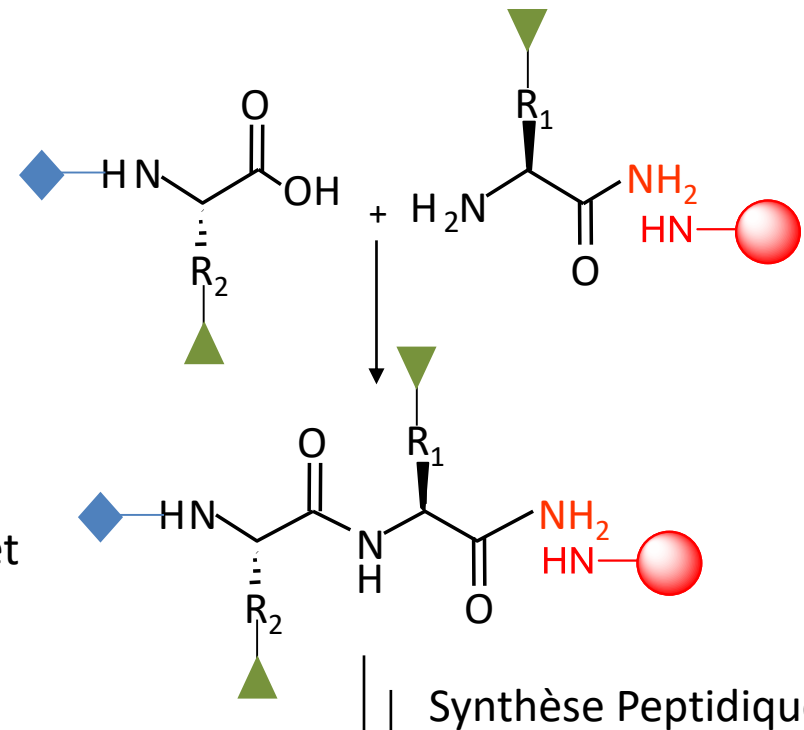
Elimination: impossible

Stabilité: totale : toutes stratégies permises

Protection de la fonction acide C-terminale Amide



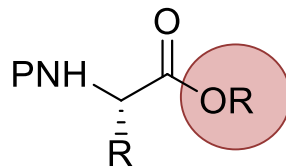
Orthogonal à toutes les protections
utilisées en synthèse peptidique:
Utilisable en stratégies Boc/Bzl, Fmoc/tBu et
Z/tBu



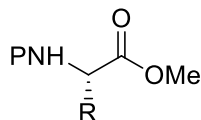
Protection de la fonction acide C-terminale

Ester

➤ Quelques esters



RCOOMe: Ester méthylique

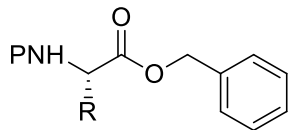


clivage : **NaOH**

risque d'épimérisation surtout avec Thr, Cys, Ser (stabilité énol)
risque de formation de DKP et d'hydantoïne

Stabilité: **milieu acide, hydrogénolyse, amines secondaires**
orthogonal à Boc, Z et Fmoc

RCOOBzl: Ester benzylique



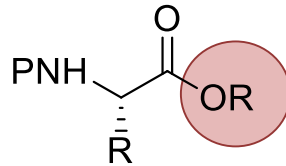
clivage : **H₂/Pd/C**

s'élimine aussi en milieu basique (NaOH) et acide fort (HBr/AcOH ou HF)

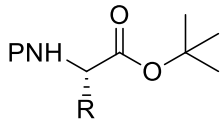
stabilité: **TFA, amines secondaires**
orthogonal à Boc, Z et Fmoc

Protection de la fonction acide C-terminale Ester

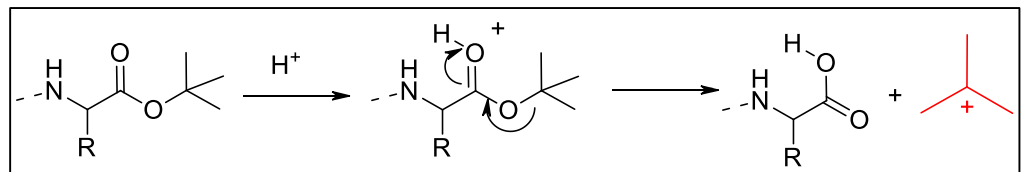
➤ Quelques esters



RCOOtBu: Ester *tert*-butylique



clivage : **TFA**
si Trp, Tyr, Met, Cys (TFA + scavengers)

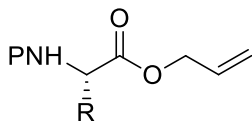


Attention : utiliser des scavengers!

Stabilité: **hydrogénolyse, amines secondaires**
orthogonal Z et Fmoc

Rm: OtBu est stable en conditions acides 'douces' : ex AcOH, 1% TFA → possible d'ôter un Bpoc, Ddz, trityl sans affecter OtBu

RCOOAllyl: Ester allylique



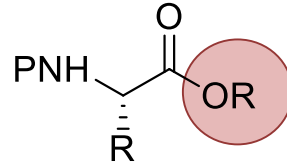
clivage : **Pd⁰ (Pd (PPh₃)₄)** en présence de **morpholine (idem Alloc)**

stabilité : **TFA, amine II** mais résiste à I₂ (contrairement à Alloc)
H₂ Pd/C: réduction de la double liaison

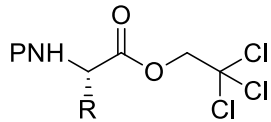
Protection de la fonction acide C-terminale

Ester

➤ Quelques esters

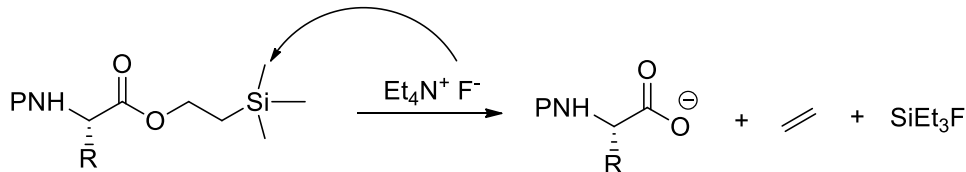


RCOOTcl: Ester trichloroéthylique



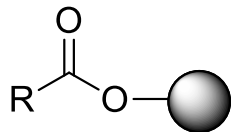
clivage : **spécifique avec Zn poudre**
même stabilité/déprotection queTroc

RCOOTms: Ester triméthylsilyléthylique



clivage : **spécifique avec F⁻**
Stabilité: **milieu acide, hydrogénolyse, amines secondaires:**
orthogonal à Boc, Z et Fmoc

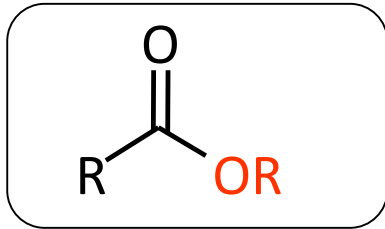
RCOO-Résine (support solide)



Support solide, résines

Protection de la fonction acide C-terminale

Esters

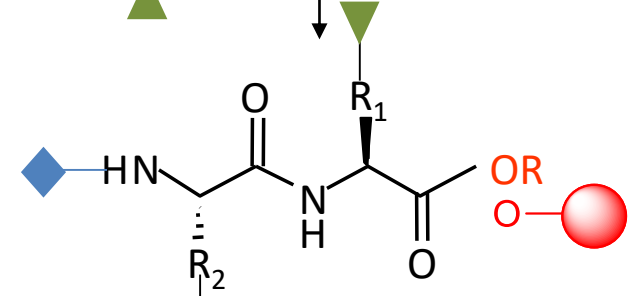
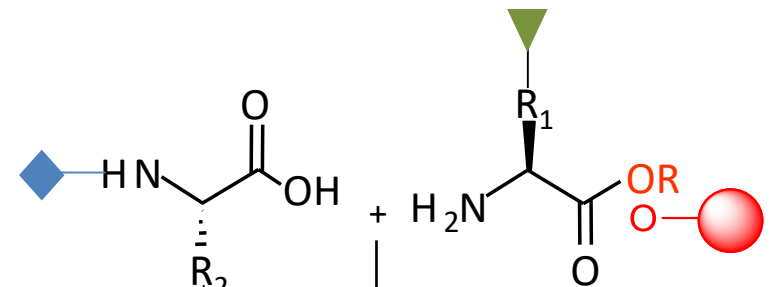


Suivant la nature de R:

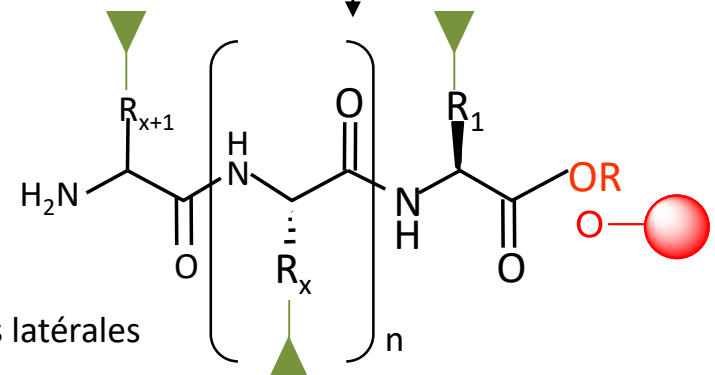
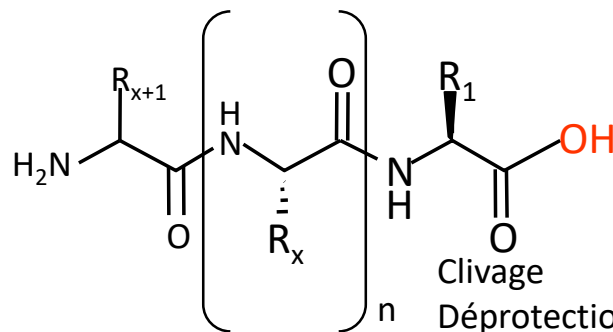
R = tBu, stratégie Fmoc/tBu ou Z/tBu

R = Bzl, stratégie Boc/Bzl

R = Me ou Et, toutes stratégies



Synthèse Peptidique

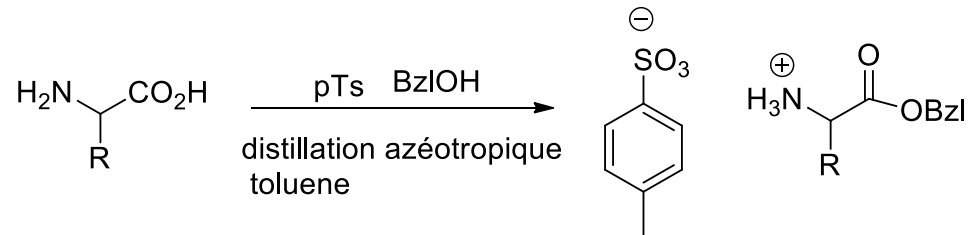


Ester Benzylique (OBzl)

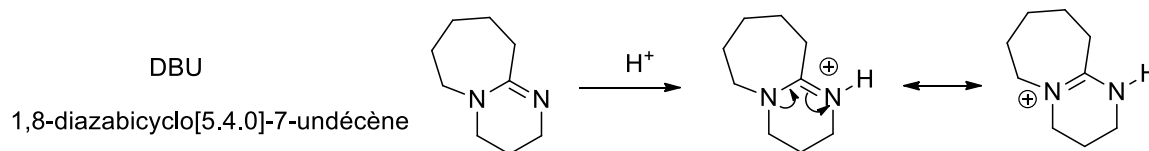
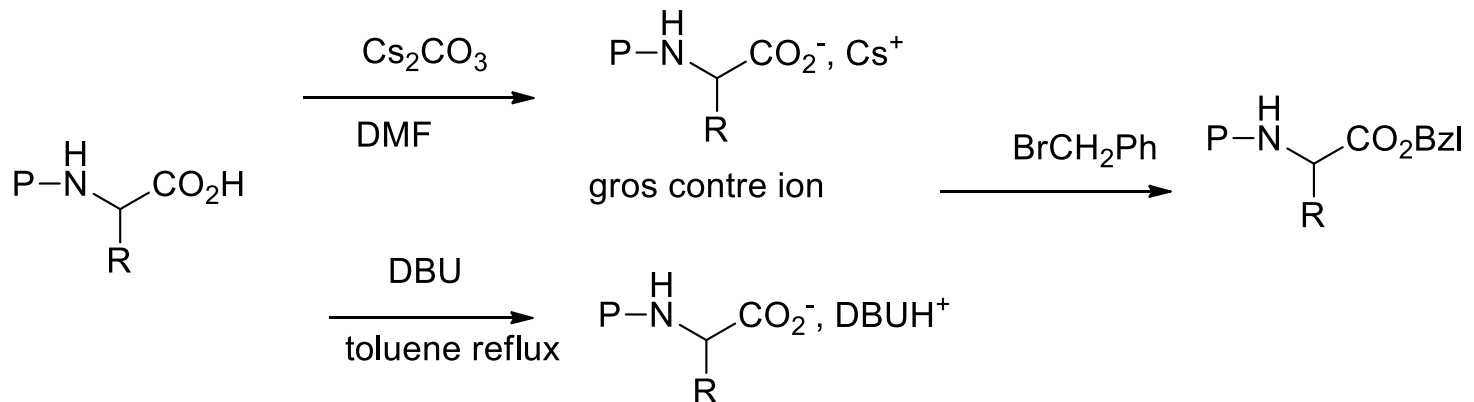
Exemples de préparation

Certains procédés sont **utilisés pour ancrage des aminoacides sur les résines alcools**

- Estérification acido-catalysée

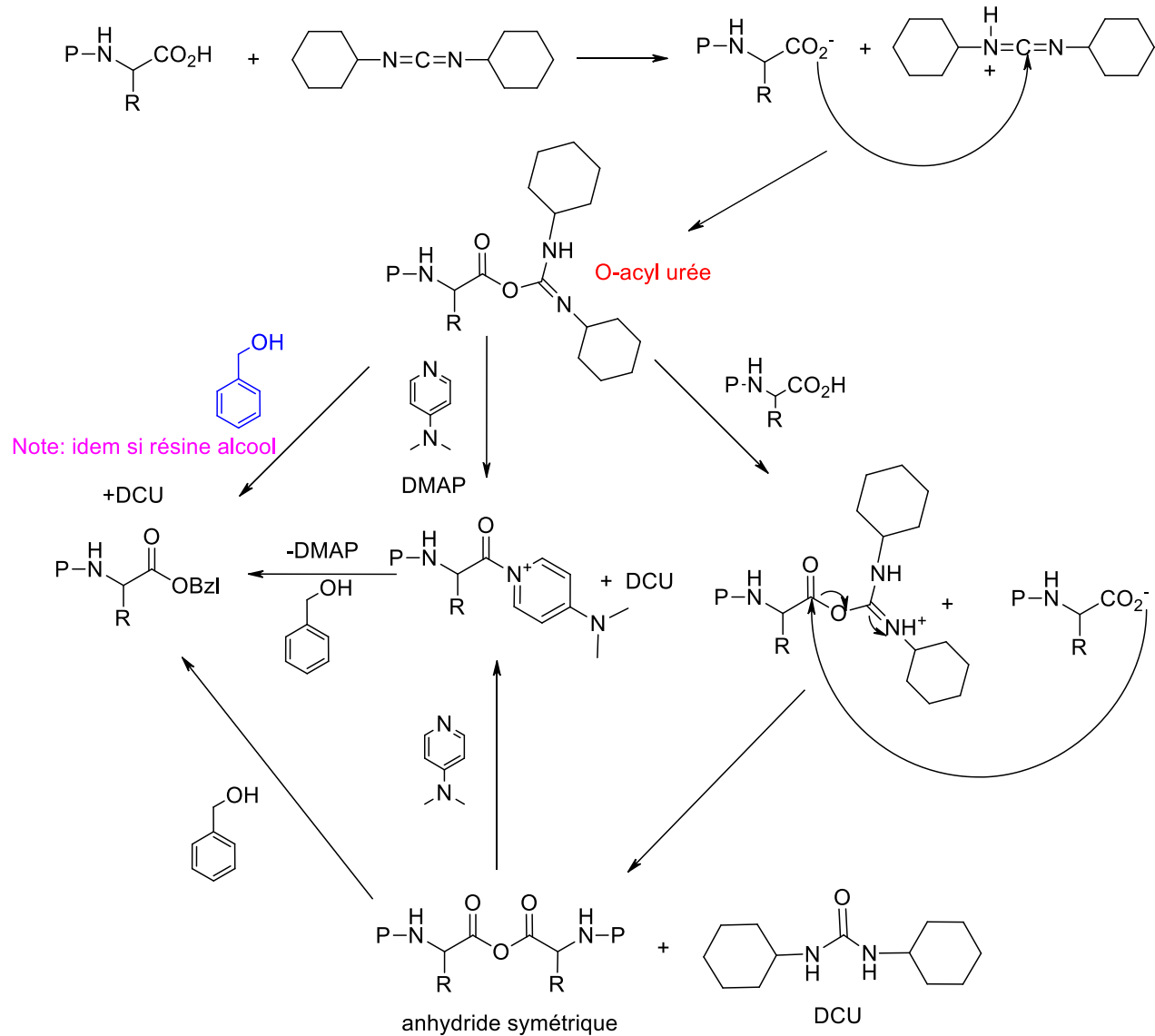


- SN avec contre ion encombré (nécessité de protéger l'amine)



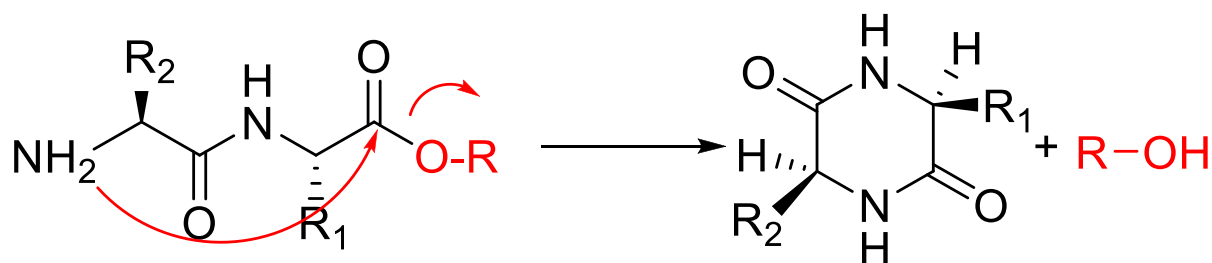
Ester Benzylique (OBzl)

• Activation de la fonction acide (DCC/DMAP)



Réactions secondaires inhérentes aux esters C-ter

Formation de dicétopipérazine



R: protection ou linker-résine

DKP favorisée :

- ✓ esters favorables aux attaques nucléophiles
OBzl et résines apparentées Merrifield, Wang, en solution OMe, OEt..
- ✓ alternance L/D (H-L-AA₁-D-AA₂-OPc),
R₁ et R₂ sont opposés par rapport au plan de la DKP.
- ✓ N-Me aminoacides
- ✓ Gly et/ou Pro
- ✓ Milieu basique pendant la déprotection (stratégie Fmoc)

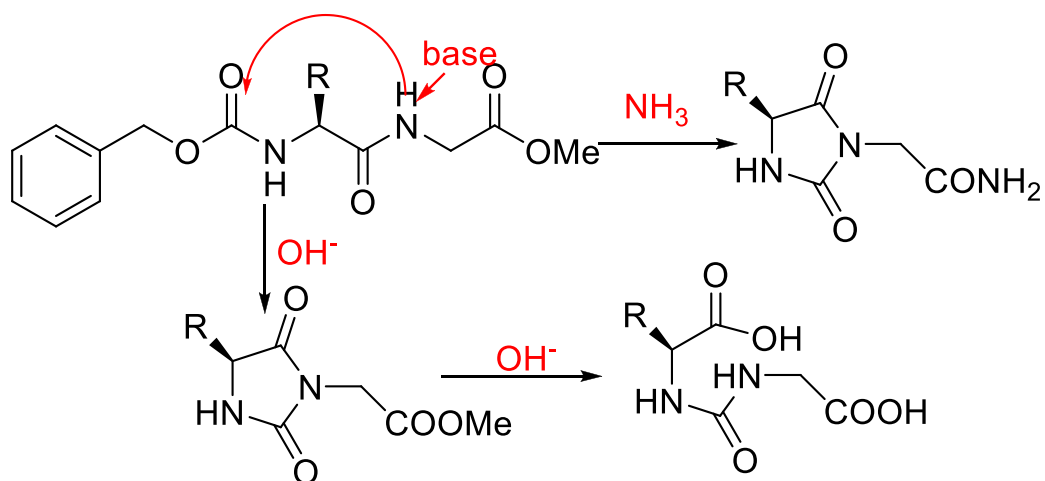
DKP évitée ou minimisée

- ✓ esters acido-labiles :
 - en phase liquide : esters OtBu
 - sur support solide : résine encombrée de type Trityl (en stratégie Fmoc)
- ✓ Si l'amine reste salifiée (stratégie Boc)
- ✓ Coupler directement un dipeptide sur le premier aminoacide (possible si Gly/Pro)

Réactions secondaires inhérentes aux esters C-ter

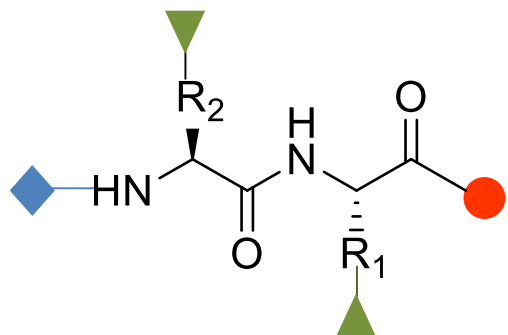
Formation d'hydantoïnes

Réaction secondaire a lieu lors de la saponification de Z-AA₁-AA₂-OMe



formation d'hydantoïne favorisée sur des séquences de type Z-AA-Gly-OMe en particulier pour AA=Trp ou Phe.

Trois stratégies en synthèse peptidique



= protection de la fonction acide
ou résine

◆ Boc / Bzl ▲

Déprotection TFA

Stable Amines, H₂

● Clivage HF anhydre

▲ HF-labiles
et résistantes au TFA

◆ Z / tBu ▲

(en solution seulement)

Déprotection à H₂ Pd/C

Stable TFA, amines

● Clivable au TFA

▲ TFA-labiles
et stables H₂ Pd/C

◆ Fmoc / tBu ▲

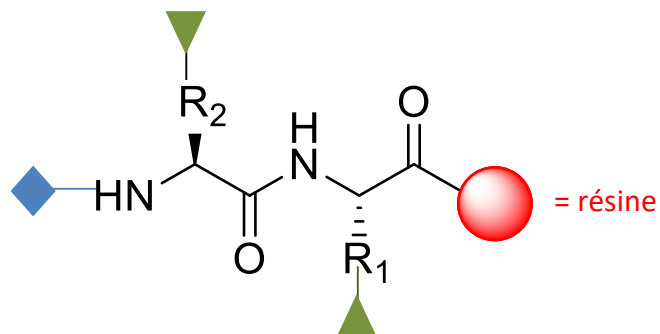
Déprotection amines II

Stable TFA, amine I,III

● Clivable au TFA

▲ TFA-labiles
et stables Amines II

Stratégies en synthèse peptidique sur support solide



◆ Boc / Bzl ▲

Déprotection TFA

Stable Amines, H₂

● Clivage HF anhydre

▲ HF-labiles
et résistantes au TFA

◆ Z / tBu ▲

(en solution seulement)

Déprotection à H₂ Pd/C

Stable TFA, amines

● Clivable au TFA

▲ TFA-labiles
et stables H₂ Pd/C

◆ Fmoc / tBu ▲

Déprotection amines II

Stable TFA, amine I,III

● Clivable au TFA

▲ TFA-labiles
et stables Amines II

Protections des chaînes latérales

Protections permanentes: elles restent en place pendant toute la synthèse peptidique.

Le type de protection dépend de la **stratégie choisie**
Fmoc/tBu, Boc/Bzl ou Z/tBu

Buts:

- **Orienter** le couplage (chemosélectivité)
 - Empêcher la racémisation par certains mécanismes
 - Empêcher les réactions secondaires pendant les déprotections
 - Empêcher les réactions secondaires pendant le **couplage**
- Dans ce dernier cas, la protection peut être **temporaire**

Protections des chaînes latérales

Chimiosélectivité : protections des chaînes latérales fonctionnalisées et réactives

Asp, Glu : β - et γ -COOH

Lys : ϵ -NH₂

Cys: nucléophilie du SH

Ser, Thr, Tyr: fonctions hydroxyle peuvent être acylées

Eviter épimérisation et certaines réactions secondaires

Arg : δ -guanidino (δ -lactame and problème de solubilité)

His: noyau imidazole (problème d'auto-racémisation lors de l'activation)

Trp: noyau indole (alkylation et oxydation)

Asn, Gln: β - et γ -CONH₂, déshydratation, formation de succinimide, glutarimide et pyroGlu

Lysine (Lys) et Ornithine (Orn)

Pourquoi protéger ?

Chimio-sélectivité $N\alpha$ versus $N\epsilon$ ou $N\delta$ pendant les couplages

Principales Protections utilisées

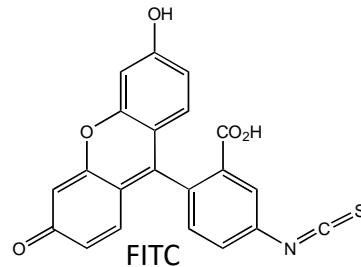
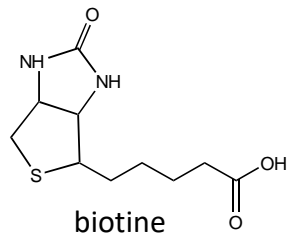
Stratégie Fmoc: **Boc**

Stratégie Boc: **Z** ou dérivé plus résistant aux acides (3ClZ ou pNO_2Z)

Stratégie Z: **Boc**

Autres protections

La chaîne latérale de la lysine peut être utilisée comme point d'ancrage pour des sondes ou des marqueurs biologiques (biotine, sondes fluorescentes...)



Il est intéressant d'introduire ces groupements en cours de synthèse mais pour ce faire il faut choisir **des protections orthogonales aux permanentes et aux temporaires utilisées!**

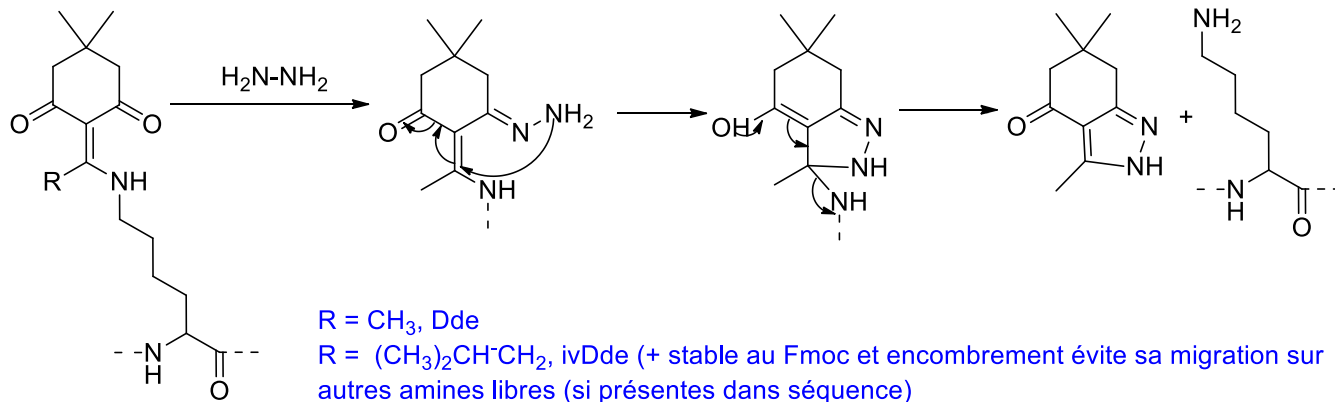
Lysine (Lys) et Ornithine (Orn)

Protections utilisées chaîne latérale:

Dde et **ivDde**: 1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)-3-éthyl/isovaleryl)

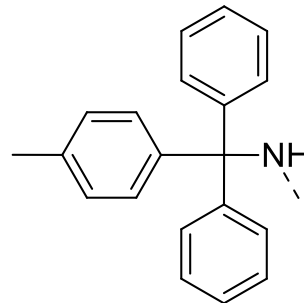
Clivage: **hydrazinolabile (2% hydrazine in DMF)**, clive aussi le Fmoc ou **hydroxylamine HCl/imidazole (1,3:1) in NMP, sélectif pour Dde versus Fmoc**

Stables 20% pipéridine et TFA



Fmoc/xDde: stratégie la plus utilisée pour la synthèse de peptides branchés, cycliques, modifiés sur chaînes latérales

Mtt: (4-Methyltrityl) **TFA 1%-labile**

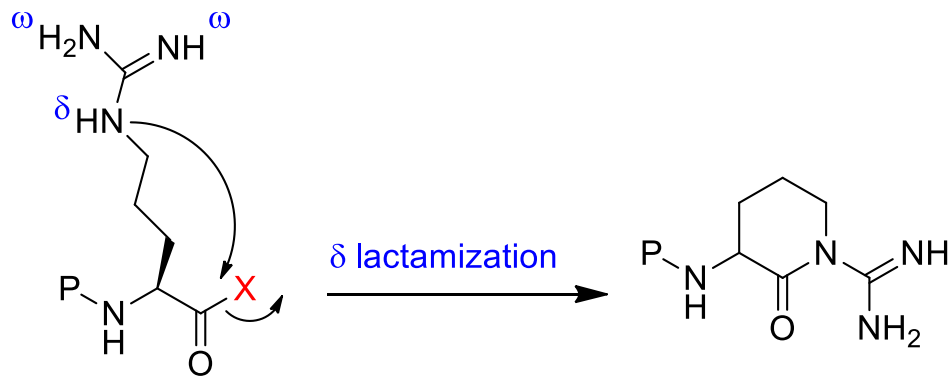


Arginine (R)

Pourquoi protéger ?

pK_a guanidine=12.5: reste protonée (non nucléophile) dans conditions de synthèse peptidique → **Peu de risque** d'acylation pdt le couplage.

Cependant, on protège pour augmenter la **solubilité** et éviter la formation de **β -lactame** pdt le couplage



Principales Protections utilisées sur l'amine ω

Stratégie Fmoc: **Pbf** (TFA)

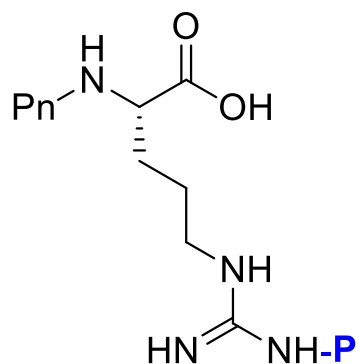
Stratégie Boc: **NO_2** ($H_2/Pd/C$ ou HF) ou **Tos** (HF)

Stratégie Z: **Pbf** (TFA)

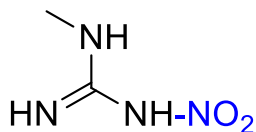
NB: si le pb de R_n secondaire persiste , il faut di-protéger δ et ω (di Boc)

Arginine (R)

Stratégie Boc: NO_2 ($\text{H}_2/\text{Pd}/\text{C}$ ou HF) ou Tos (HF)



Protection Nitro: NO_2



Nitro électroattracteur, perte de basicité

Élimination: $\text{H}_2/\text{Pd}/\text{C}$ (long et souvent incomplet) ou HF

Stabilité: HBr/AcOH , TFA , amines secondaires

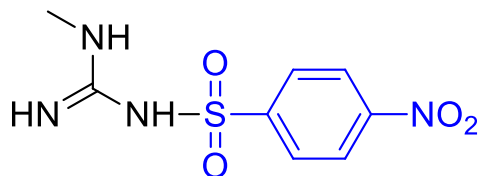
P-Arg(NO_2)OH

Ex: BocArg(NO_2)OH

Arginine (R)

Stratégie Boc: **Tos (HF)**

Protections arylsulfoniques: **Tosyl et dérivés**



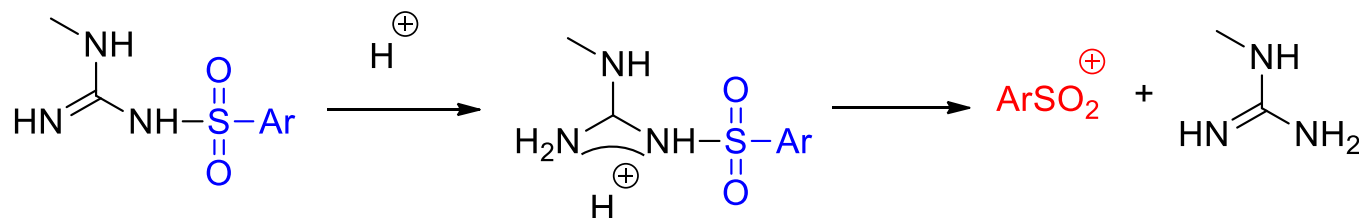
Élimination: HF (protonolyse)

Stabilité: HBr/AcOH, TFA, amines secondaires, H₂/Pd/C

P-Arg(Tos)OH

Ex: BocArg(Boc)OH

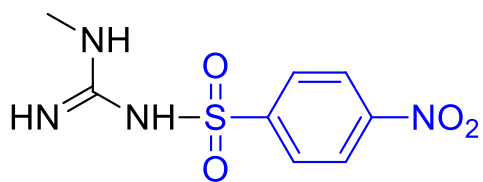
Mécanisme d'élimination: acide, libération de sulfonium



Arginine (Arg)

Protections arylsulfoniques: **Tosyl et dérivés**

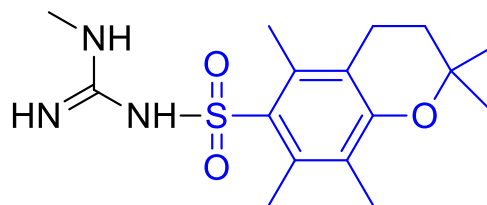
Stratégie Fmoc : Pbf (TFA)



PnArg(Tos)OH
(BocArg(Tos)OH)



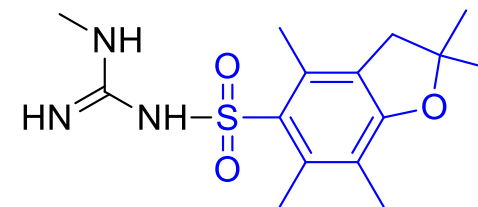
HF



PnArg(Pmc)OH
(FmocArg(Pmc)OH)



TFA



PnArg(Pbf)OH
(FmocArg(Pbf)OH)



TFA

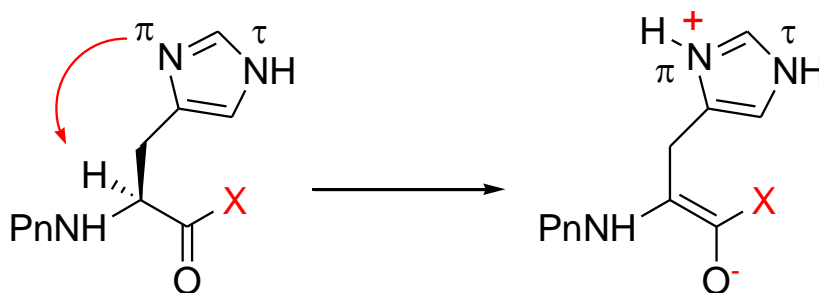


Histidine (His)

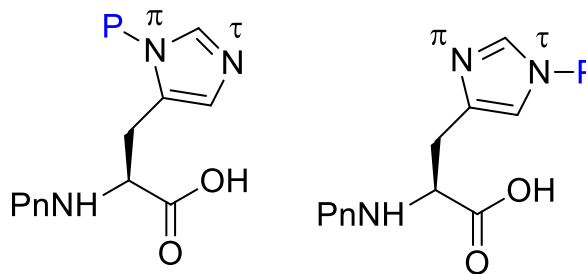
Pourquoi protéger ?

Les deux azotes de l'imidazole (π proche τ télé) ne sont pas suffisamment nucléophile pour être acylés pdt le couplage peptidique;

Mais problème d'autoracémisation lors de **l'activation** qui nécessite une protection qui n'a pas besoin d'être **permanente**



Protections sur l'azote π ou τ



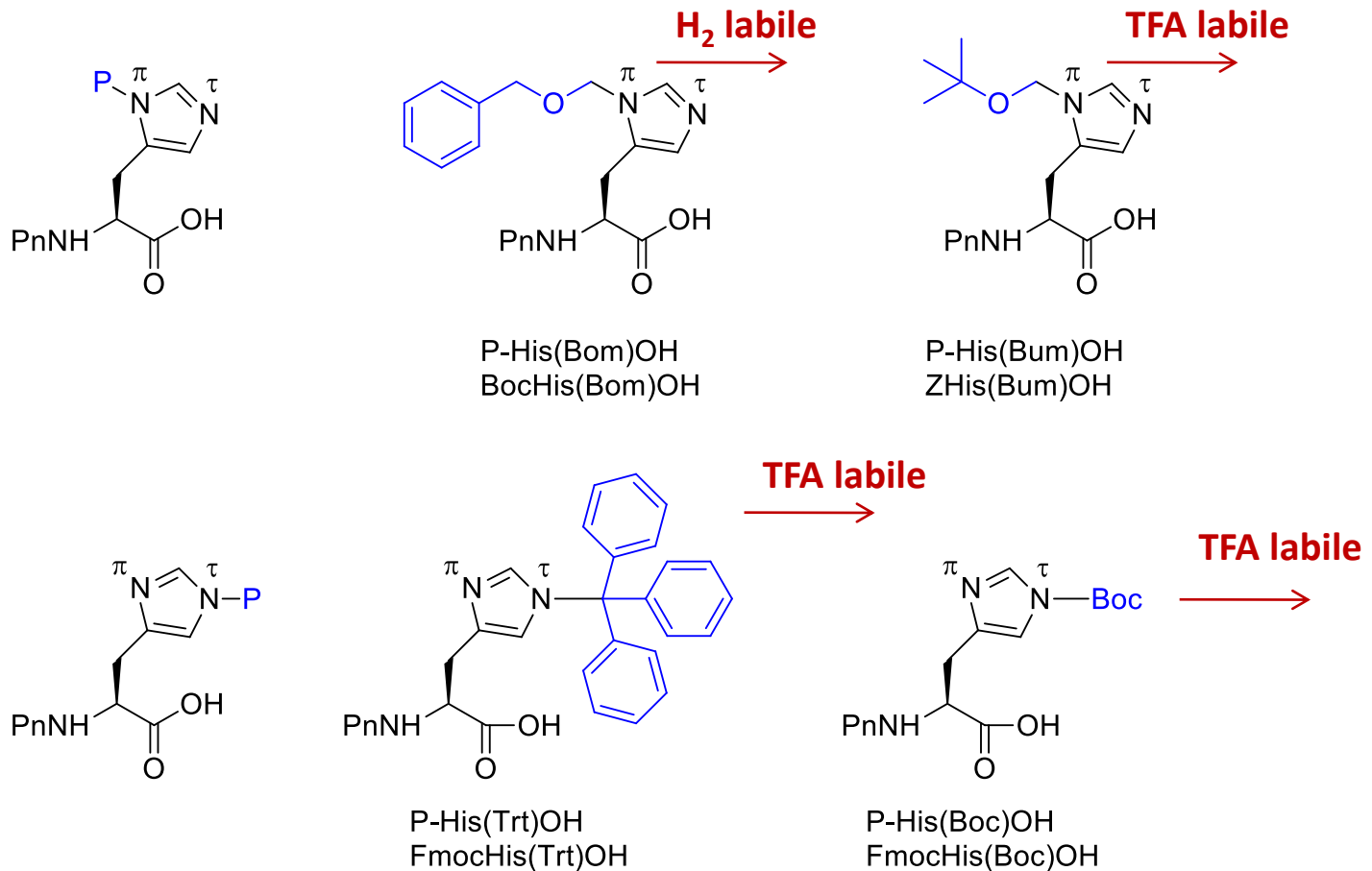
Histidine (His)

Principales Protections utilisées

Stratégie Fmoc: **Trt** (τ)

Stratégie Boc: **Trt** (τ), **Bom** (π) benzyloxyméthyl

Stratégie Z: **Bum** (π) (terbutyloxyméthyl)

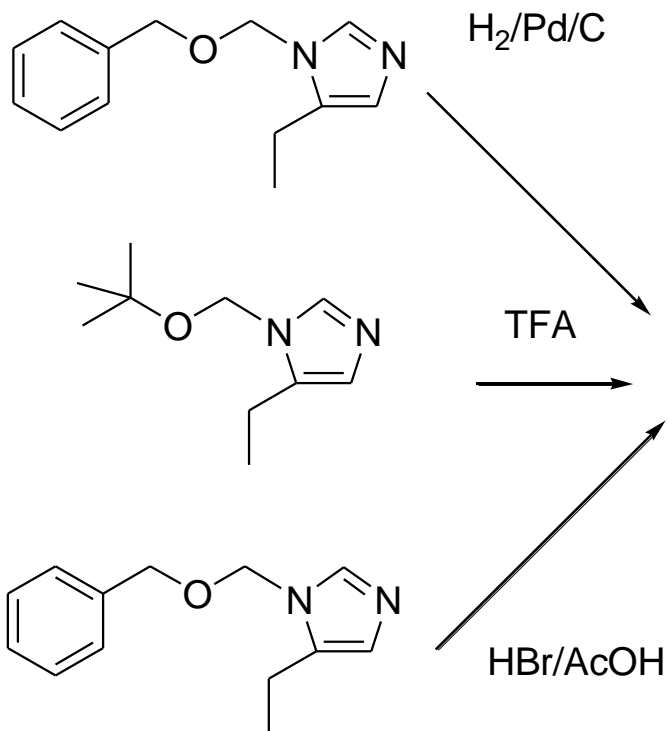


Histidine : protections Bom et Bum

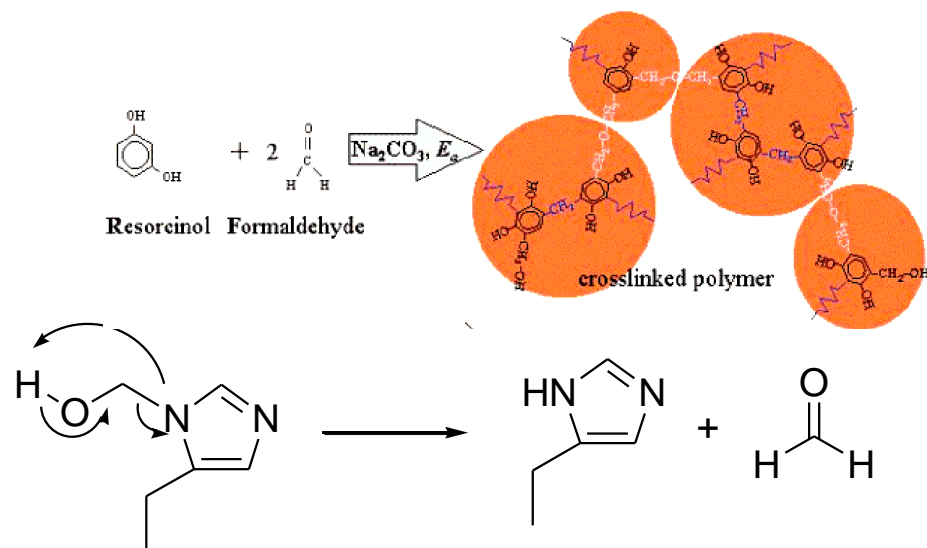
Déprotection

Bom se comporte comme Z

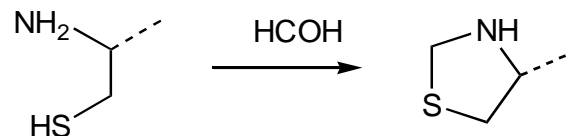
Bum se comporte comme Boc



Scavenger = résorcinol ou méthoxyamine (5 eq.)



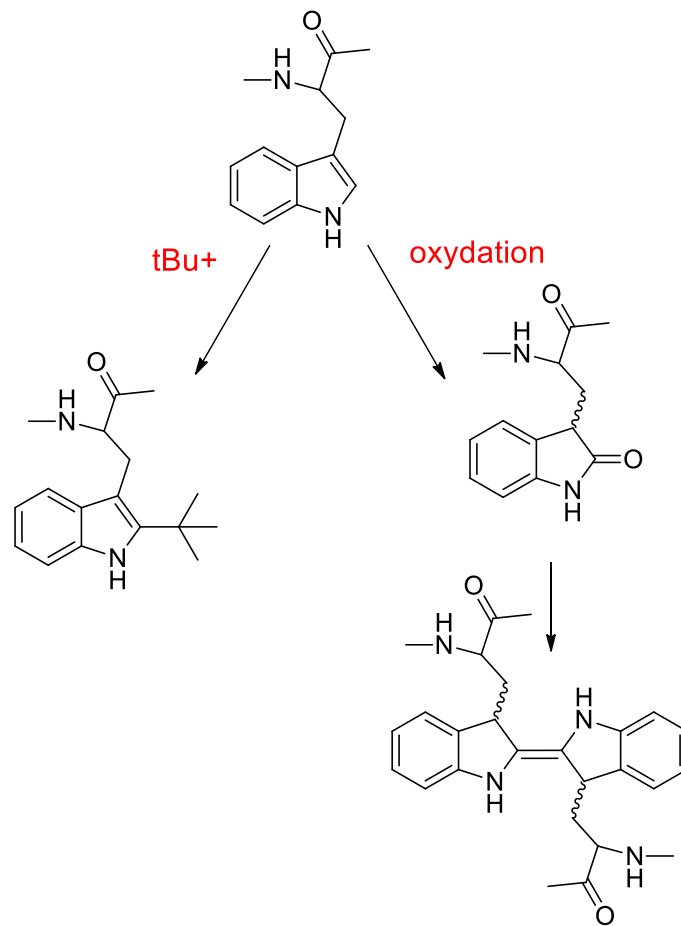
Attention: présence de **formol** qui peut réagir sur les amines libres pour former des imines ou **thiazolidines (Thz)** sur les Cys N-terminales



Tryptophane (W)

Pourquoi protéger ?

L'azote indolique est peu nucléophile: pas forcément nécessaire de protéger
Mais : **SN électrophiles** en alpha de l'azote et **oxydation** en particulier en milieu acide (TFA).



Principales Protections utilisées:

Rien

Stratégie Fmoc: **Boc**

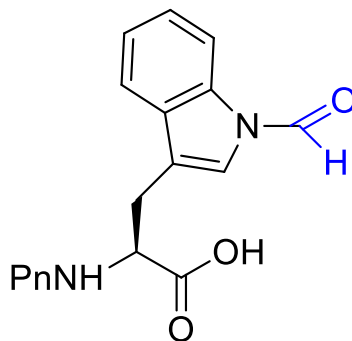
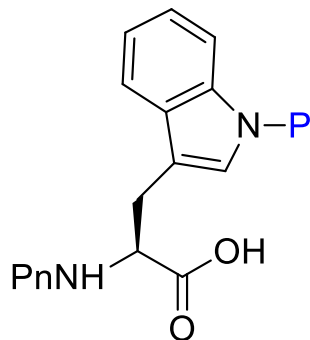
Stratégie Boc: **for (formyl)**

Tryptophane (W)

Principales Protections

Stratégie Fmoc: Boc

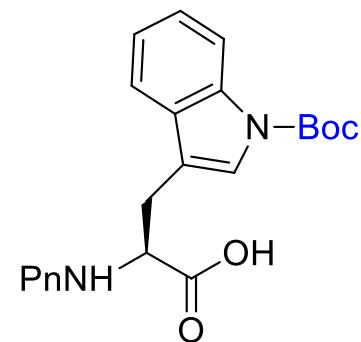
Stratégie Boc: for (formyl)



P-Trp(For)OH
Bochis(For)OH



Déprotection hydrazine ou pipéridine
ou HF/éthane dithiol



P-Trp(Boc)OH
FmocHis(Boc)OH



Déprotection TFA/scavengers

Asparagine (N) et Glutamine (Q)

Pourquoi protéger ?

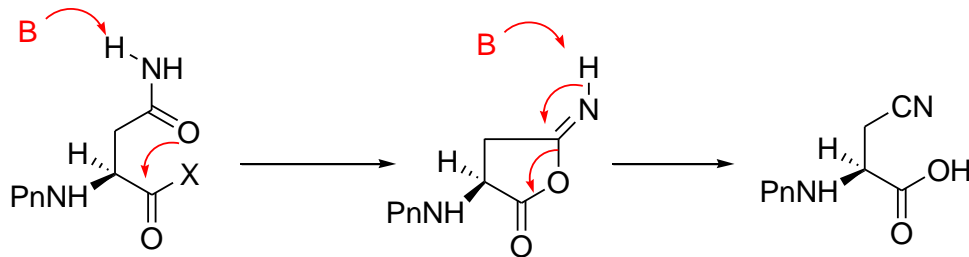
Les chaînes latérales portent des fonctions **amides**: très peu réactives.

Il n'est pas forcément **nécessaire de les protéger**.

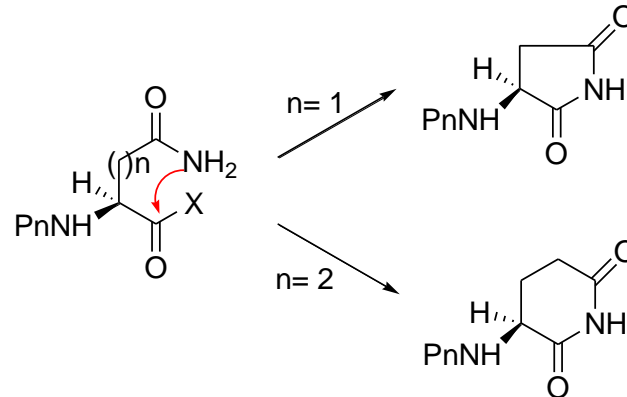
La glutamine est souvent laissée non protégée

Mais en cas d'une **activation longue** ou forte il peut y avoir **2 réactions** secondaires

Déshydratation de Asn en β -cyanoalanine



Formation d'aspartimide et glutarimide



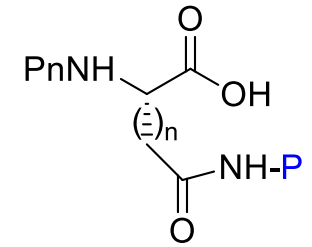
Asparagine (N) et Glutamine (Q)

Principales Protections utilisées

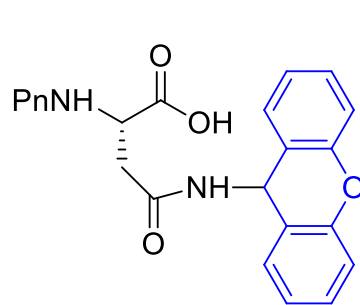
Stratégie Fmoc: **trt**

Stratégie Boc: **MBh(diméthoxybenzhydryl) ou Xan**

Stratégie Z: **MBh ou Xan**



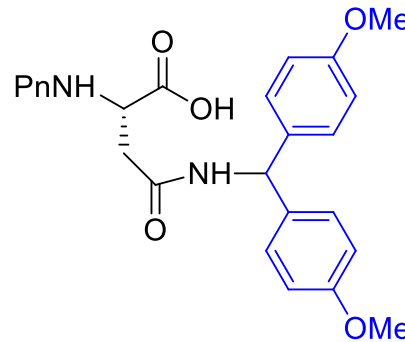
n = 1, Asn
n = 2, Gln



P-Asn(Xan)OH
BocAsn(Xan)OH



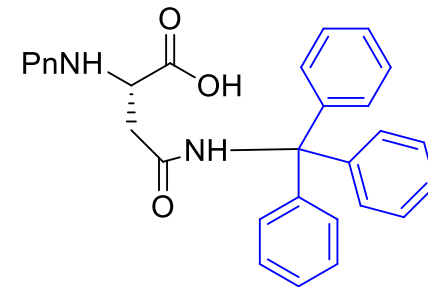
Déprotection TFA



P-Asn(Mbh)OH
BocAsn(Mbh)OH



Déprotection TFA longue



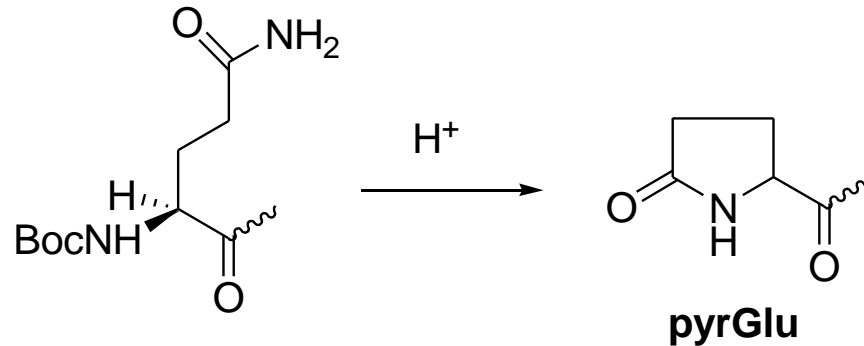
P-Asn(Trt)OH
FmocAsn(Trt)OH



Déprotection TFA

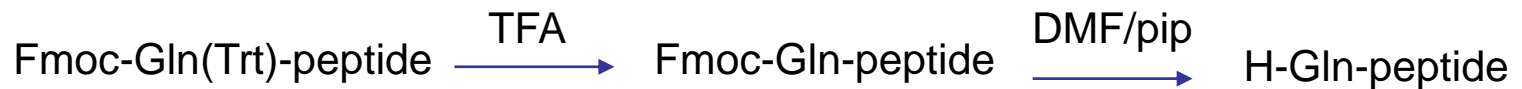
Glutamine (Gln)

Formation d'acide pyroglutamique en cas de traitement acide long ou clivage final



Pour éviter

- Stratégie Fmoc/tBu
- Pour peptide avec Gln en N-terminal: traitement acide court ou déprotection du N-terminal après le déprotection de la chaîne latérale



Sérine (Ser) et Thréonine (Thr)

Pourquoi protéger

L'alcool est moins nucléophile que l'amine mais en présence d'un excès d'acide activé il peut y avoir acylation.

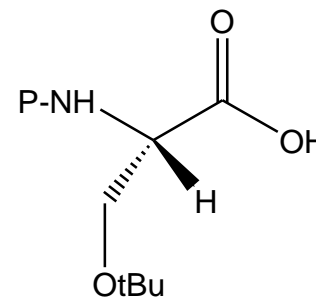
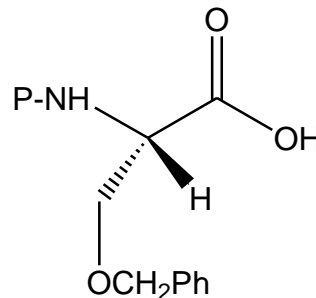
Principales Protections utilisées: éthers benzylique et tert-butylique

Stratégie Fmoc: **tBu**

Stratégie Boc: **Bzl**

Stratégie Z: **tBu**

Ex avec Ser



Stabilité: idem esters

Tyrosine (Tyr)

Pourquoi protéger

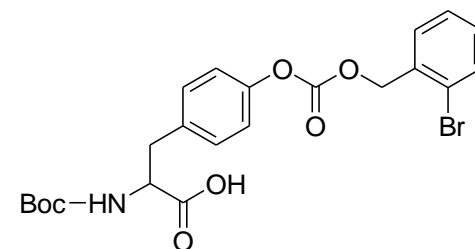
Le phénol est plus nucléophile que l'alcool sérine ou thréonine, il peut y avoir acylation.

Principales Protections utilisées:

Stratégie Fmoc: ~~tBu~~

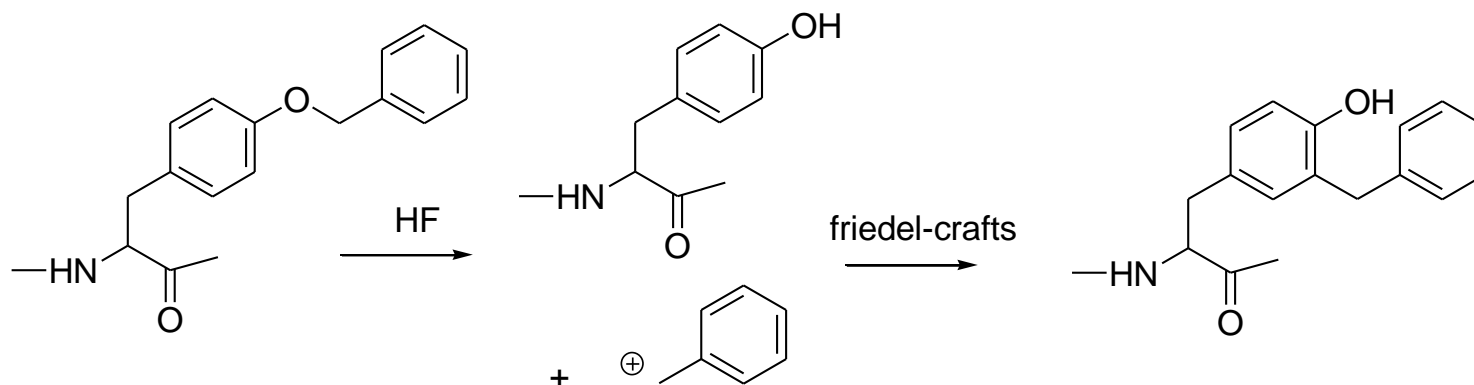
Stratégie Boc: ~~Bzl~~, Dcb (2,6 dichlorobenzyl) ou 2Br-Z

Stratégie Z: tBu



Boc-Tyr(2BrZ)-OH

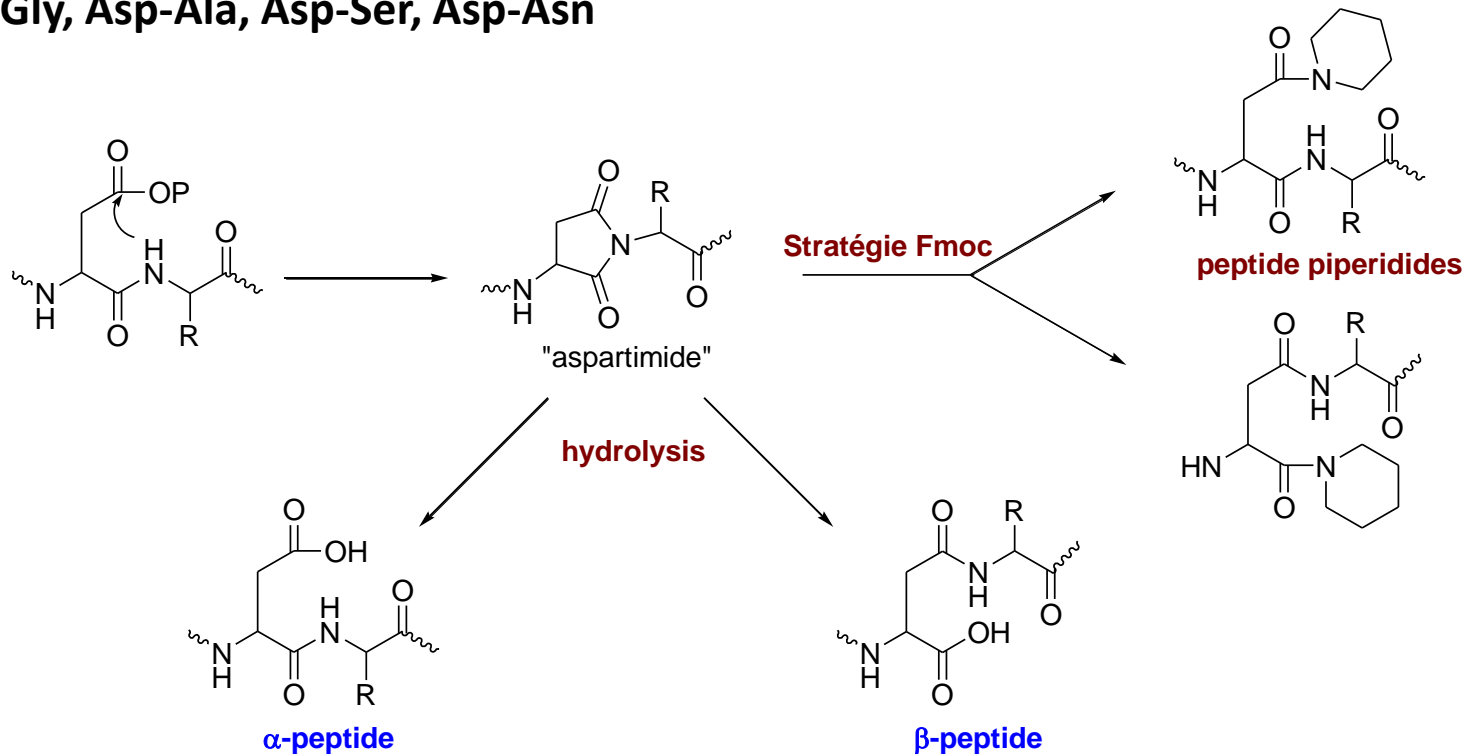
~~Bzl~~ Pb réaction secondaire



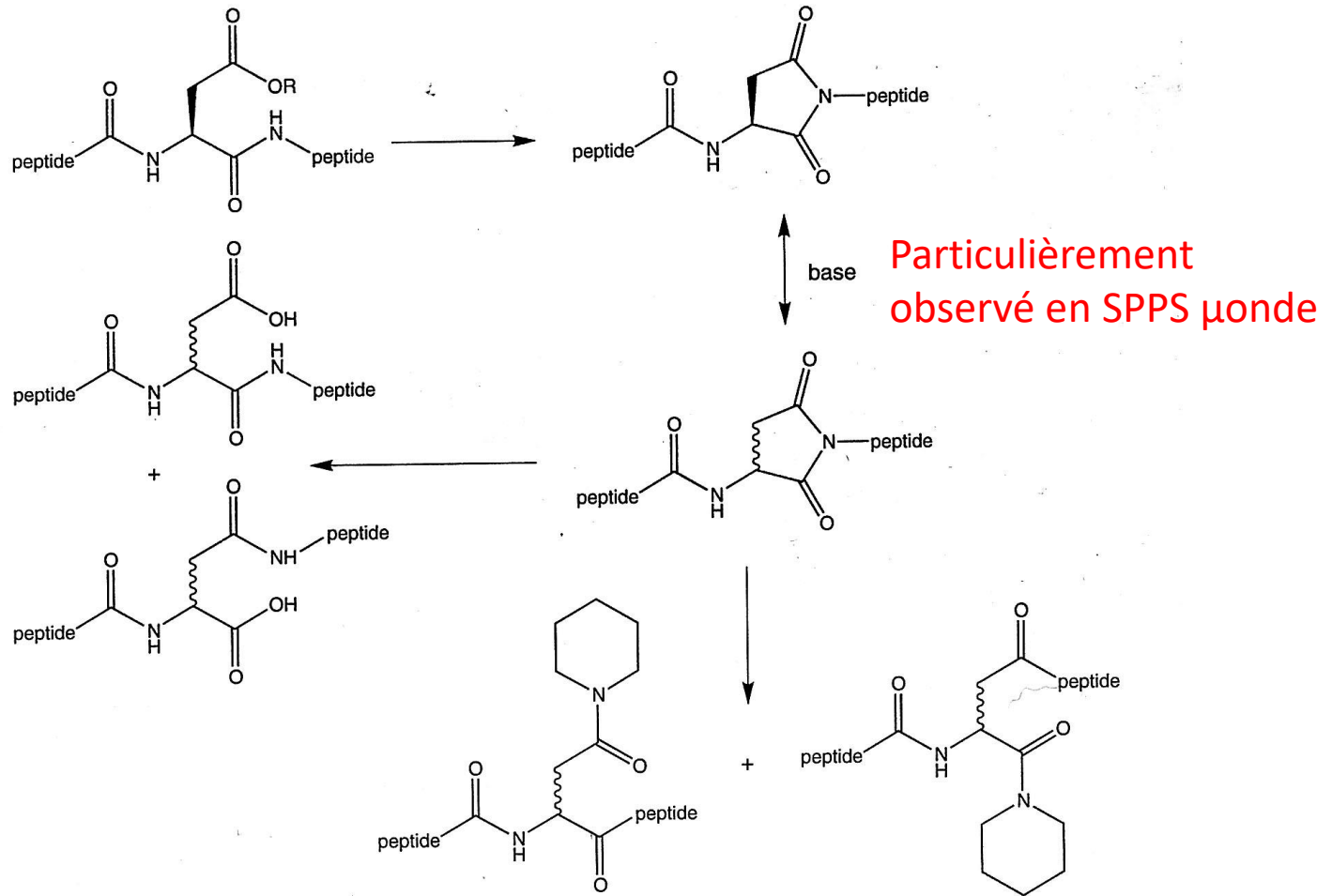
Acide Aspartique (Asp) et Glutamique (Glu)

Pourquoi protéger ?

- Sélectivité $\text{CO}_2\text{H}^\alpha$ plutôt que le CO_2H chaîne latérale pendant les couplages
- Transposition α - β Asp par formation d'aspartimide. Particulièrement problématique: **Asp-Gly, Asp-Ala, Asp-Ser, Asp-Asn**



Transposition et épimérisation en stratégie Fmoc



Solution: utiliser les bonnes protections, utiliser 10% piperazine 0,1M HOBT

Lauer et al. *Letters in peptide Science* 1995, 1, 197

Palasek et al. *J. pep. Sci.* 2007, 13, 143-148.

Acide Aspartique (Asp) et Glutamique (Glu)

Principales Protections utilisées pour Asp

Stratégie Fmoc: **OtBu** (mauvais groupe partant: peu de transpo)

Stratégie Boc: **Ochx** (mauvais groupe partant: pas de transpo)

Stratégie Z: **OtBu** (mauvais groupe partant: peu de transpo)

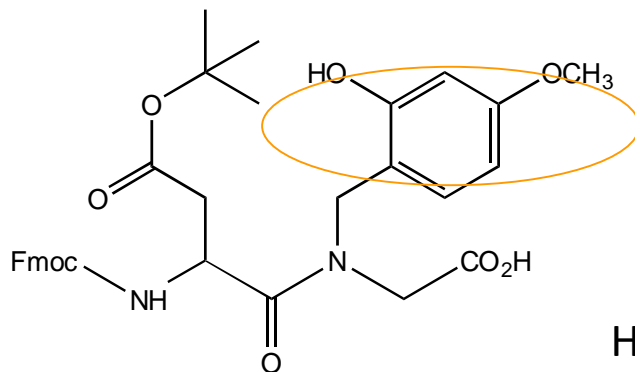
Principales Protections utilisées pour Glu

Stratégie Fmoc: **OtBu**

Stratégie Boc: **OBzl**

Stratégie Z: **OtBu**

Pour éliminer totalement le problème (séquence Asp-Gly en stratégie Fmoc)



Fmoc-Asp(OtBu)-(Hmb)Gly-OH

Hmb:2-hydroxy 4-méthoxy benzyl

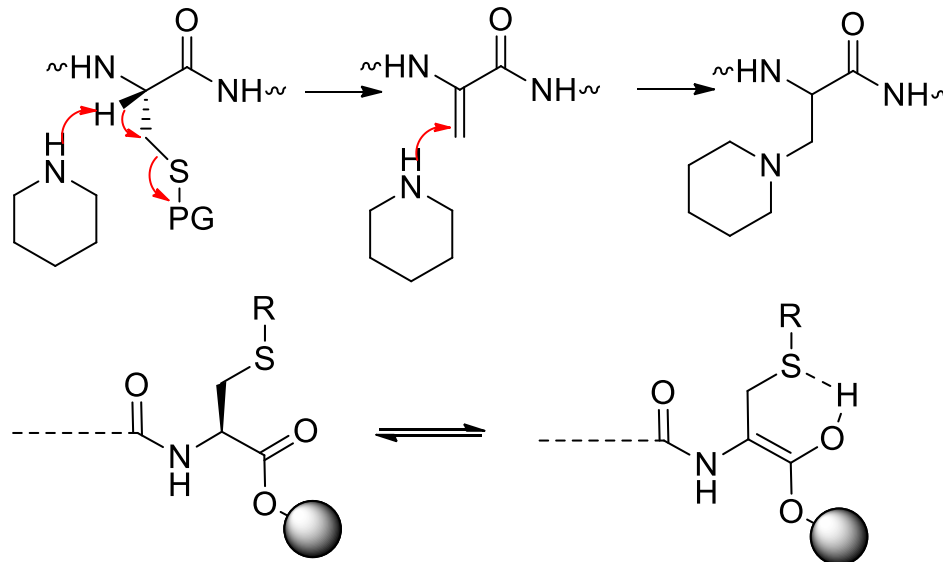
Cystéine (C)

Pourquoi protéger ?

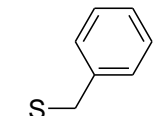
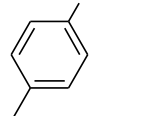
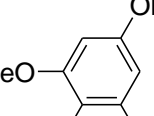
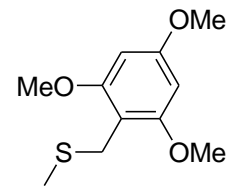
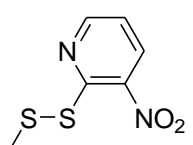

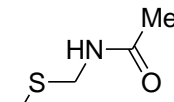
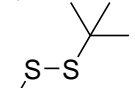
- **SH nucléophile**: risque de S-acylation ou de S-alkylation (carbocations)
- **Formation de ponts S-S** non désirés
- Cys même protégée est sujette à **l'épimérisation** lors des couplages et ancrage au support solide, et si ester du coté C-ter pendant les traitements basiques (ex: Wang, Trt en Fmoc/tBu SPPS)

Rm: le niveau d'épimérisation dépend aussi des groupements protecteurs de Cys avec par ex $S^t\text{Bu} > \text{AcM} > \text{Trt}$

Mécanismes épimérisation



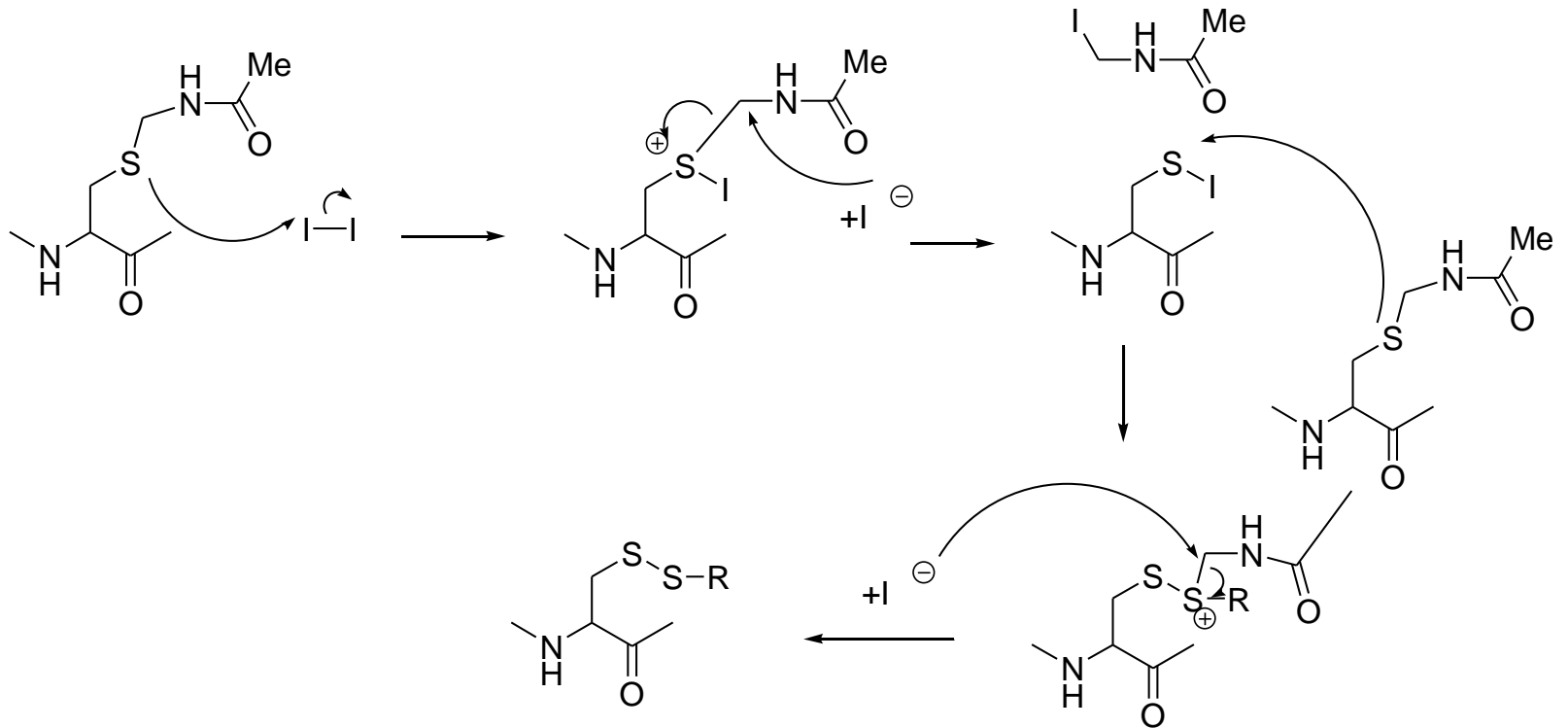
Cystéine (C)

	I ₂	TFA	HF 0°C	HF 25°C	base	R-SH
	-	-	-	+	-	-
	-	-	+	+	-	-
	-	-	+	+	-	-
	+	+	+	+	-	-
S-trt ou						
	-	-	-	-	-/+	+
Npys Nitropyridine sulfhydryl	-	-	-	-	+	-
						
Acm 	+DMF	-	-	-	-	-
StBu 	-	-	+/-	-	-	-
S-butyl sulfamyl						

Éliminé par réduction

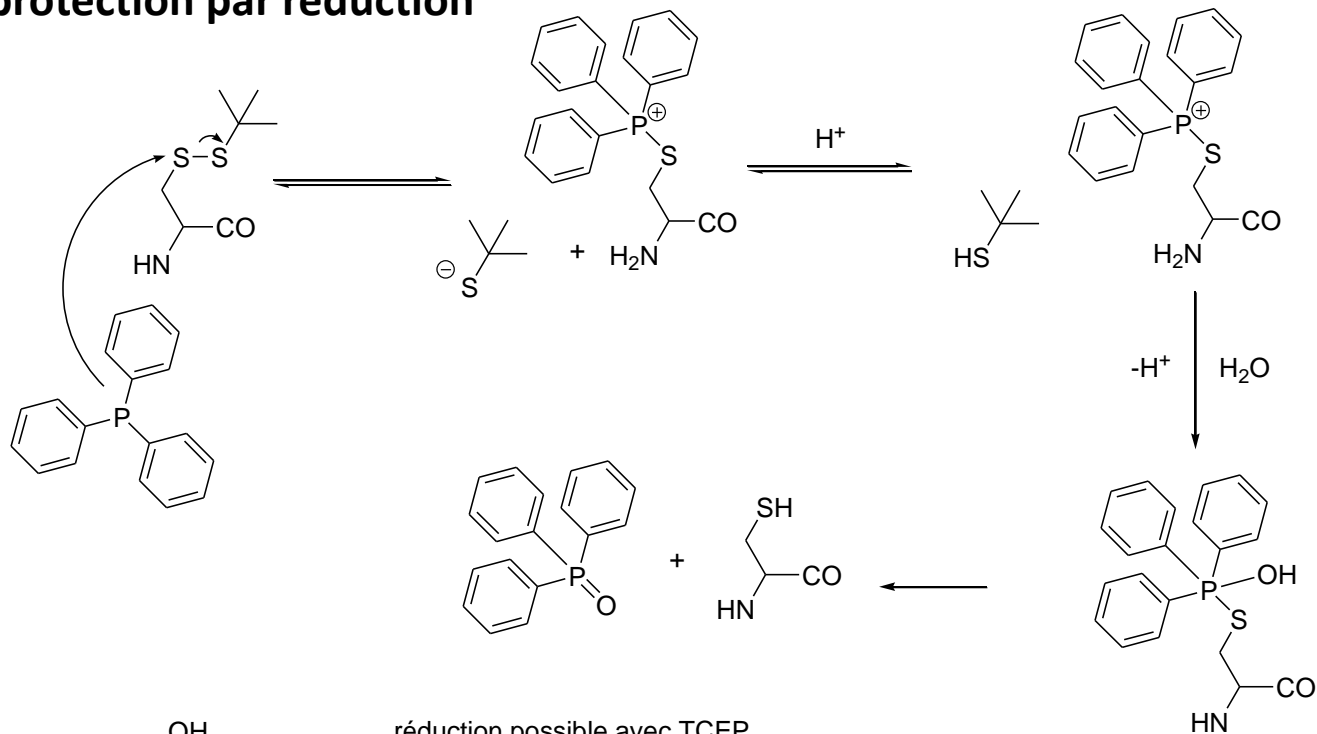
Cystéine (C)

Déprotection à l'iode

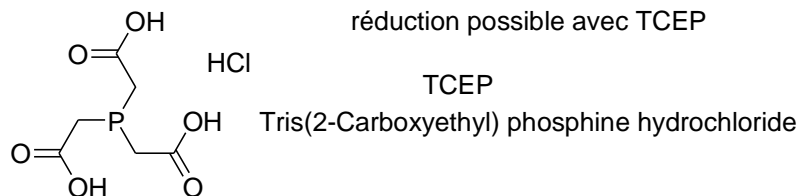


Cystéine (C)

Déprotection par réduction

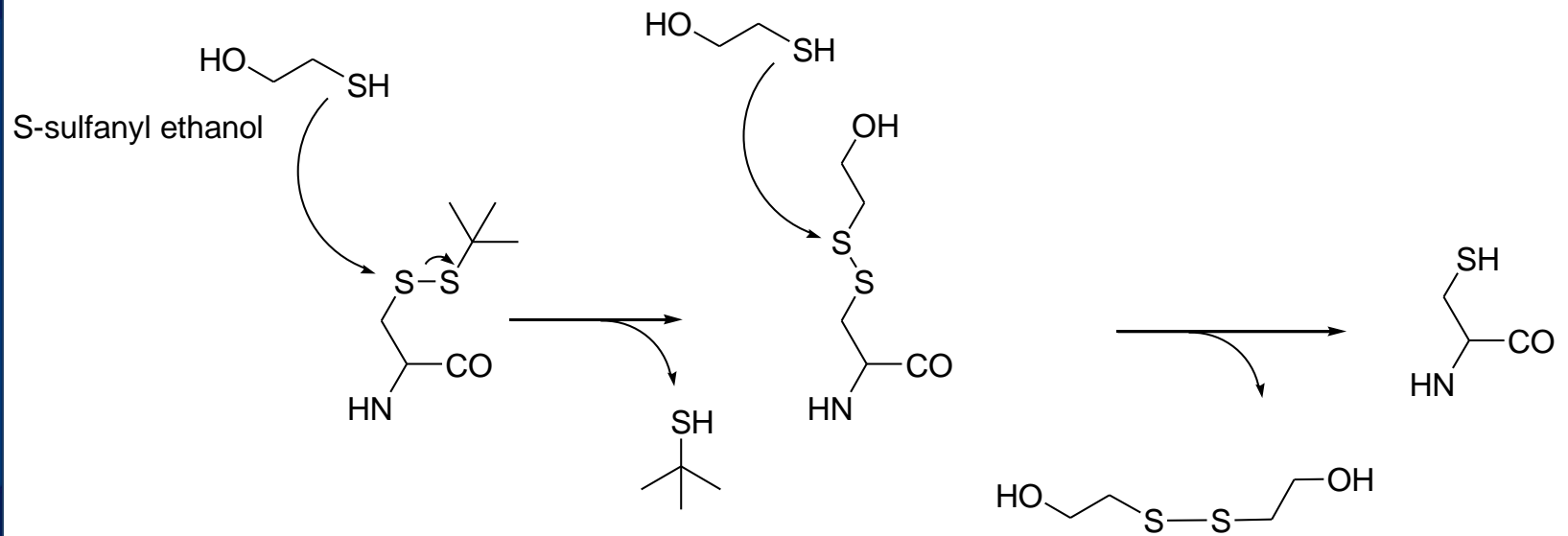


réduction possible avec TCEP



Cystéine (C)

Déprotection par réduction



Cystéine (C)

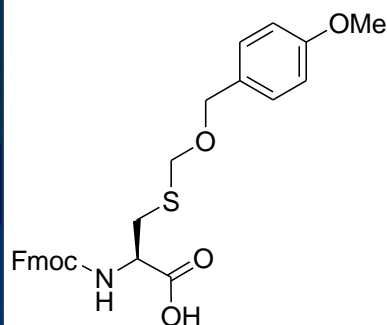
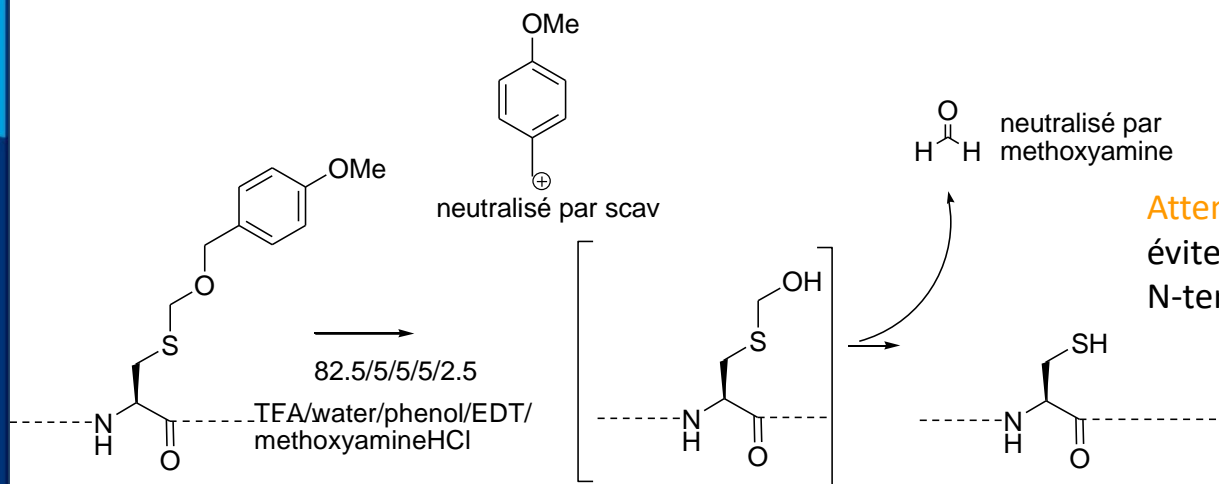


Table 2. Racemization during Synthesis of the Model Peptide, Gly-Cys-Phe-NH₂, as a Function of the Cys Protecting Group^a

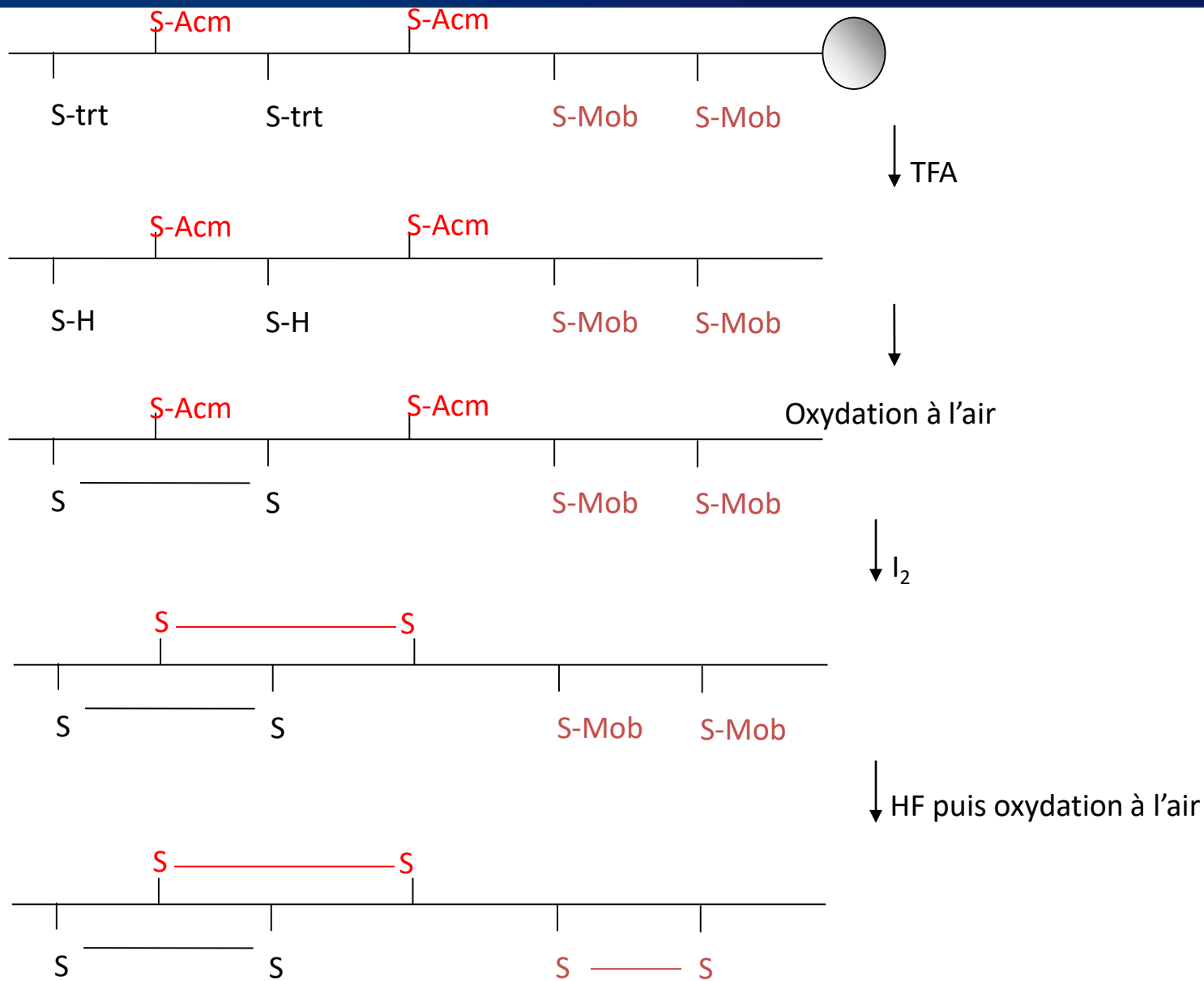
X	racemization (%) ^b		
	conventional	microwave 50 °C	microwave 80 °C
Trt	8.0	10.9	26.6
AcM	4.8	8.8	15.3
MBom	0.4	0.8	1.3

^a The coupling reactions were performed using a 1-min preactivation procedure of coupling with Fmoc-amino acid/HCTU/6-Cl-HOBt/DIEA (4/4/4/8 equiv) in DMF. ^b Defined as $(\text{Gly-D-Cys-Phe-NH}_2)/(\text{Gly-L-Cys-Phe-NH}_2) \times 100$. More details can be found in the Supporting Information.



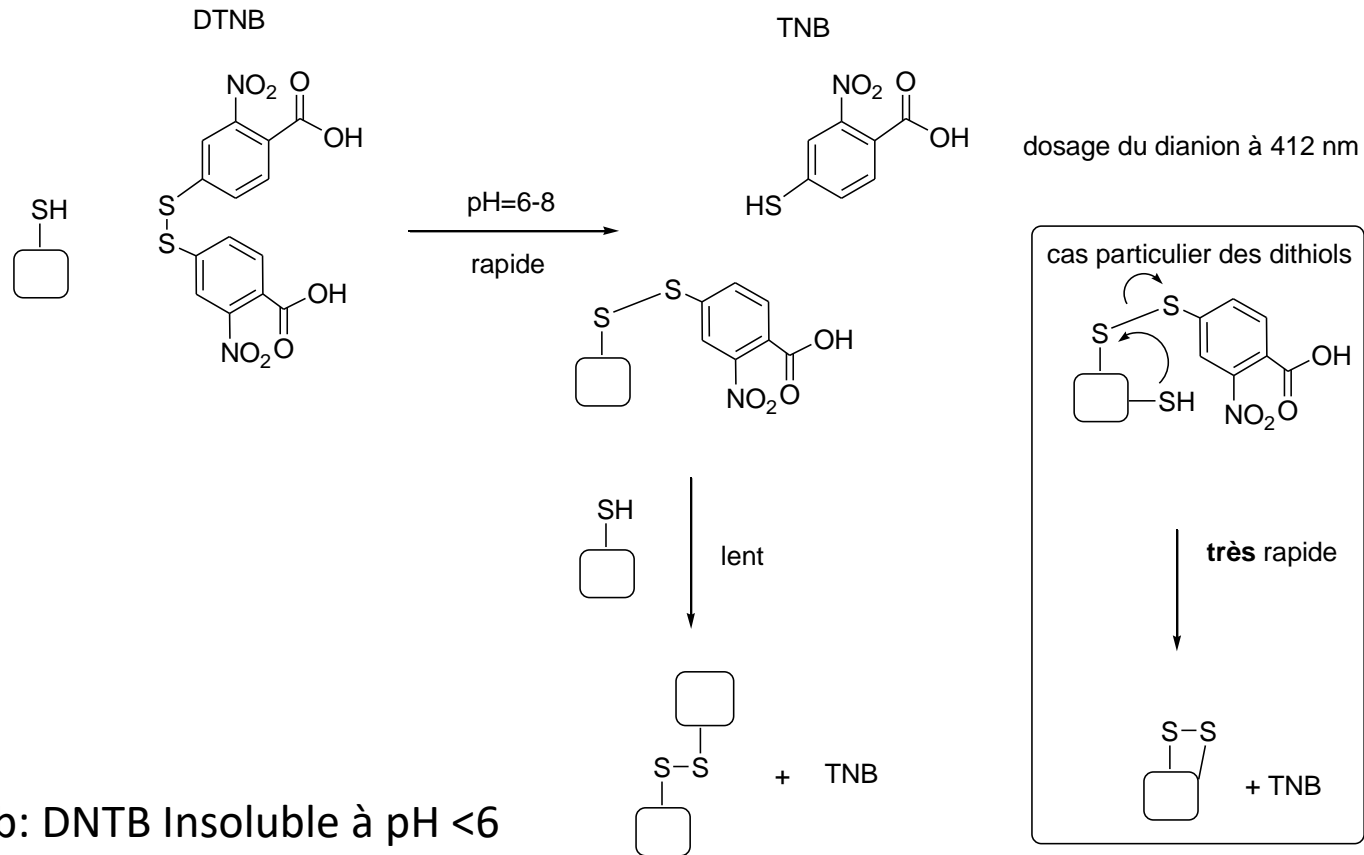
Attention: utiliser des scavengers éviter thiazolidines (Thz) sur les Cys N-ter et les réactions de benzylation

Formation séquentielle et dirigée de ponts SS



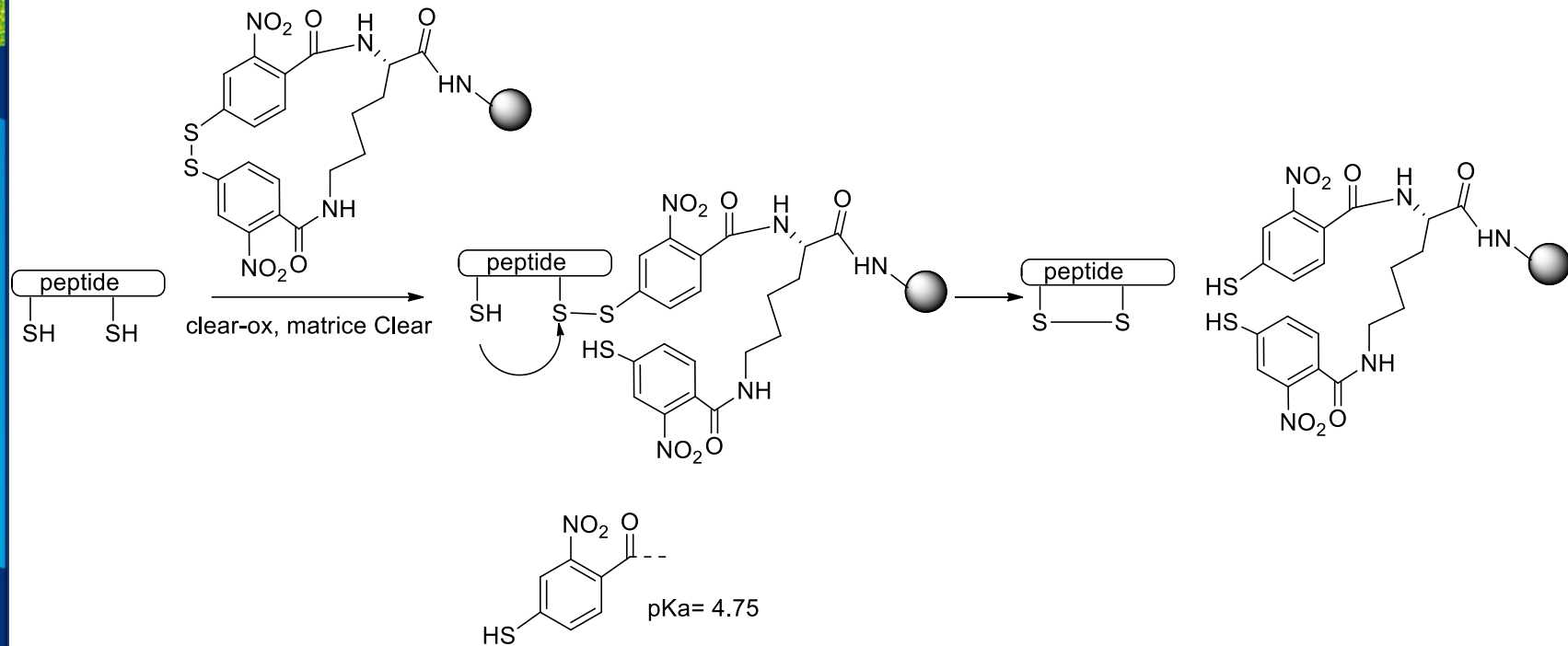
Dosage des thiols libres au DTNB (réactif d'Ellman)

5,5'dithiobis(2-nitrobenzoic acid)



Réactif d'oxydation supportés pour la formation des ponts disulfures

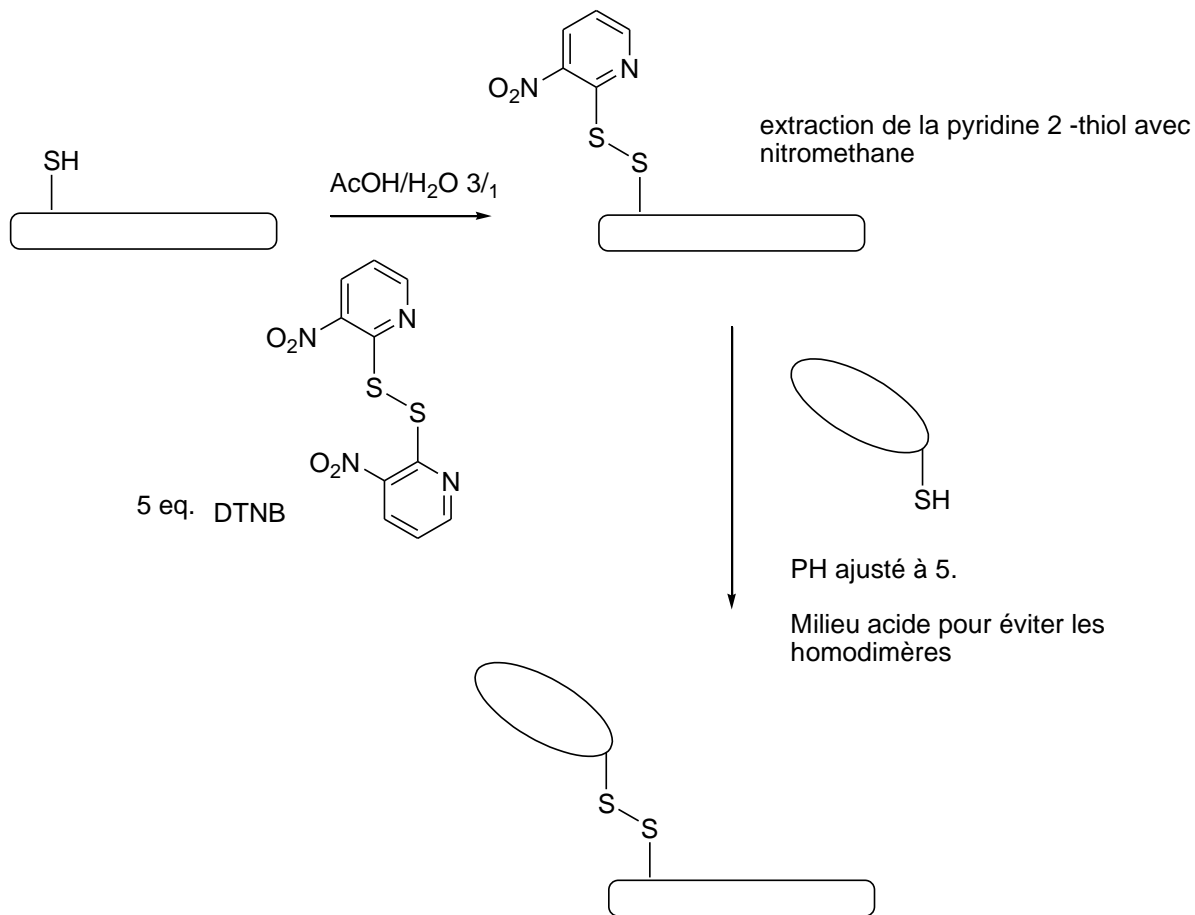
Les oxydants supportés classiques entraînent des réactions secondaires (Met, Trp, Tyr)



thiolate stable: l'échange de thiol est facilité

Réactif d'Ellman supporté :
plus de pb de solubilité à pH faible
régénération possible I_2 ou K_3FeCN_6

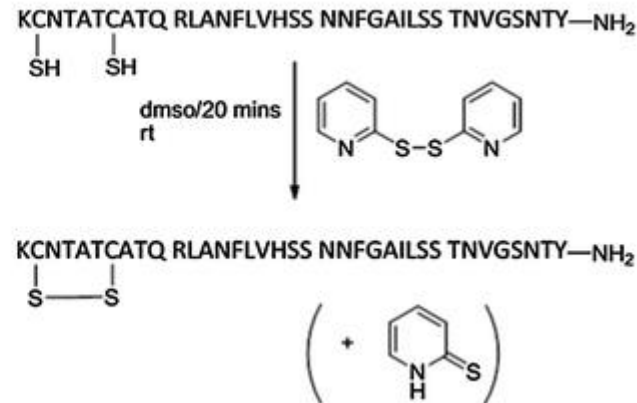
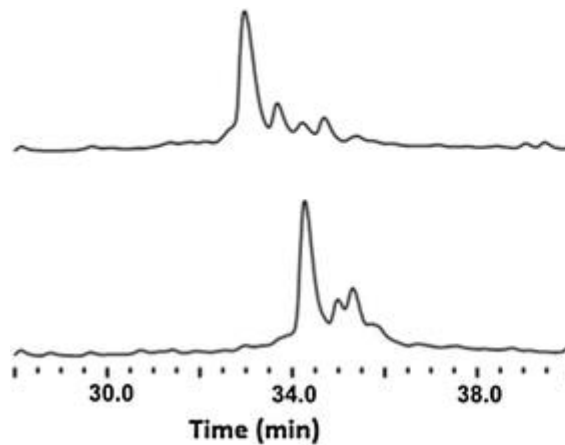
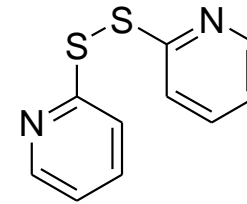
Activation d'un thiol



On peut utiliser une Cys(Npys) mais pas en stratégie Fmoc (ou alors en dernière étape) car le Npys est instable à la piperidine.

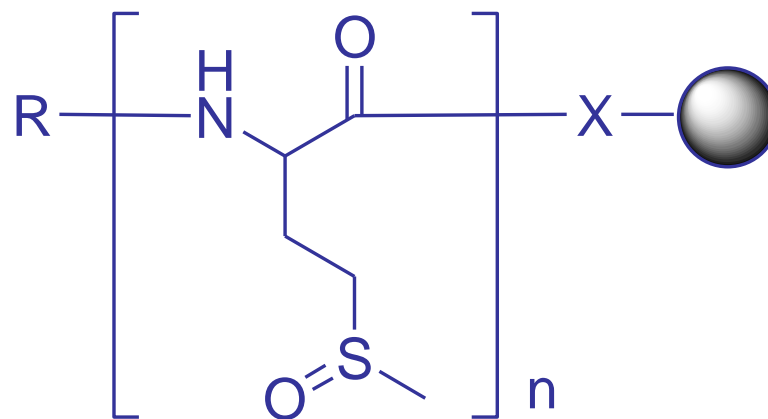
Utilisation de 2,2'-dipyridyl disulfide (DPDS) comme promoteur de SS

2 mg/ml de DPDS
10mg/ml de peptide



Formation de ponts disulfures par réactif supporté

Haute dilution obligatoire pour éviter la formation de ponts inter-chaînes
Gros volume de solvant à évaporer, souvent présence de DMSO



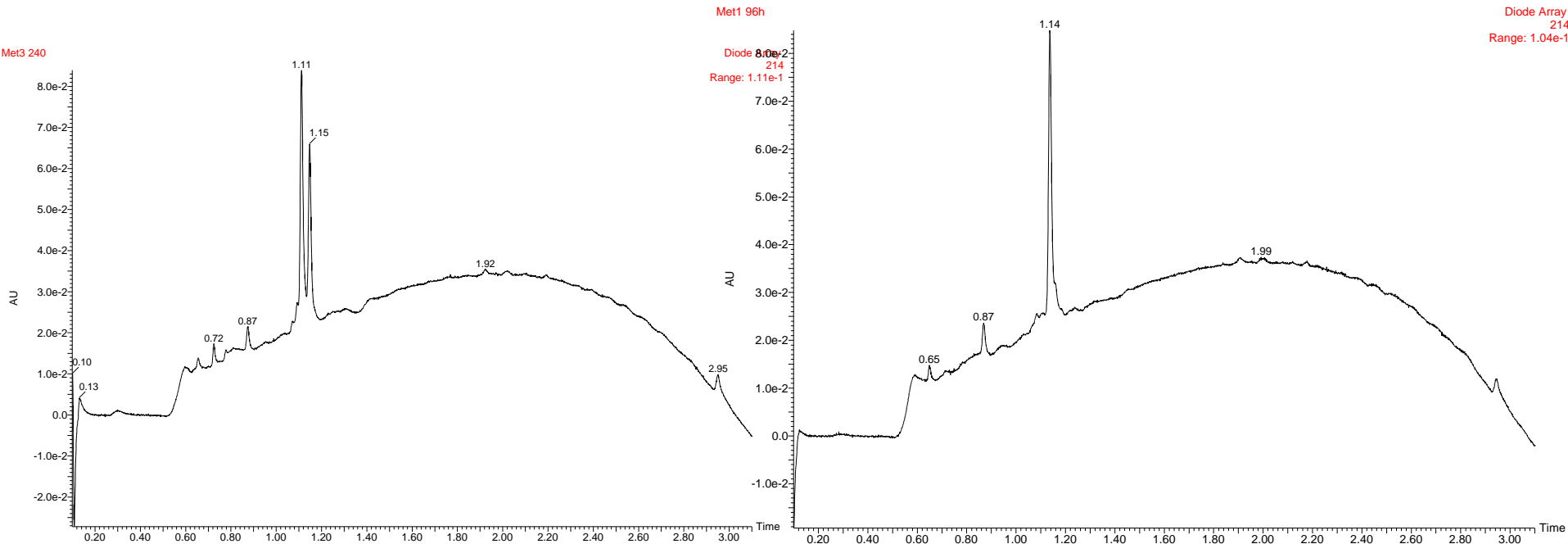
Réactif d'oxydation doux supporté

brevet US 60/813,371

Exemple de Cyclisation par formation de pont disulfure

H-Pro-Phe-Cys-Asn-Ala-Phe-Thr-Gly-Cys-NH₂ (CCAP)

[peptide] = 3mM, 5 eq d'oxydant/peptide



Oxydant	15'	4h	26h
Ellman supporté	54%	85%	79%
DMSO 10%	13%	52%	79%
H-[Met(0)] ₅ -PEG-PS 0.4 mmol/g	22%	68%	100%

III. Synthèse peptidique sur support solide

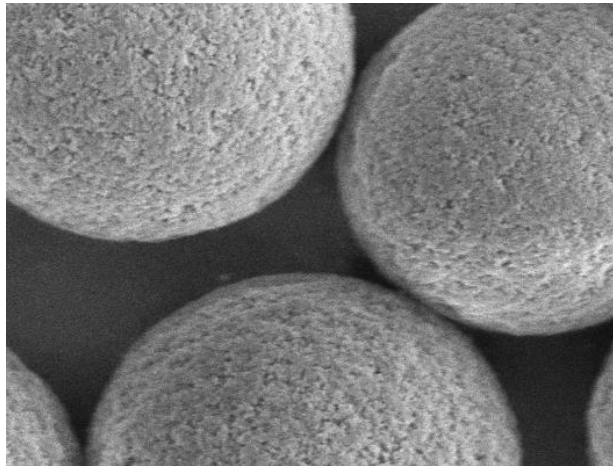
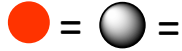


Synthèse sur support solide

Protection permanente C-ter: résine+ linker

Bruce Merrifield
Découverte SPPS 1963
Prix Nobel en 1984

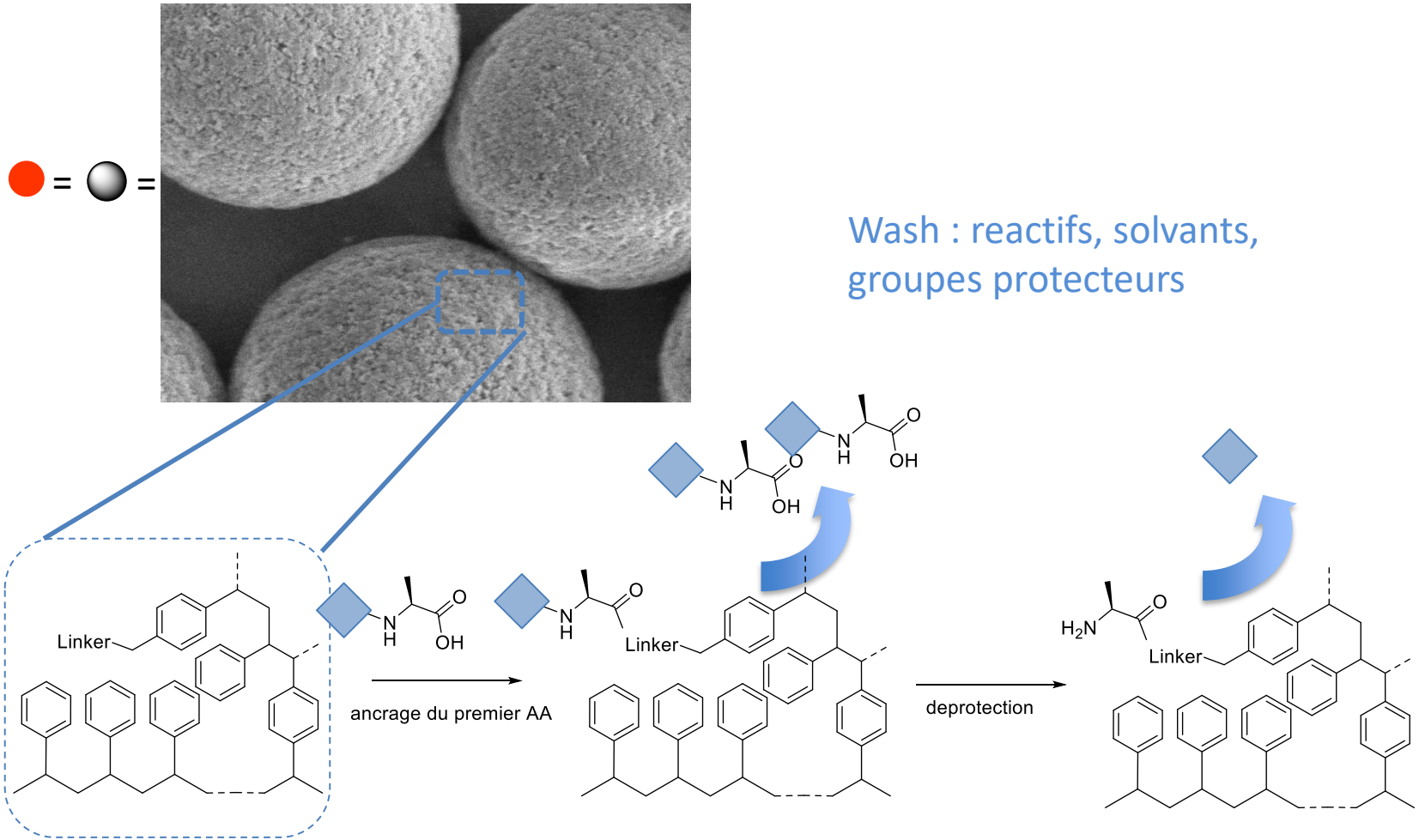
Intérêt:
Tous les reactifs et sous produits sont lavés
Très rapide (cycle 15 minutes)
Automatisable



Merrifield, R. B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154.

Synthèse sur support solide

Protection permanente C-ter: résine+ linker

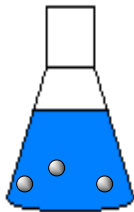


Merrifield, R. B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154.

Utilisation des supports en synthèse organique



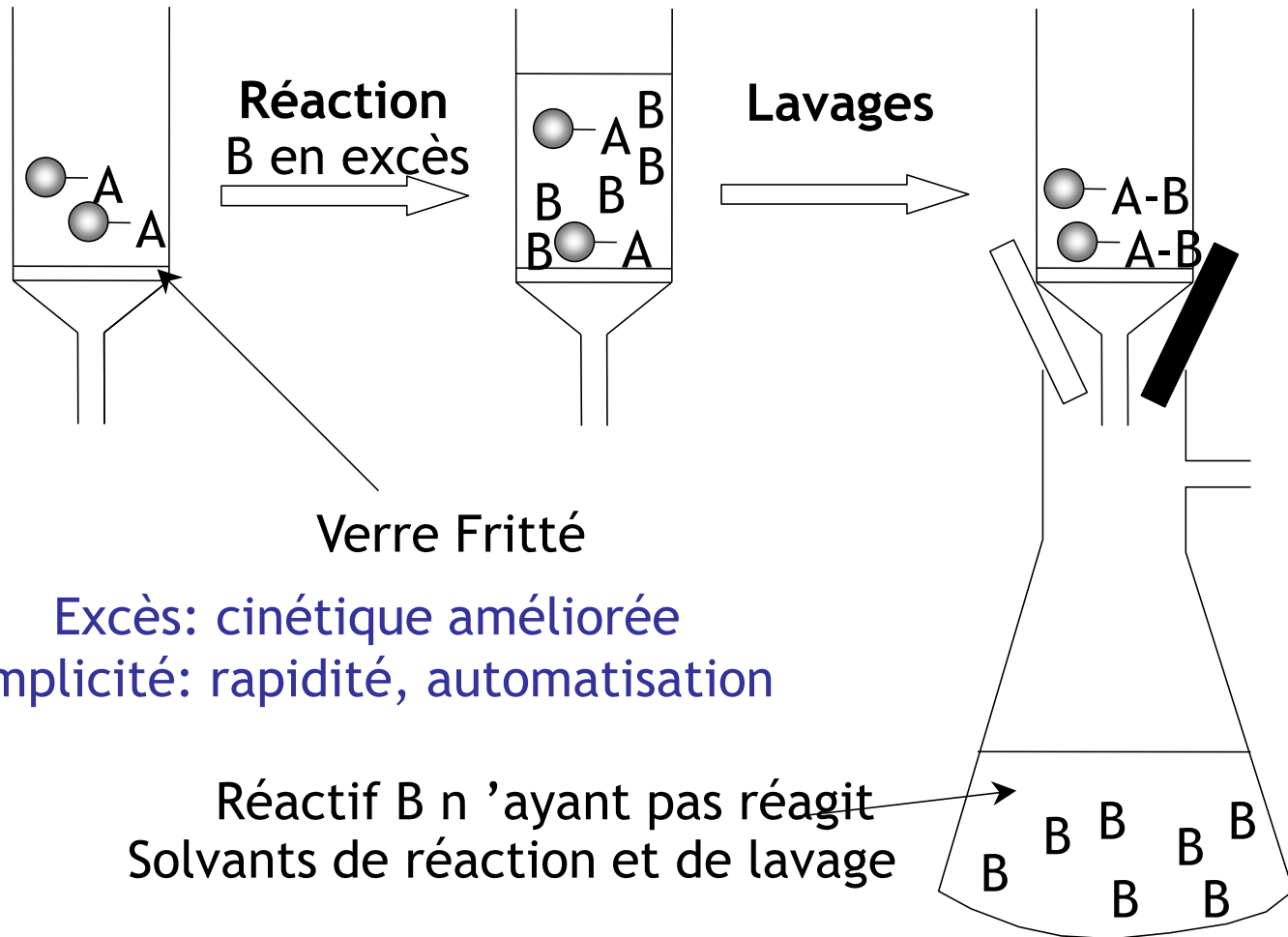
Synthèse sur support solide
C'est le cas de la SPPS



Synthèse en solution

- Réactifs et catalyseurs supportés
- Résines scavengers
- Autres (résines échangeuses, phases séparatives)

Intérêt du support solide



Excès: cinétique améliorée
Simplicité: rapidité, automatisation

Réactif B n'ayant pas réagi
Solvants de réaction et de lavage

● : polymère insoluble

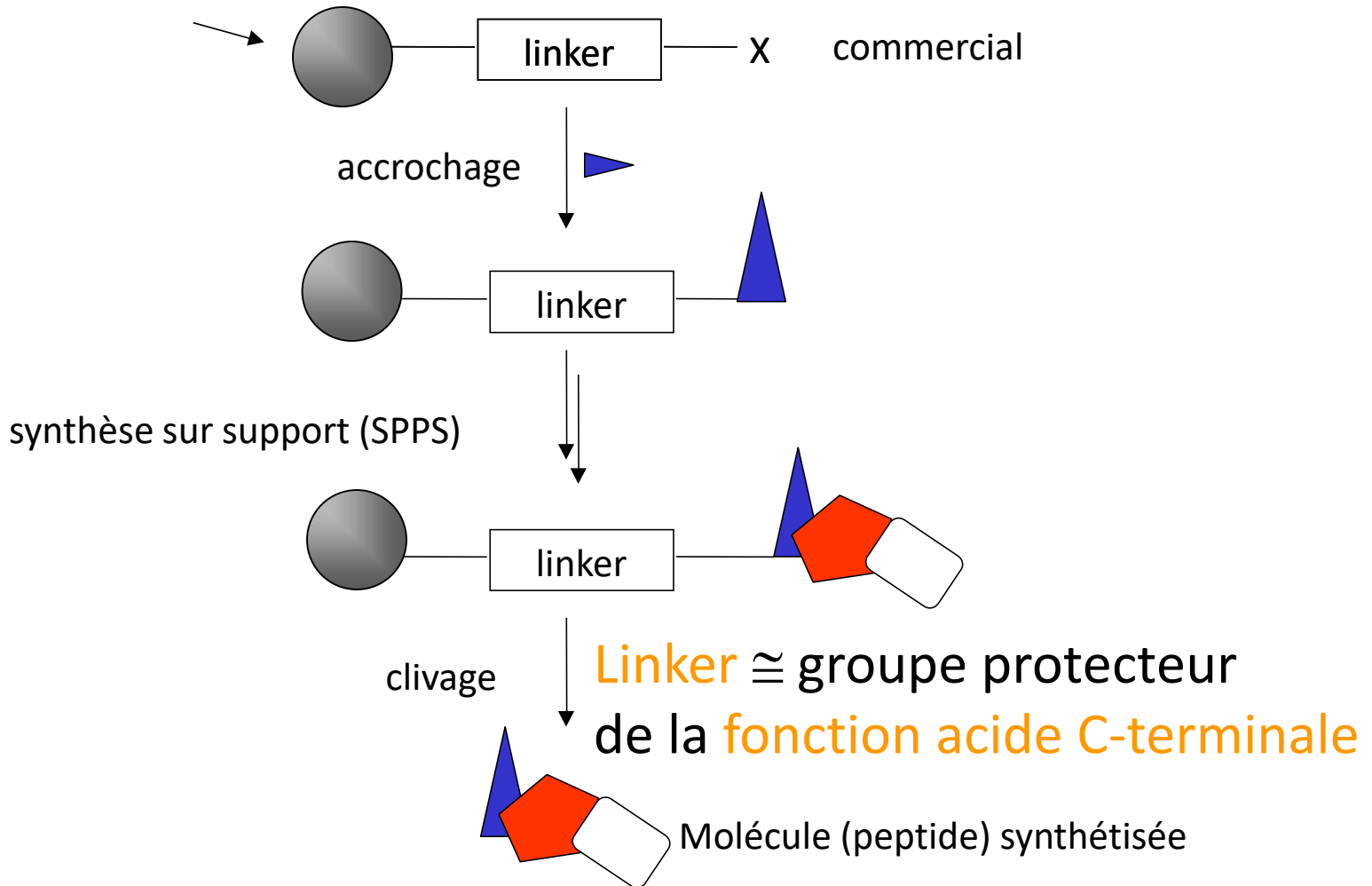
- Utilisation d'excès de réactifs : cinétiques améliorées
- Simplicité de la purification
- Automatisation facile
- Pas de pertes dues aux transferts
- Non volatil : pas de toxicité/danger
- Multiétapes facile (synthèse peptidique, oligonucléotide...)
- Pseudo dilution (réactions intramoléculaires)
- Compartimentation : étiquetage, sort/combine, split/mix

Des inconvénients....

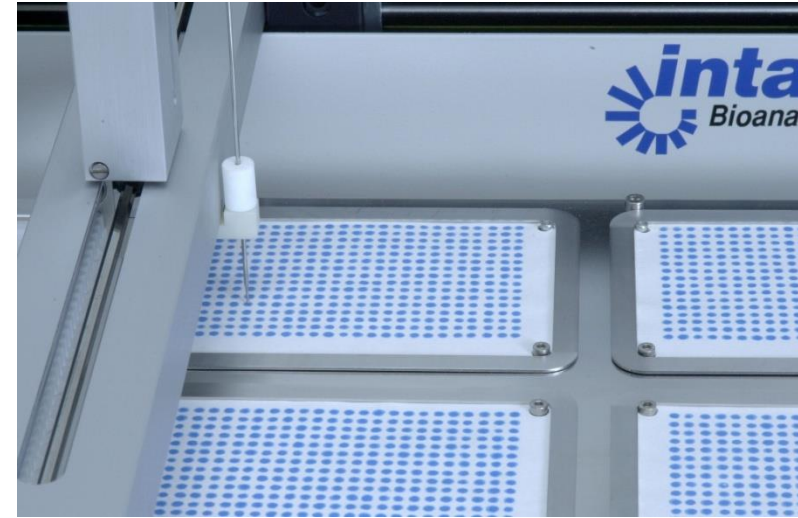
- Coût ? (+/- 30 Euros/g \cong 1 mmol) dépend de la matrice : PEG 5X plus cher que PS
 - Transfert de la chimie solution -> support
- Mise au point nécessaire
- Etapes d'accrochage /clivage
 - **Fonctionnalité** dépendante

Concepts de base: clivage, linker, matrice

Matrice polymère de base (e.g. PS, PEG, PA, PEG-PS)



A quoi ressemble un support solide pour la SPPS ?



Billes de résine de 0.01 à 0.4 mm de diamètre (PS, PA, PS-PEG, PA-PEG..)

Supports pelliculaires, greffés en surface (Lanternes, couronnes..)

Supports plans (technique Spot sur feuille de cellulose)

Réacteurs 'Batch'

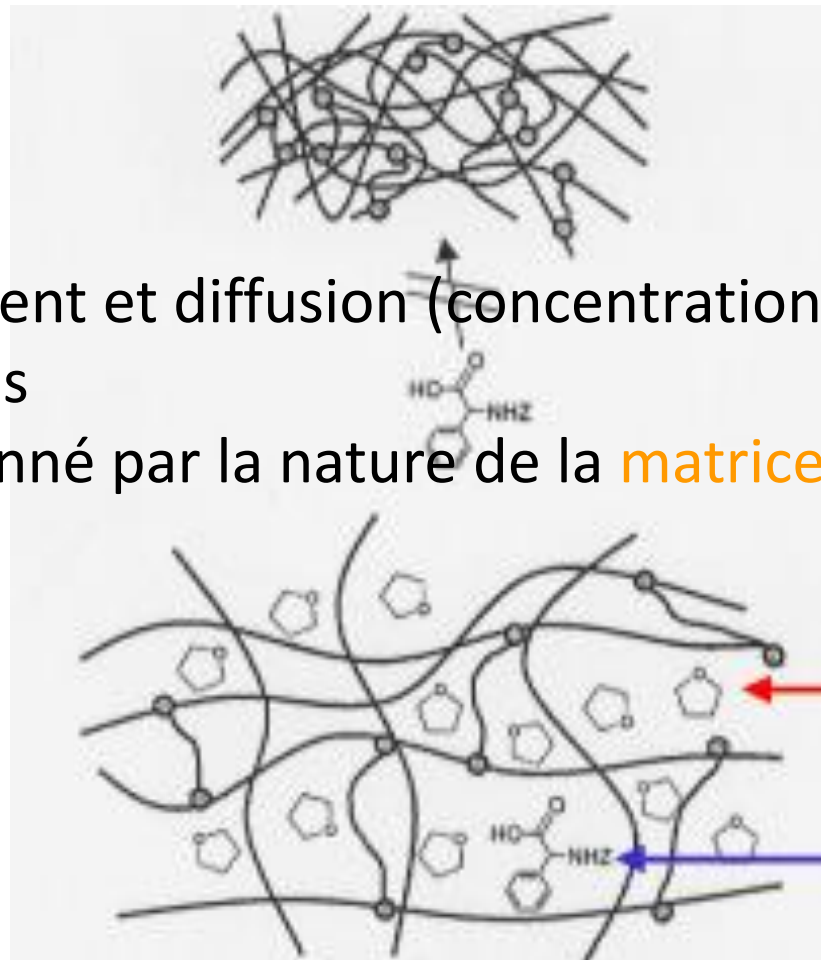


Concepts de base: gonflement

>1% des sites (linkers) à la surface de bille

Gonflement et diffusion (concentration) : paramètres essentiels

Conditionné par la nature de la **matrice gélatineuse**



solvants

réactifs

Concepts de base: gonflement

Gonflement et diffusion : paramètres essentiels
Conditionnés par la nature de la matrice

La **matrice** est aussi importante
que le **solvant** en chimie orga conventionnelle!

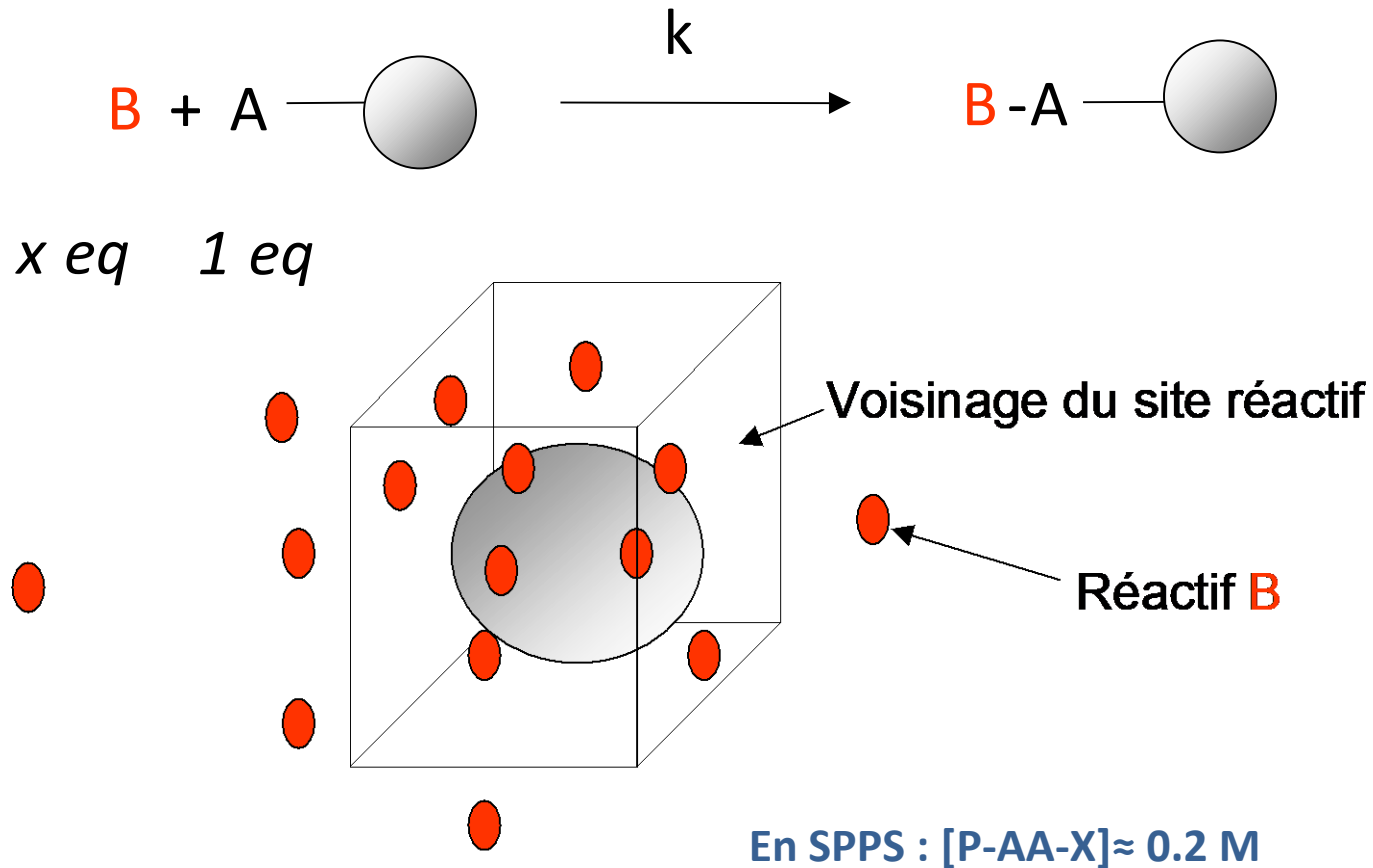
Exemple: PS vs PEG/PS

	Eau	MeOH	CH ₂ Cl ₂	Toluene	DMF	MeCN	THF	Dioxane	Ether
Polystyrene1% DVB	--	1.6	8.3	8.5	5.6	3.2	8.8	7.8	4.0
TentaGel HL 0.4-0.6 mmol/g	3.1	3.6	5.7	4.1	4.6	3.9	4.2	4.8	2.4

Gonflement de billes de PS par le DCM



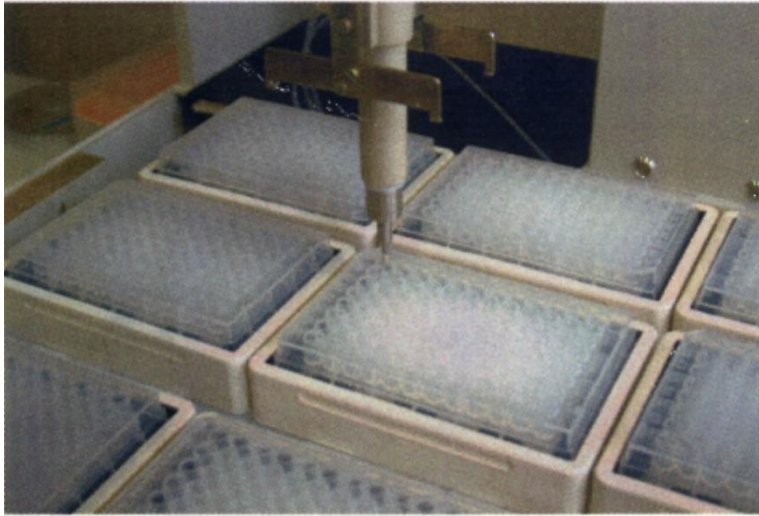
Concepts de base: concentration



pseudo premier ordre si B est suffisamment présent

$$v = k[B]$$

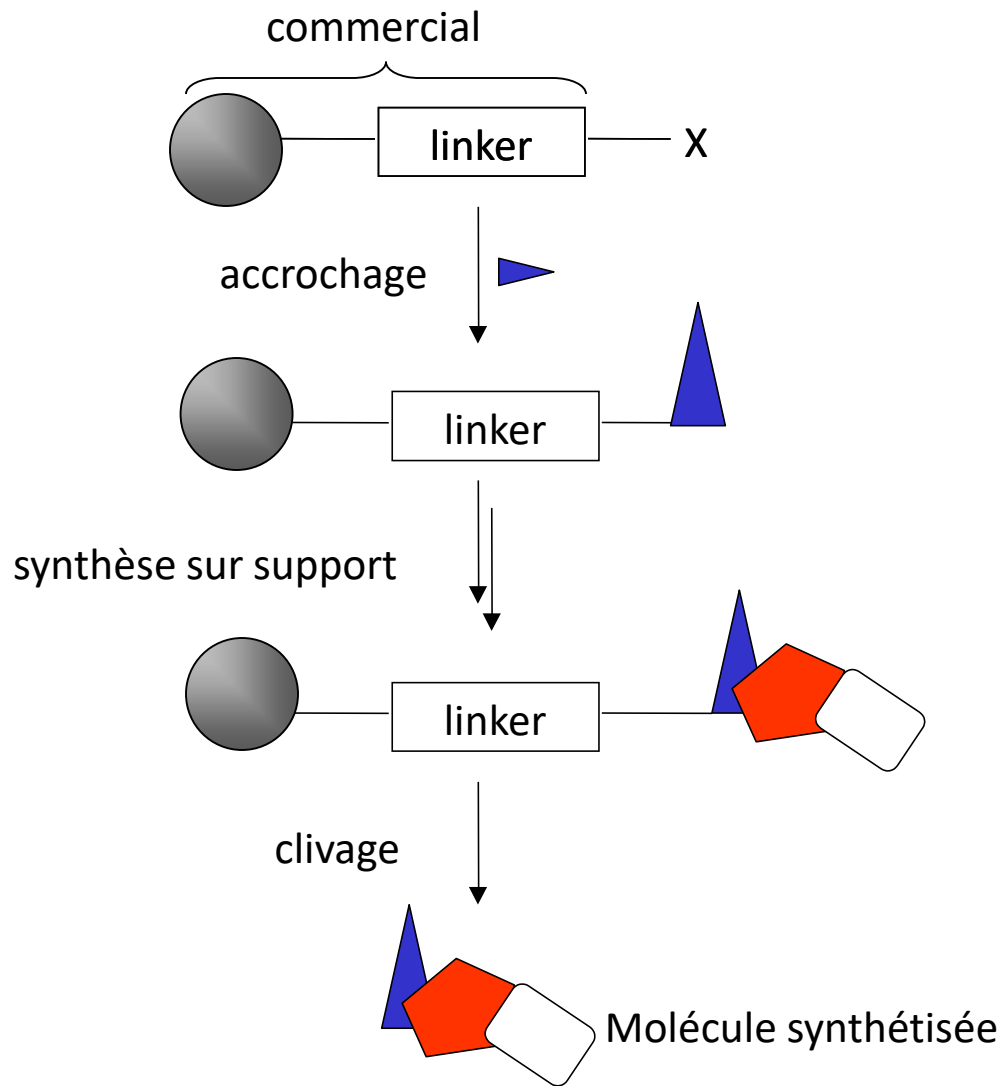
Automatisation/'parallélisation'



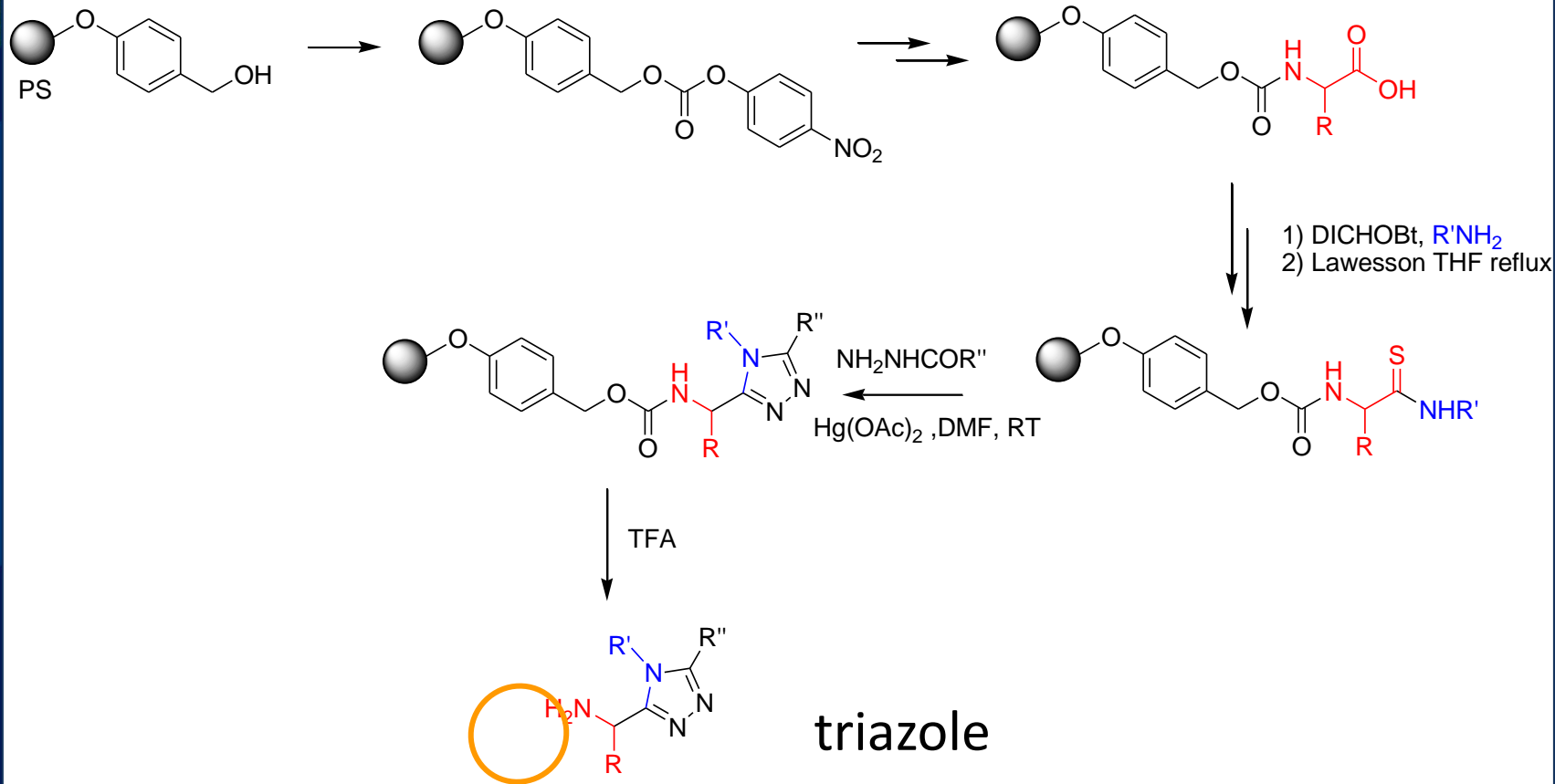
Des inconvénients....

- Coût ? (+/- 30 Euros/g \cong 1 mmol)
- Transfert de la chimie solution -> support **Mise au point** nécessaire
- Etapes d'accrochage /clivage
- **Fonctionnalité** dépendante

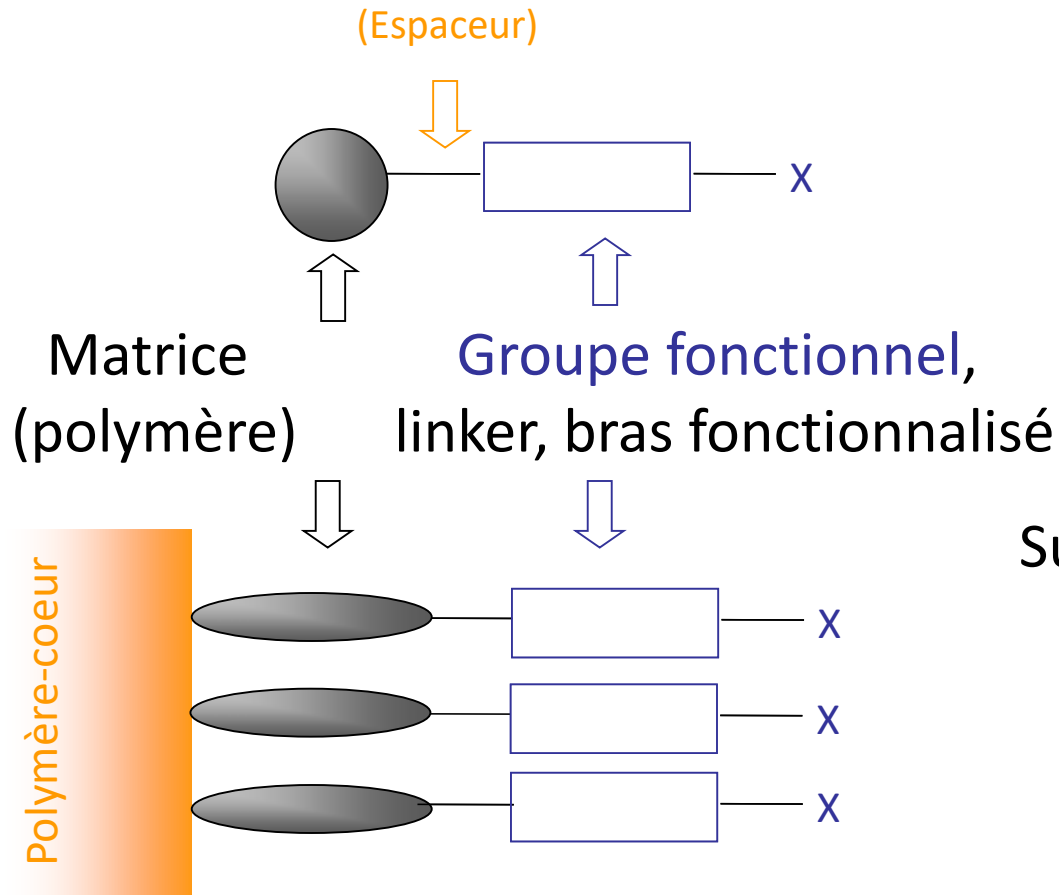
Rappel: linker, accrochage/clivage



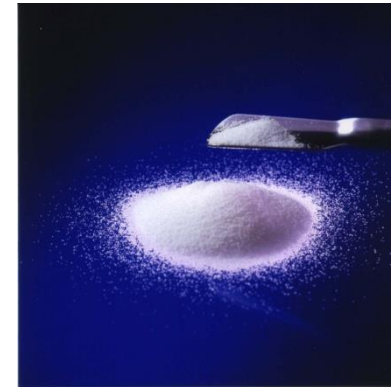
Fonctionnalité dépendante



Concepts de base



Billes de résine

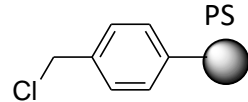


Supports pelliculaires

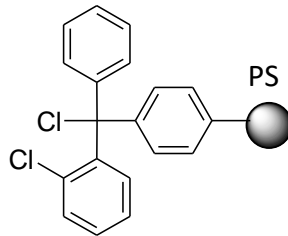


Nomenclature 'groupe fonctionnel (linker)'-'matrice'

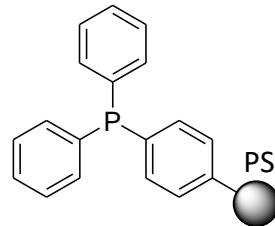
Le nom trivial peut prêter à confusion (cas fréquent quand la matrice est directement fonctionnalisée)



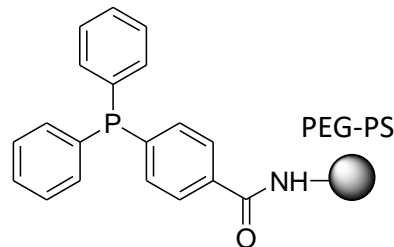
Résine de « Merrifield »
Chlorométhyl-**polystyrène**



2 chlorotrityl chloride resin
2 chloro chlorotrityl-**polystyrène**



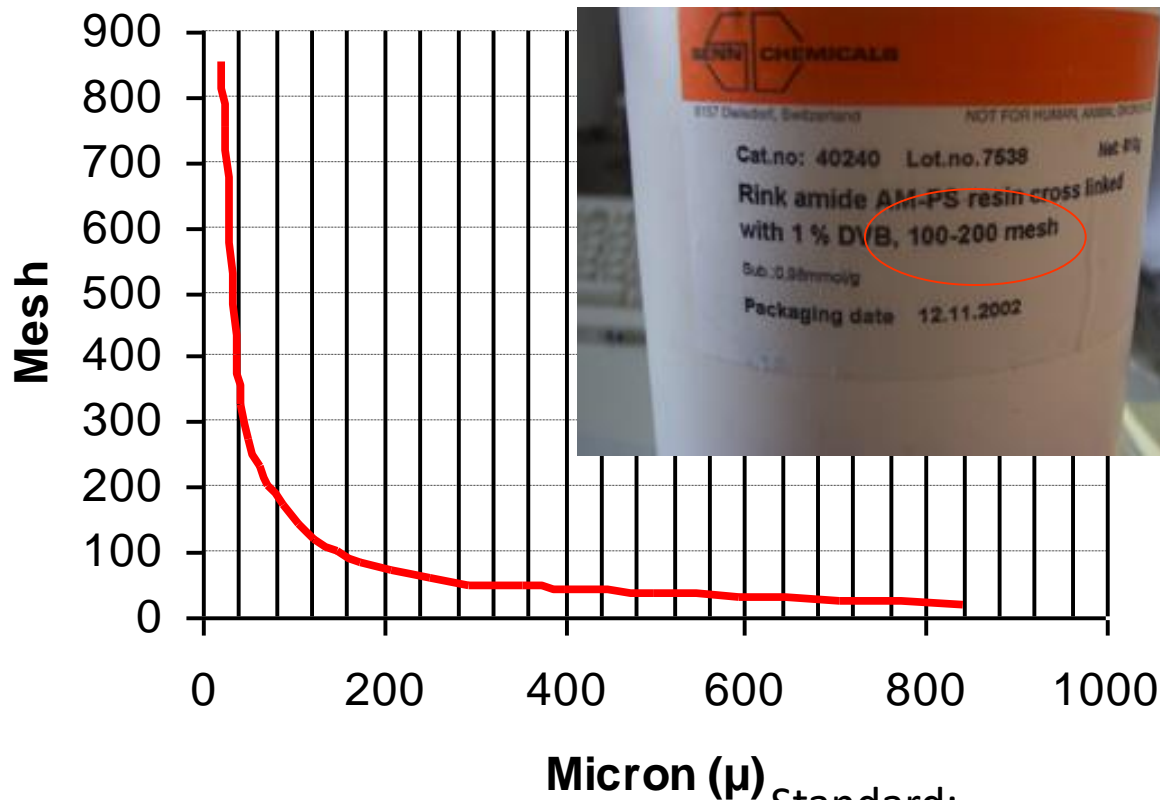
Triphénylphosphine-**polystyrène**



Triphénylphosphine-novagel™
Triphénylphosphine-**PEG-PS**

Taille des billes 10 μm \rightarrow 0,5 mm

diamètre des billes



Tamisage effectué par le fabricant

Standard:

100-200 mesh (75 μm -0.15 mm)

200-400 mesh (35-75 μm)

'Loading' de la résine, nombre de sites

Loading=Charge: 0.01 à 6.5 mmol/g
(0.3-1.4 mmol/g pour la synthèse sur support)

$$\text{Nombre de billes par gramme} = \frac{1}{\frac{4}{3} \pi (1/2 D)^3 \times \text{densité}}$$

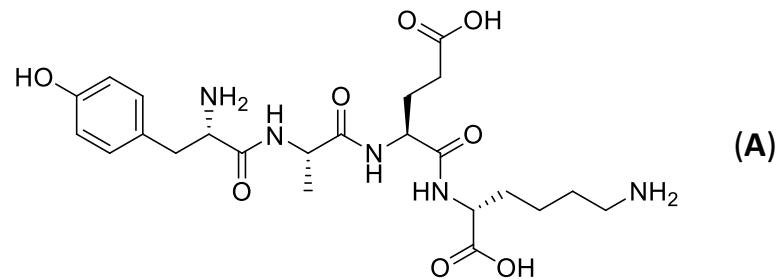
D= diamètre en cm

Entre 10^9 et 10^{12} billes par gramme de résine pesée

$$\text{Nombre de sites par billes (mmol)} = \frac{\text{Charge de la résine (mmol/g)}}{\text{Nombre de billes par gramme}}$$

Une bille porte entre 10^9 et 10^{12} sites réactifs

Calculs de charge de résine



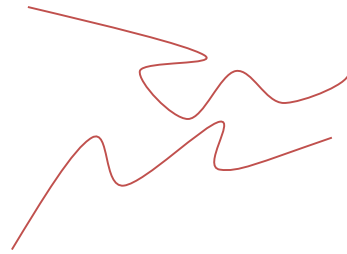
- 1) On veut obtenir 1.018 g du peptide (A). Sachant que le rendement de synthèse et de purification est de 20%, calculez la quantité de résine fonctionnalisée à 0.5 mmol/g qu'il vous faudrait utiliser.
- 2) Calculez la charge théorique de la résine au moment de la dernière deprotection du Fmoc

Loading de la résine, nombre de sites

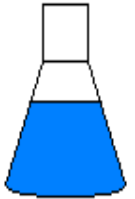
Particle Size		Loading	Beads per mg	Loading per bead
35-75 μ m	(200-400 mesh)	1.0 mmol/g	8000 - 16000	0.06 - 0.12 nmol
75-150 μ m	(100-200 mesh)	1.0 mmol/g	1000 - 2000	0.5 - 1.0 nmol
75-150 μ m	(100-200 mesh)	2.0 mmol/g	1000 - 2000	1.0 - 2.0 nmol
150-300 μ m	(50-100 mesh)	2.0 mmol/g	125 - 250	8 - 16 nmol
200-250 μ m	(60-70 mesh)	2.0 mmol/g	150 - 200	10 - 13 nmol
250-300 μ m	(50-60 mesh)	2.0 mmol/g	80 - 100	19 - 23 nmol
150-300 μ m	(50-100 mesh)	4.0 mmol/g	125 - 250	16 - 32 nmol
400-500 μ m	(30-40 mesh)	1.0 mmol/g	20 - 25	40 - 50 nmol
400-500 μ m	(30-40 mesh)	2.0 mmol/g	20 - 25	80 - 100 nmol

Matrices polymériques

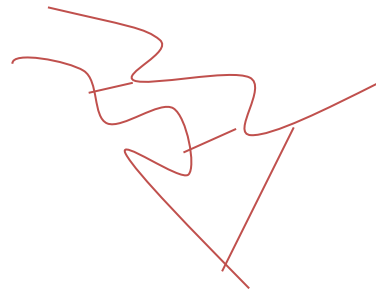
Polymères
non réticulés



Supports solubles (PEG)



Polymères
réticulés



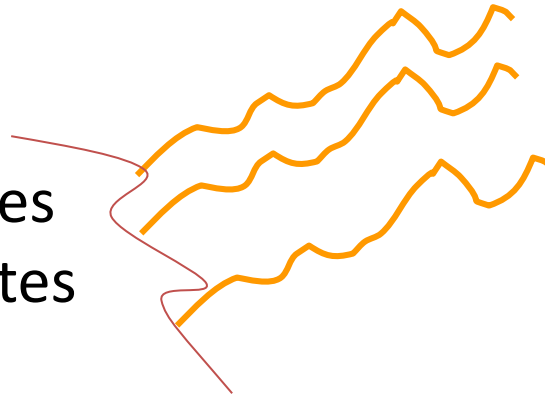
Gélatineux
(microporeux)



Macroporeux



Polymères
composites



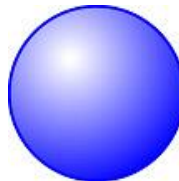
Inorganiques, Polyhydre



Seconde génération

Supports pelliculaires

Lanternes, mega beads




Matrices polymériques

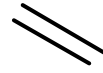
Co-polymères réticulés utilisables en synthèse

Polystyrène réticulé

Styrène
Agent de maille

Initiateur de radicaux

Divinylbenzène 
Agent de réticulation



1-2% gélatineux (microporeux)
5% macroporeux
10-20% résines échangeuses d'ions

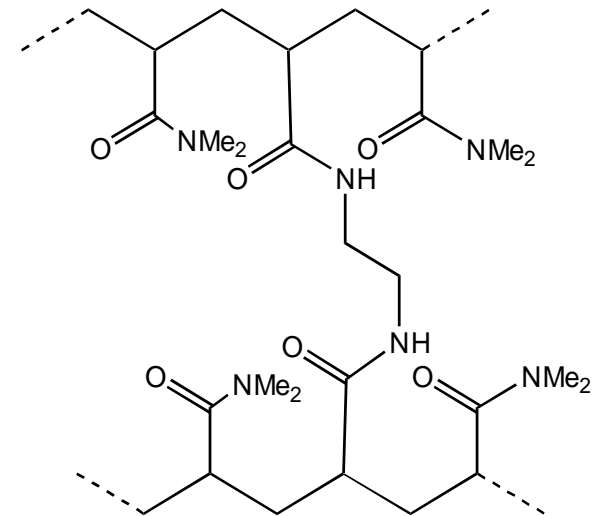
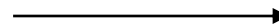
Matrices polymériques

Co-polymères réticulés utilisables en synthèse

Polyamide réticulé

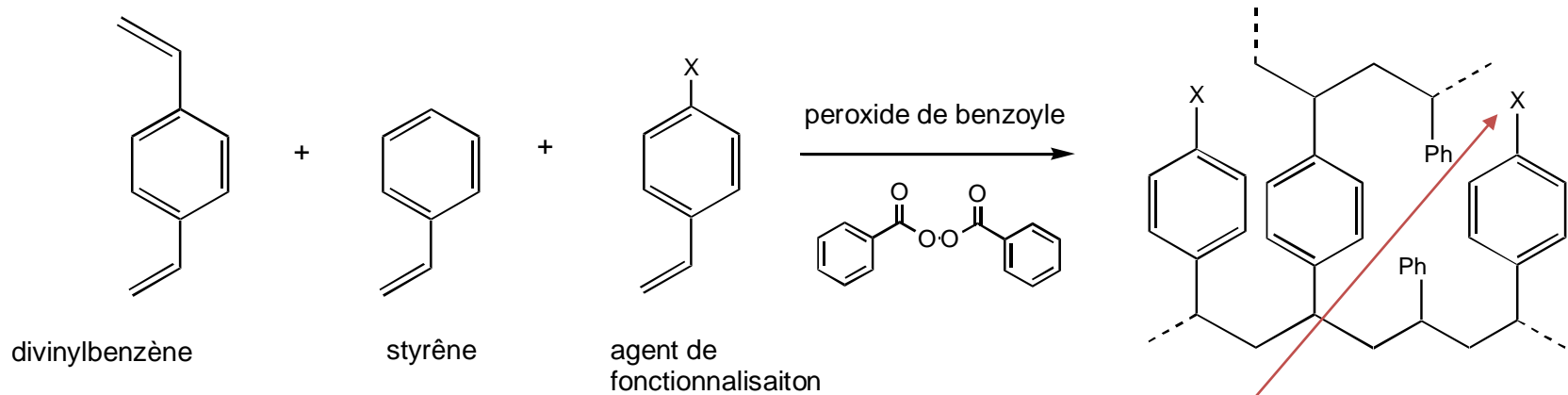
N,N diméthylacrylamide
Agent de maille
 $\text{Me}_2\text{N-CO-CH=CH}_2$

N,N'-bis-acryloylethylène diamine
Agent de réticulation
 $\text{CH}_2=\text{CH-CONH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-HN-CO-CH=CH}_2$

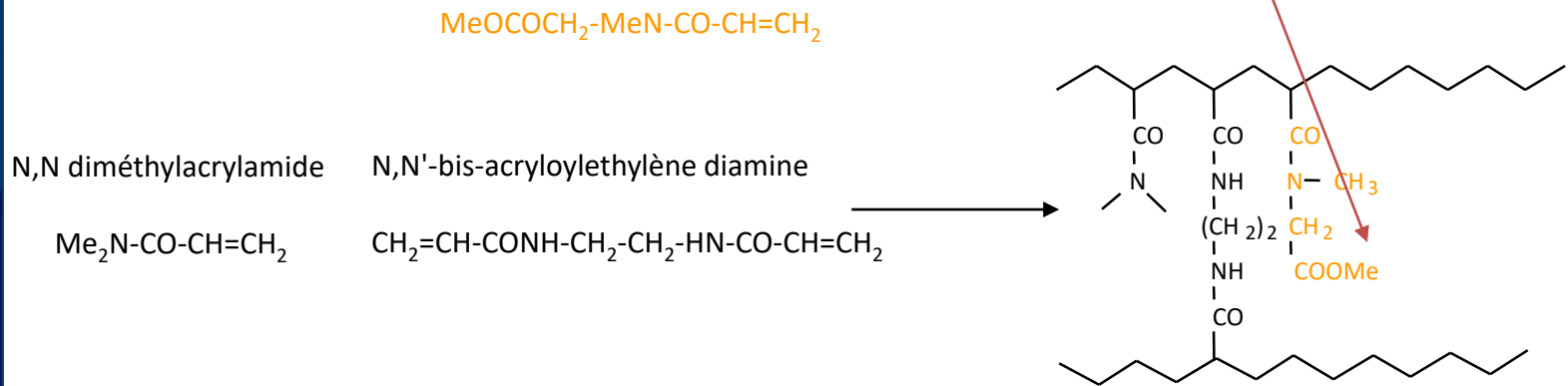


Matrices polymériques co-monomériques

Fonctionnalisation pendant la polymérisation



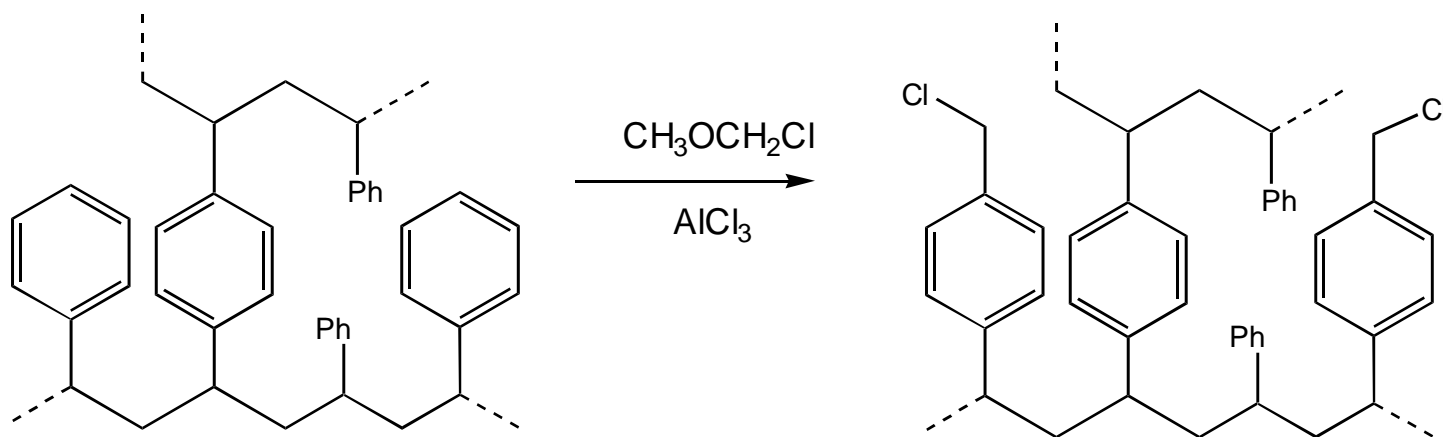
Introduction du linker



Matrices polymériques

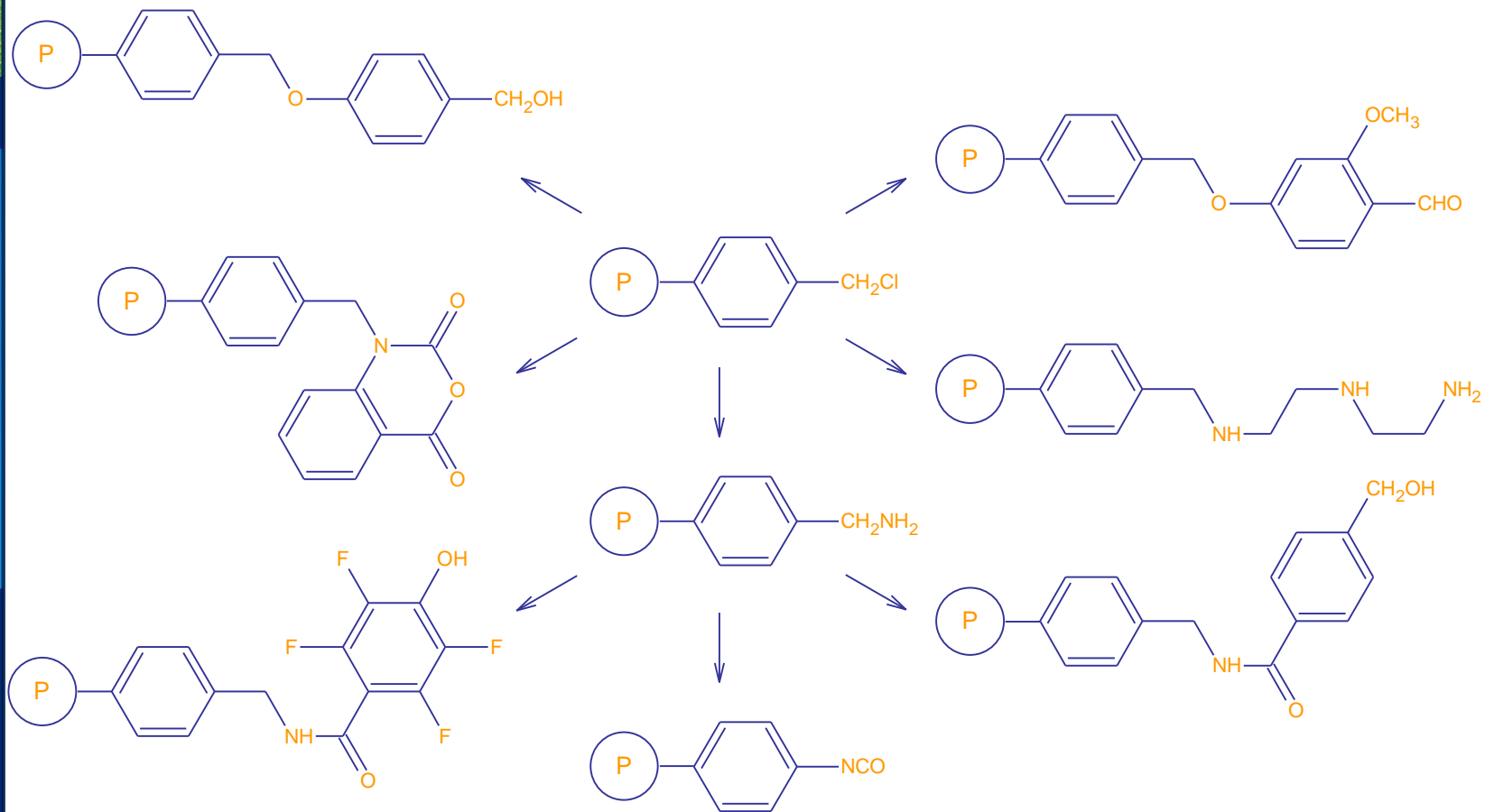
Fonctionnalisation après la polymérisation

Préparation de la résine de « Merrifield »

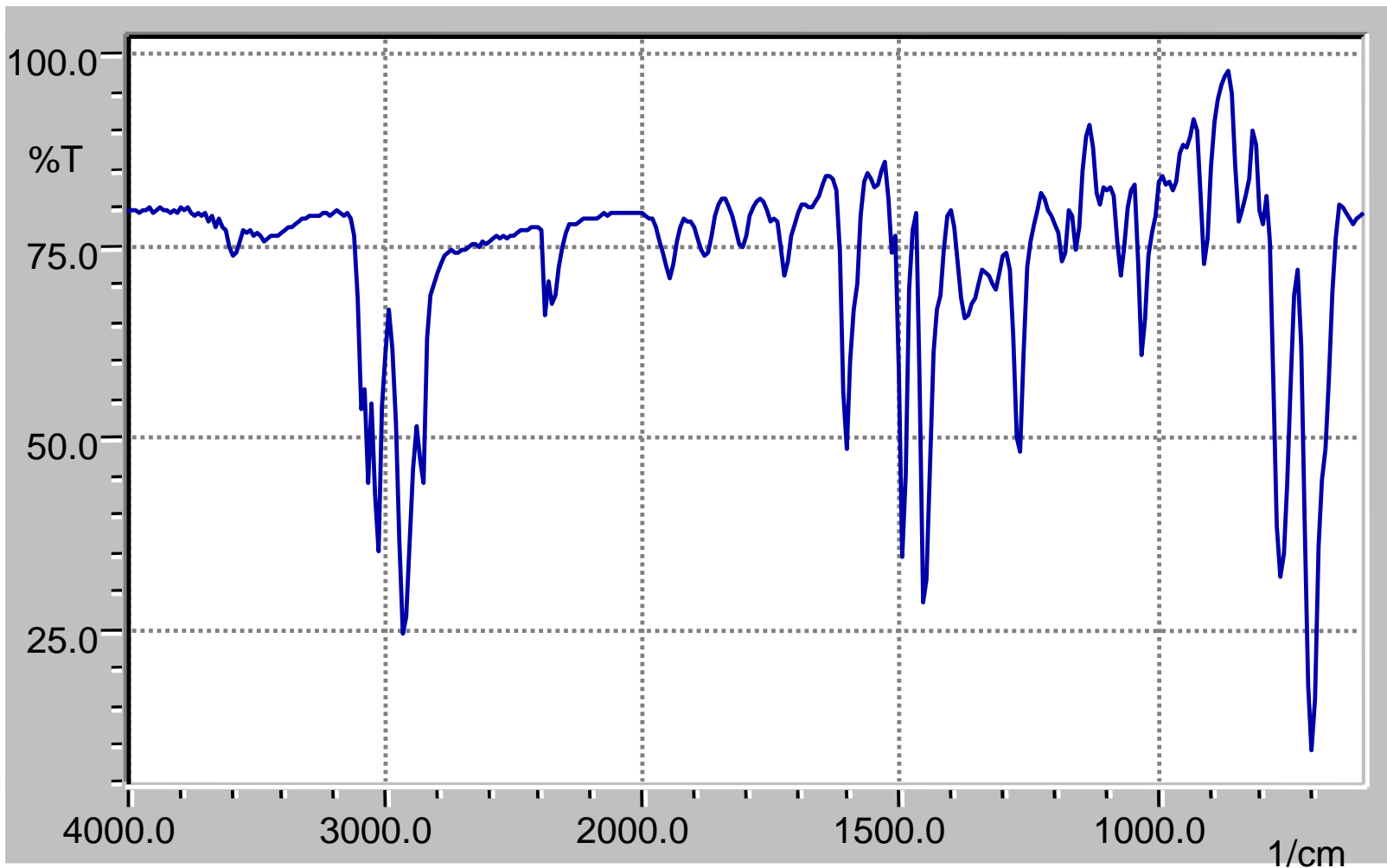


Acide de Lewis + électrophile: SE aromatique

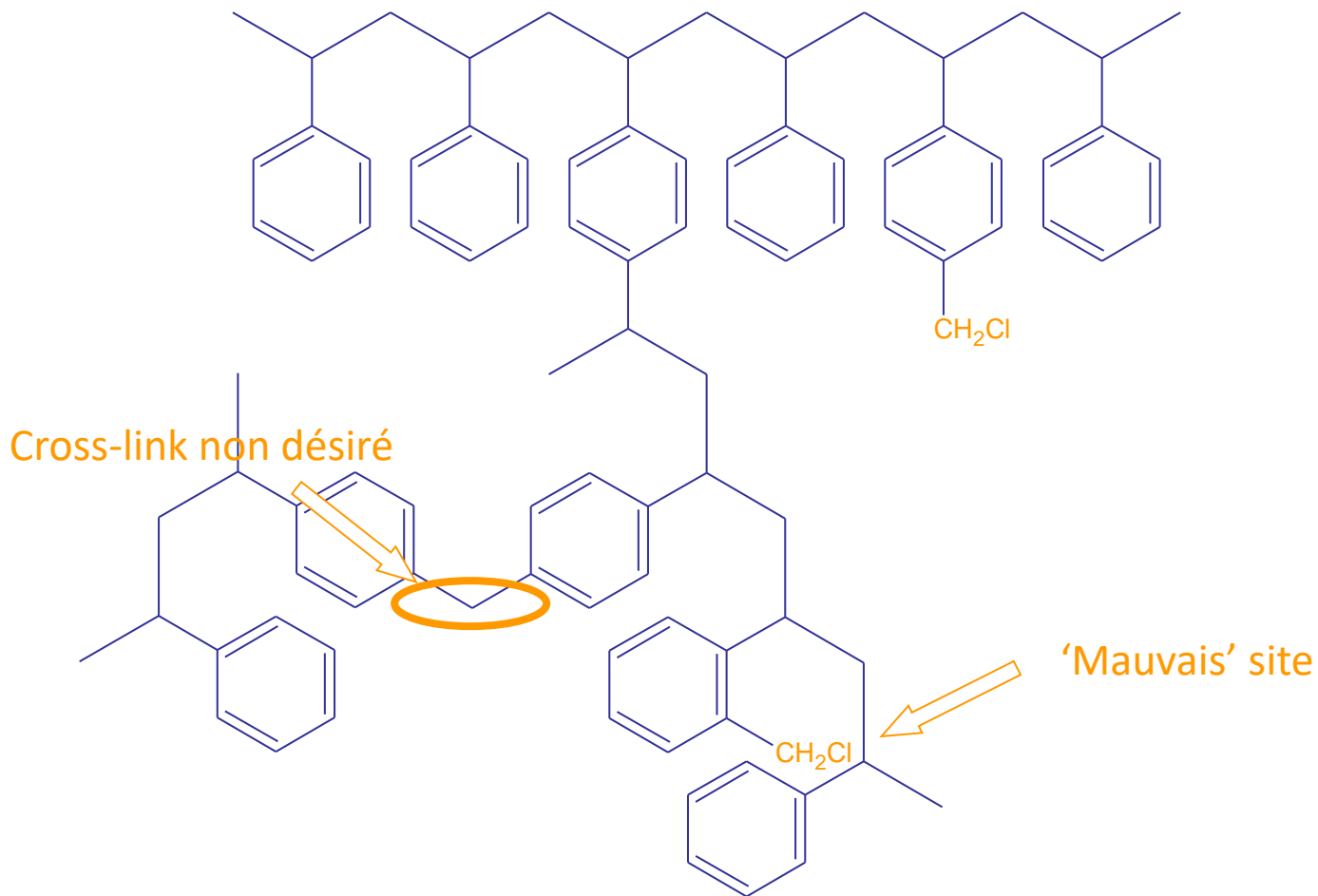
Fonctionnalisation secondaire



Caractérisation FT-IR possible



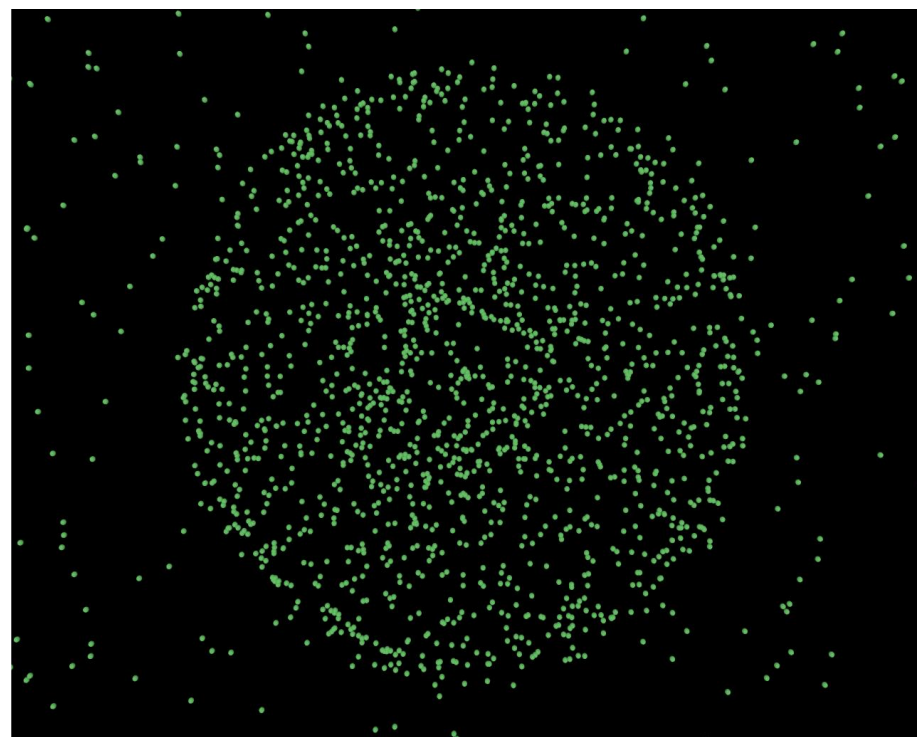
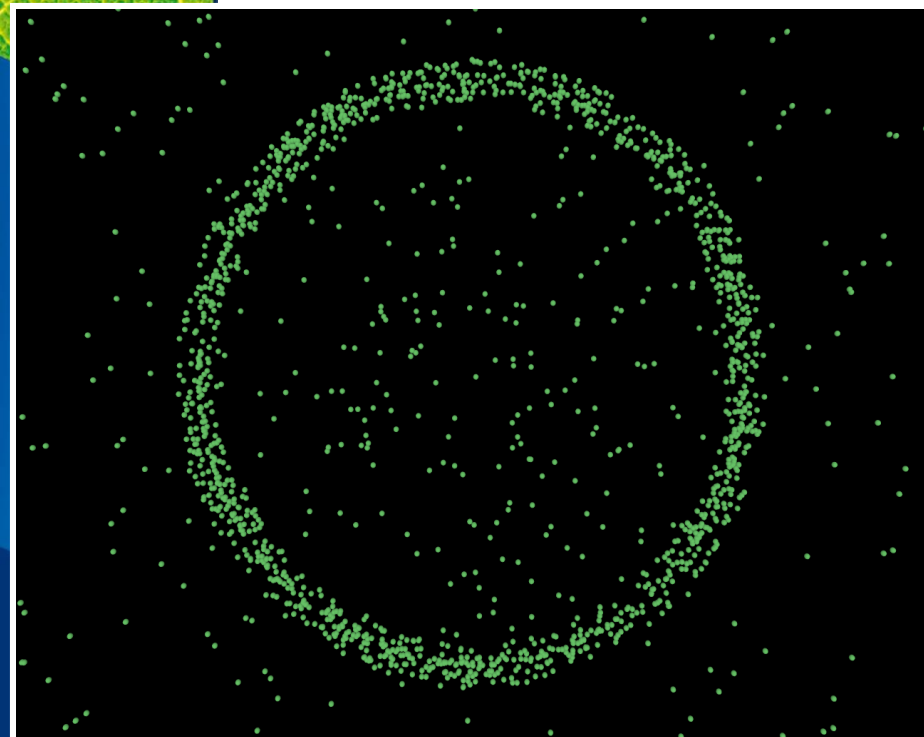
Problèmes: Fonctionnalisation après la polymérisation



Répartition de la fonctionnalisation

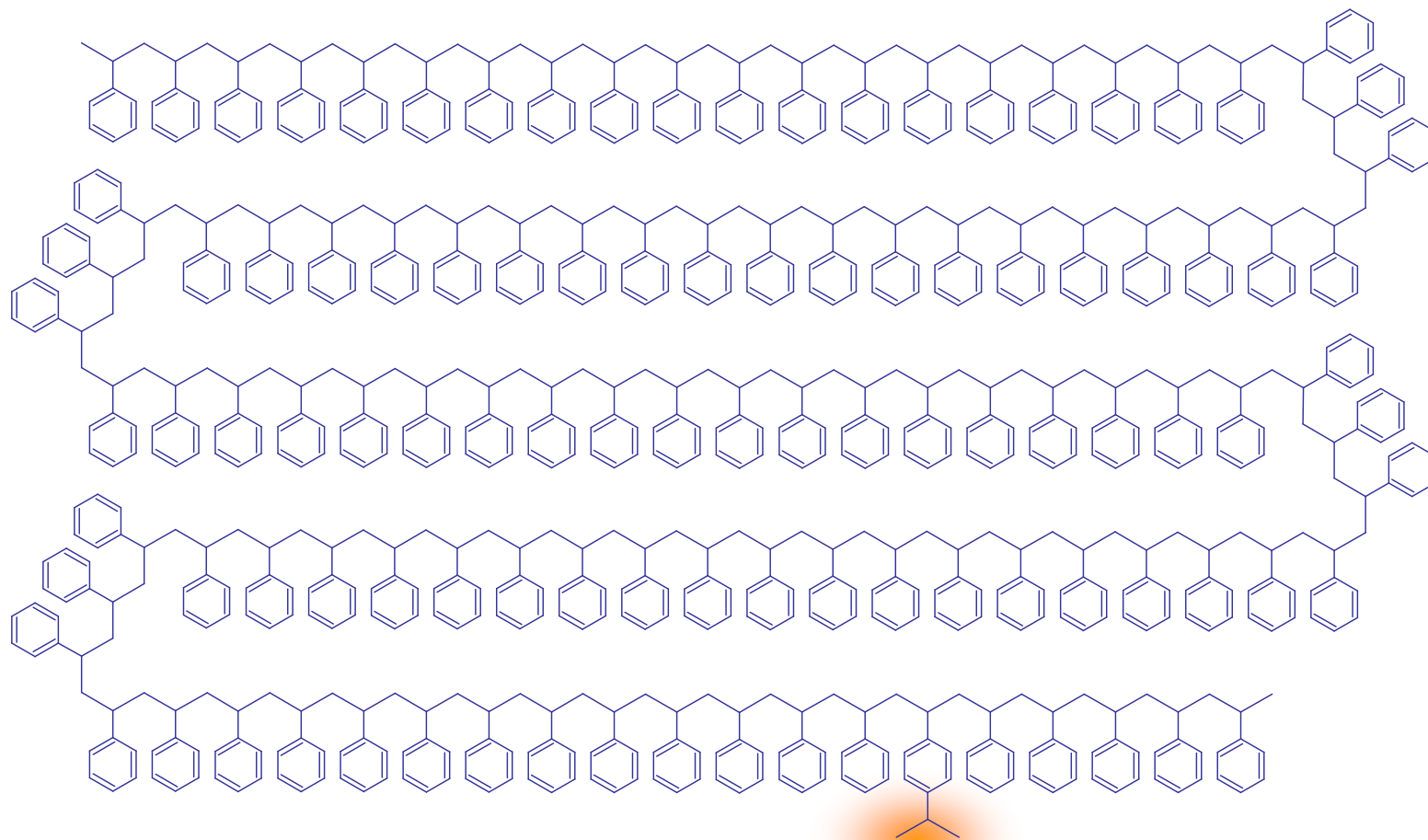
Fonctionnalisation
après la polymérisation

Fonctionnalisation
Pendant la polymérisation

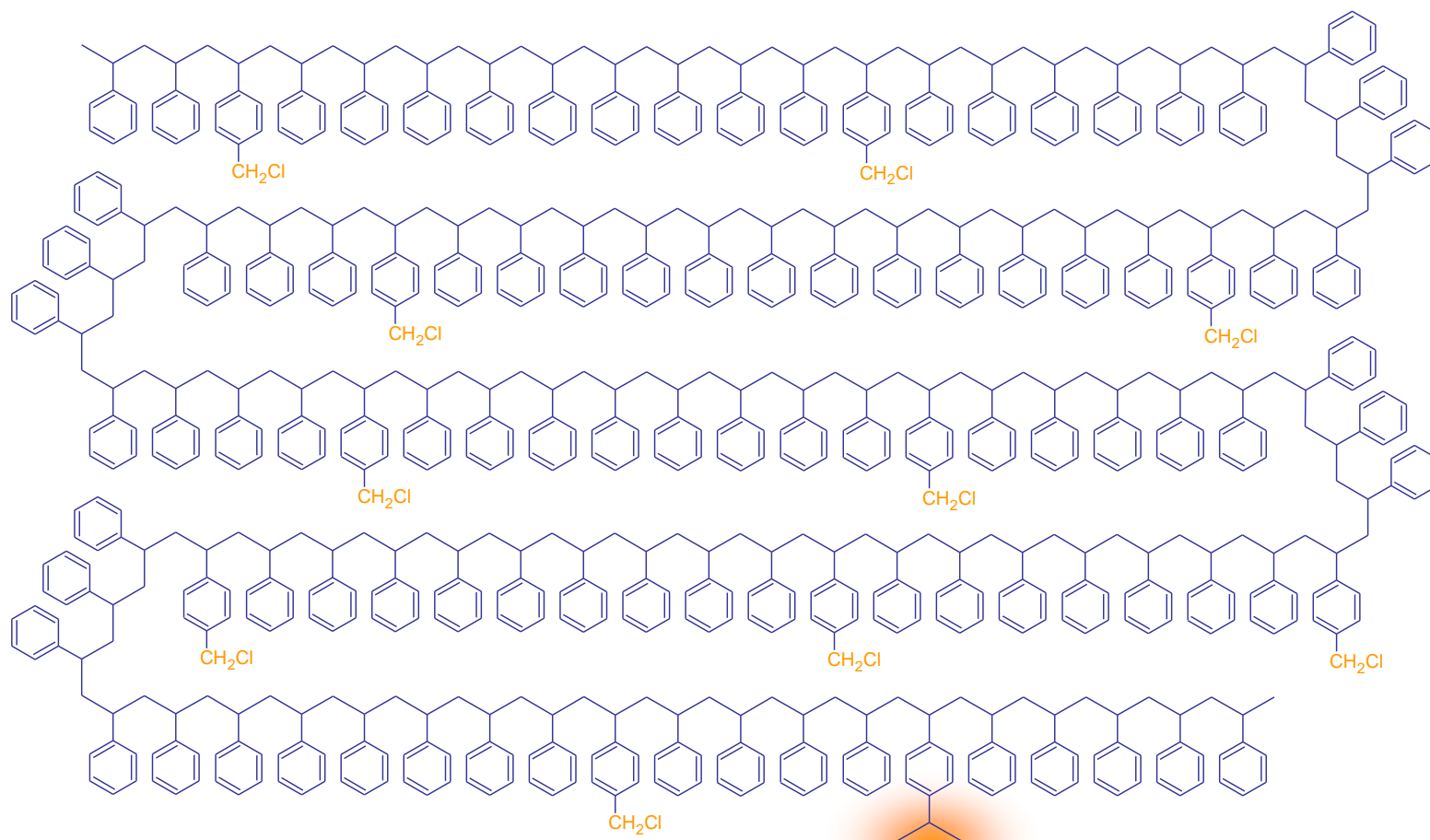


EDS (Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy) du Chlore

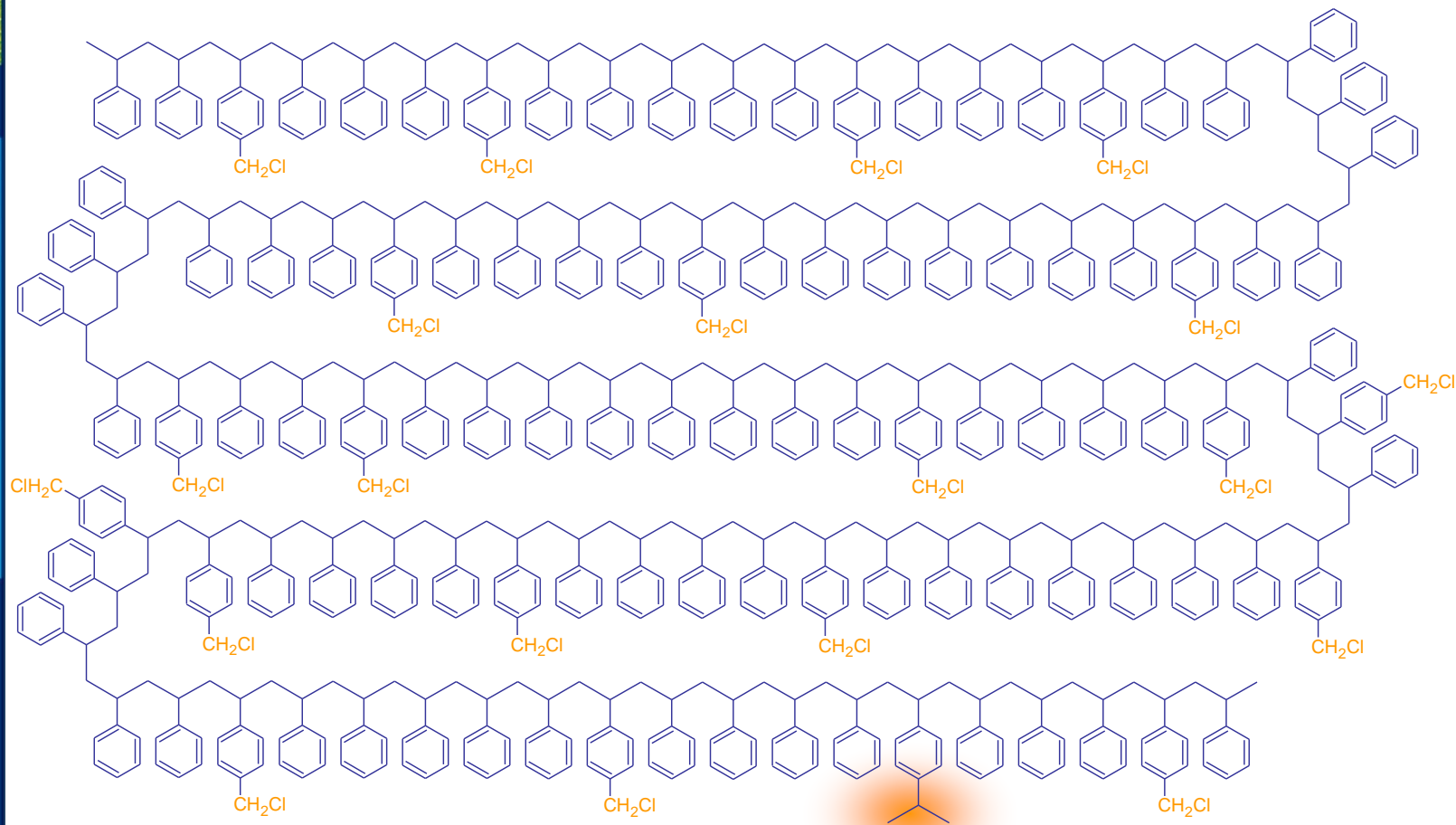
PS 1% DVB



PS 1% DVB, 1 mmol/g, 10% des sites potentiels occupés



PS 1% DVB, 2 mmol/g, 20-25% des sites potentiels occupés



Loading et occupation des sites

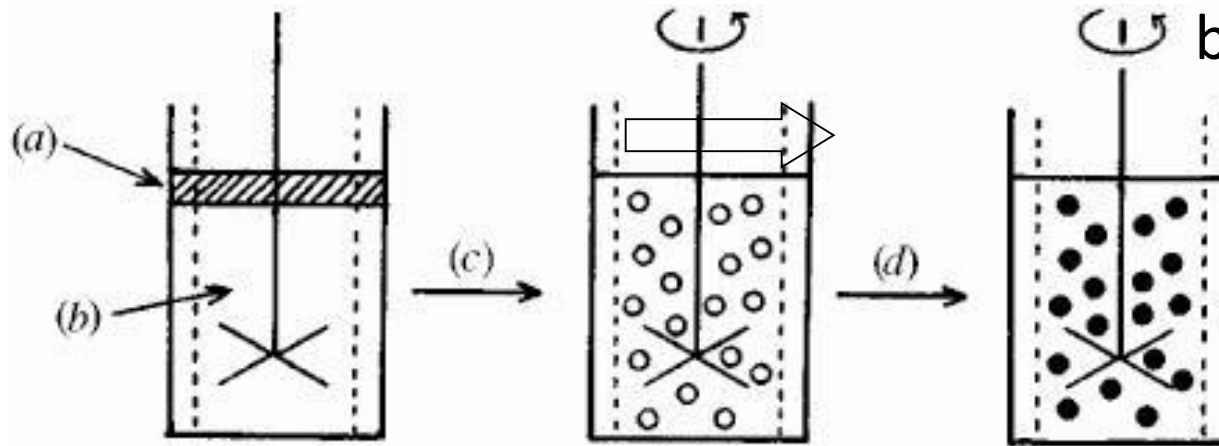
Loading (mmol/g)	% sites occupés
1	10%
2	25%
4	50%
6.5	99%

Plus le **loading est élevé**, plus les sites sont proches:
attention à **l'encombrement** en synthèse sur support

Pour les grosses molécules utiliser des résines **peu chargées** (>0.5 mmol/g)

Polymérisation en suspension

Formation de billes de résine



(a) Phase dispersée

- agent de maille+agent de réticulation (+agent de fonctionalisation)
- (diluant+porogène pour les polymères macroporeux)
- initiateur

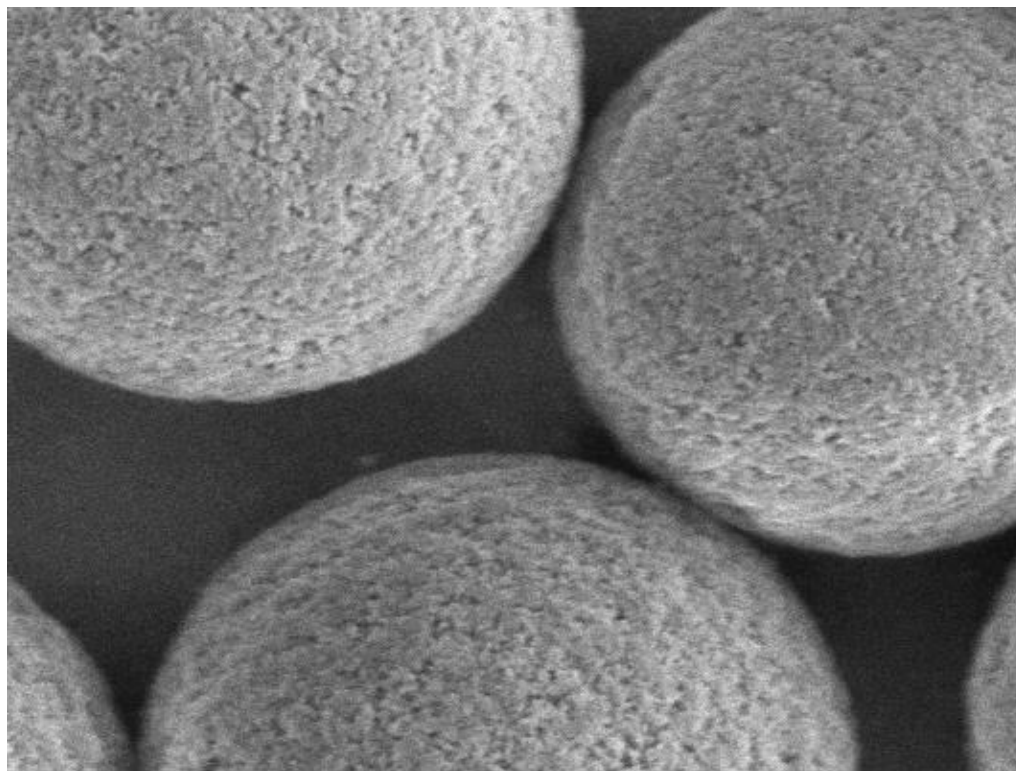
(b) Phase continue: Stabilisateur de suspension + eau

- surfactant évite la 'fusion' des billes,
- supressant évite la solubilisation des billes

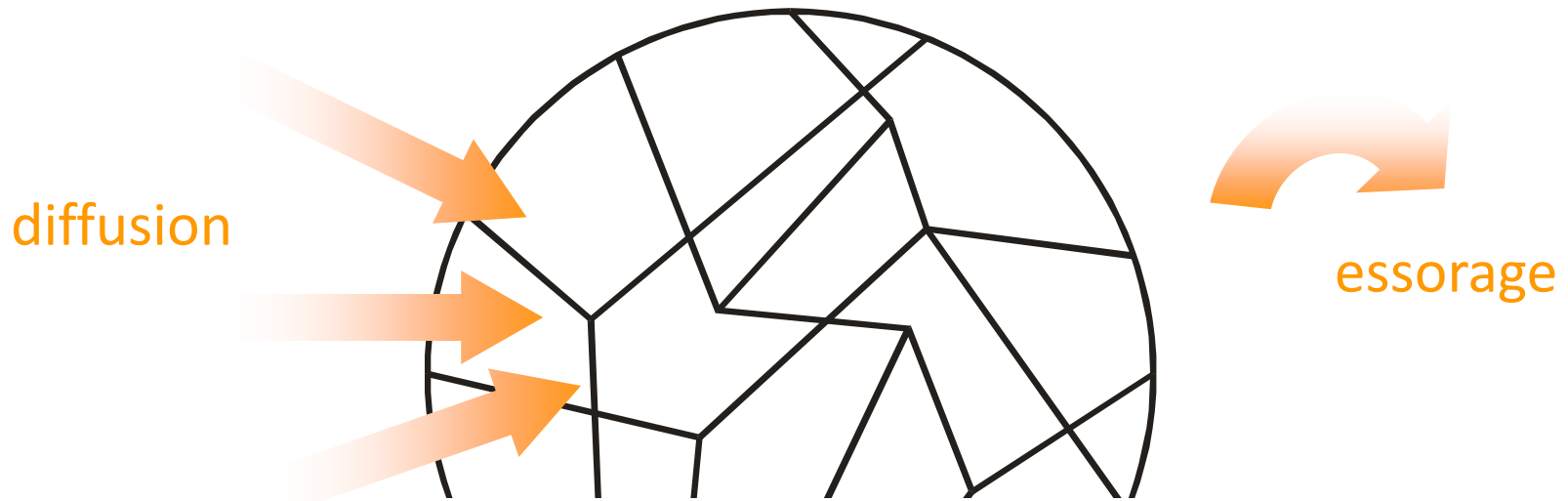
(d) 12 heures 80°C

Polymères d'addition réticulés

Polymères **gélatineux**
(ou microporeux)

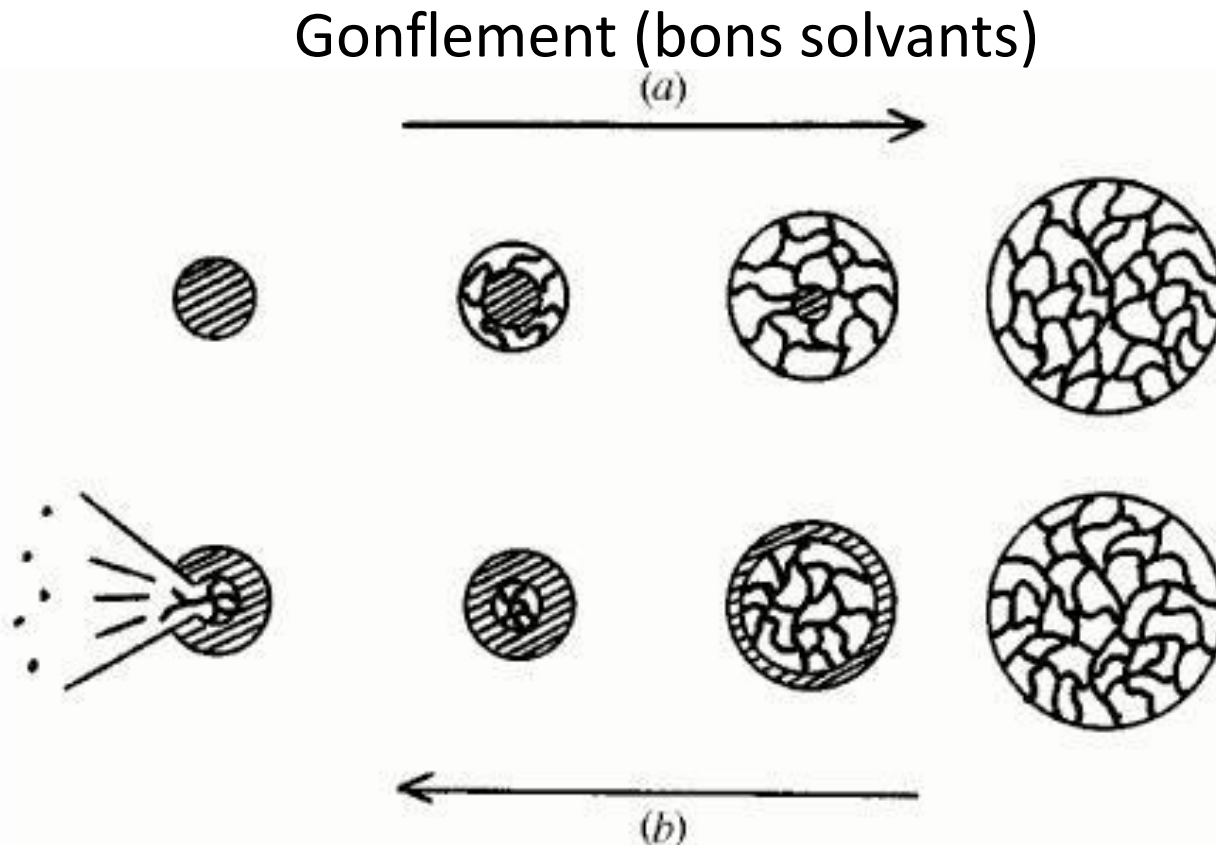


Morphologie des polymères gélatineux



- entre 0.5 et 2% agent de réticulation (résiste mal à la pression)
- **BATCH seulement** (pas de flux continu)
- Billes **translucides très denses** à l'état sec , diffusion est très lente
- La surface accessible est inférieure à $10 \text{ m}^2 / \text{g}$
- Bon solvant de gonflage diffusion favorisée ,
- Mauvais solvant : contraction/essorage
- **la bille gonfle d'autant plus que le % d'agent de réticulation est bas.**

Stress de la bille gélatineuse: explosion

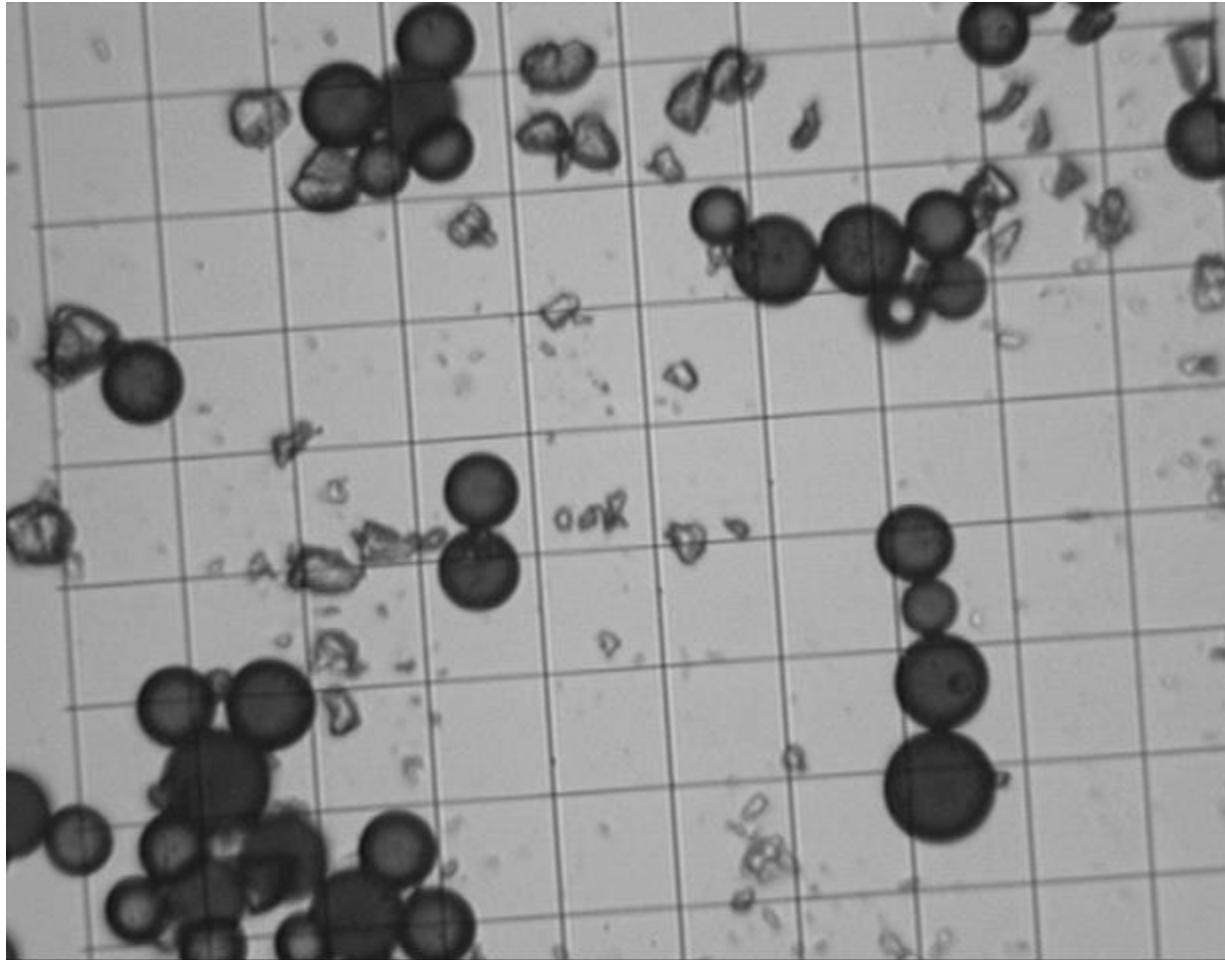


Choc osmotique avec un « essorage » violent

Mauvais solvants

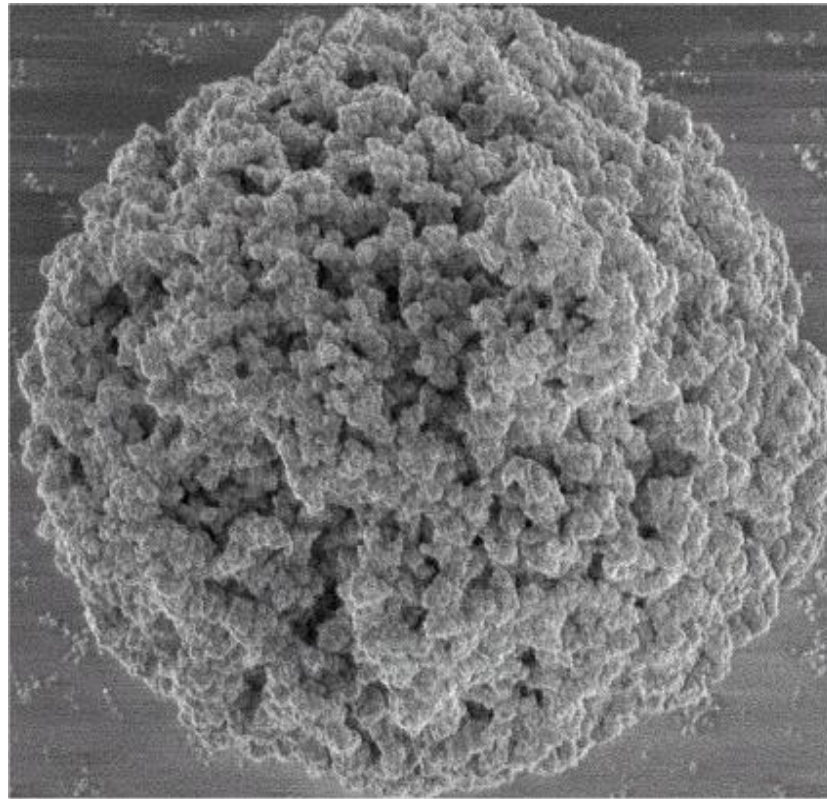
Risque accru si le diamètre est élevé

Stress de la bille gélatineuse: explosion

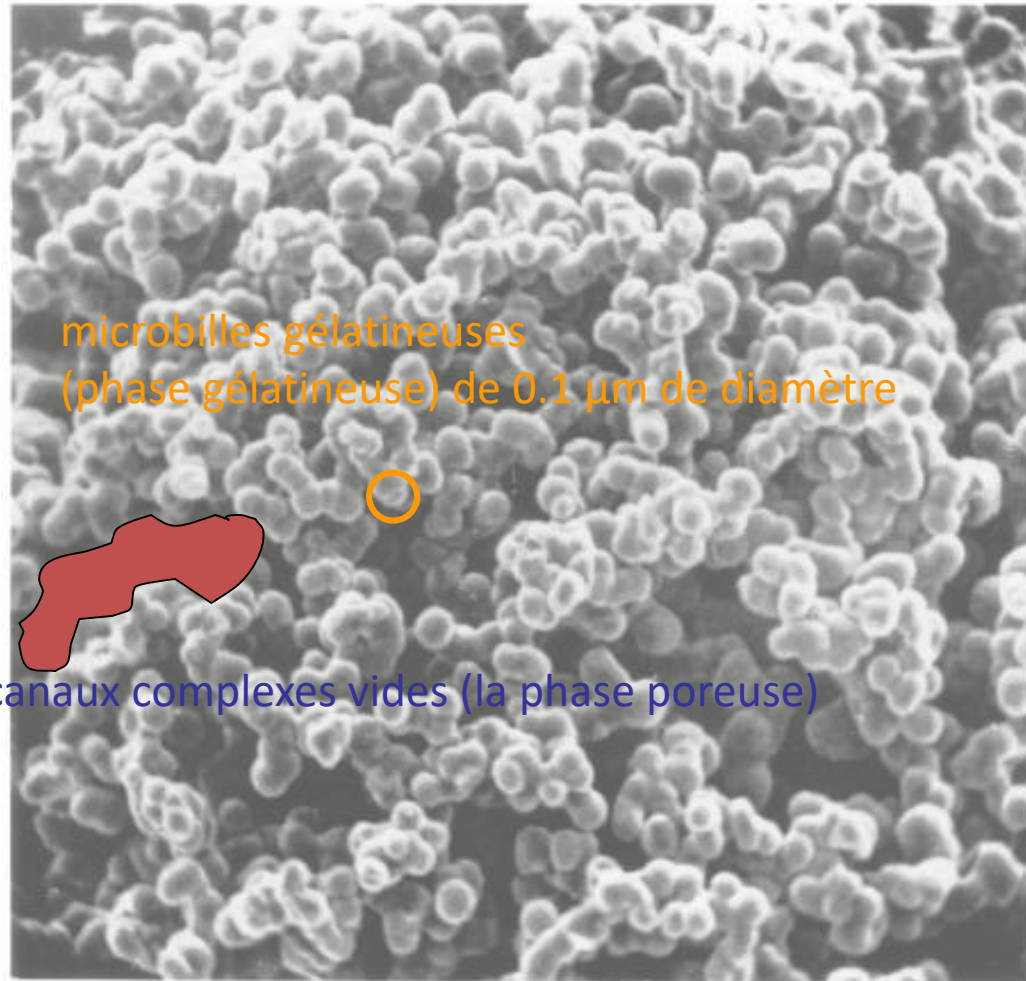


Polymères d'addition réticulés

Polymères macroporeux



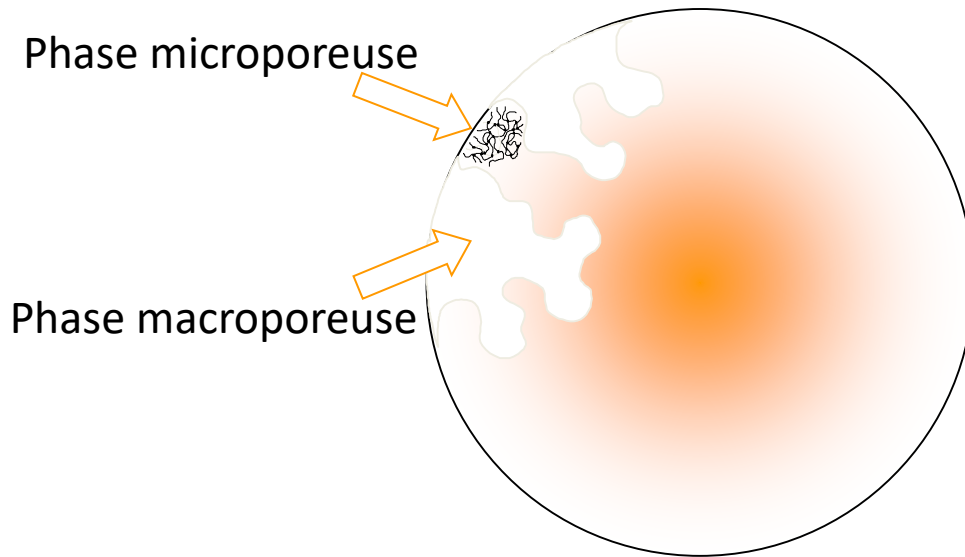
Morphologie des polymères macroporeux



microbilles gélatineuses
(phase gélatineuse) de 0.1 μm de diamètre

pores et canaux complexes vides (la phase poreuse)

Morphologie des polymères macroporeux

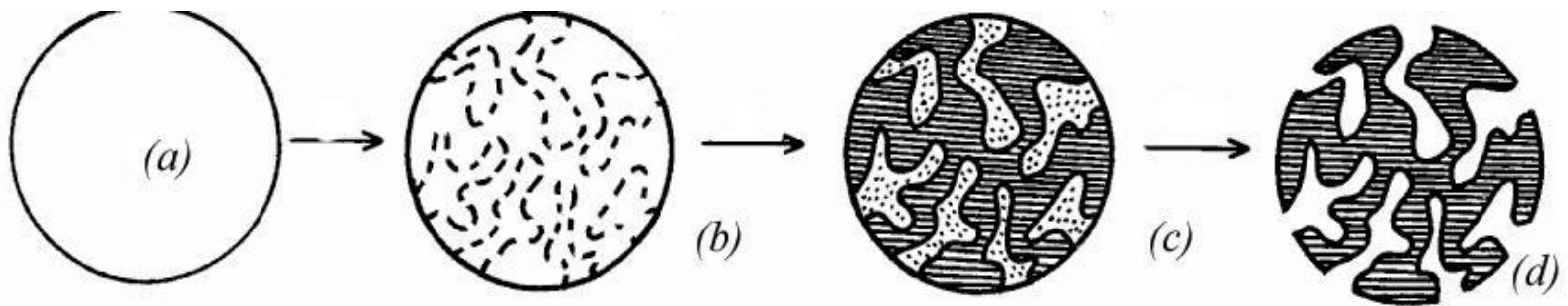


- Billes opaques et rugueuses qui **gonflent très peu ou pas**.
- La surface accessible est comprise entre 100-1000 m² /g **qqsoit solvant**
- Solide: Taux élevé d'agent de réticulation >12% (résiste à la pression)
- Adapté au flux continu
- Entrée et sortie des solvants facile: lavages rapides
- Utilisés pour les réactifs et catalyseurs supportés, les résines scavengers

Problèmes possibles si la synthèse est longue (peptides >25) dans les microbilles fortement réticulées

Morphologie des polymères macroporeux

Préparation



(a) mixture comonomérique + solvant organique (diluante et **porogène**).

Le taux de réticulant est élevé (il favorise la séparation de phases)

(b) Ce solvant permet la formation de deux phases

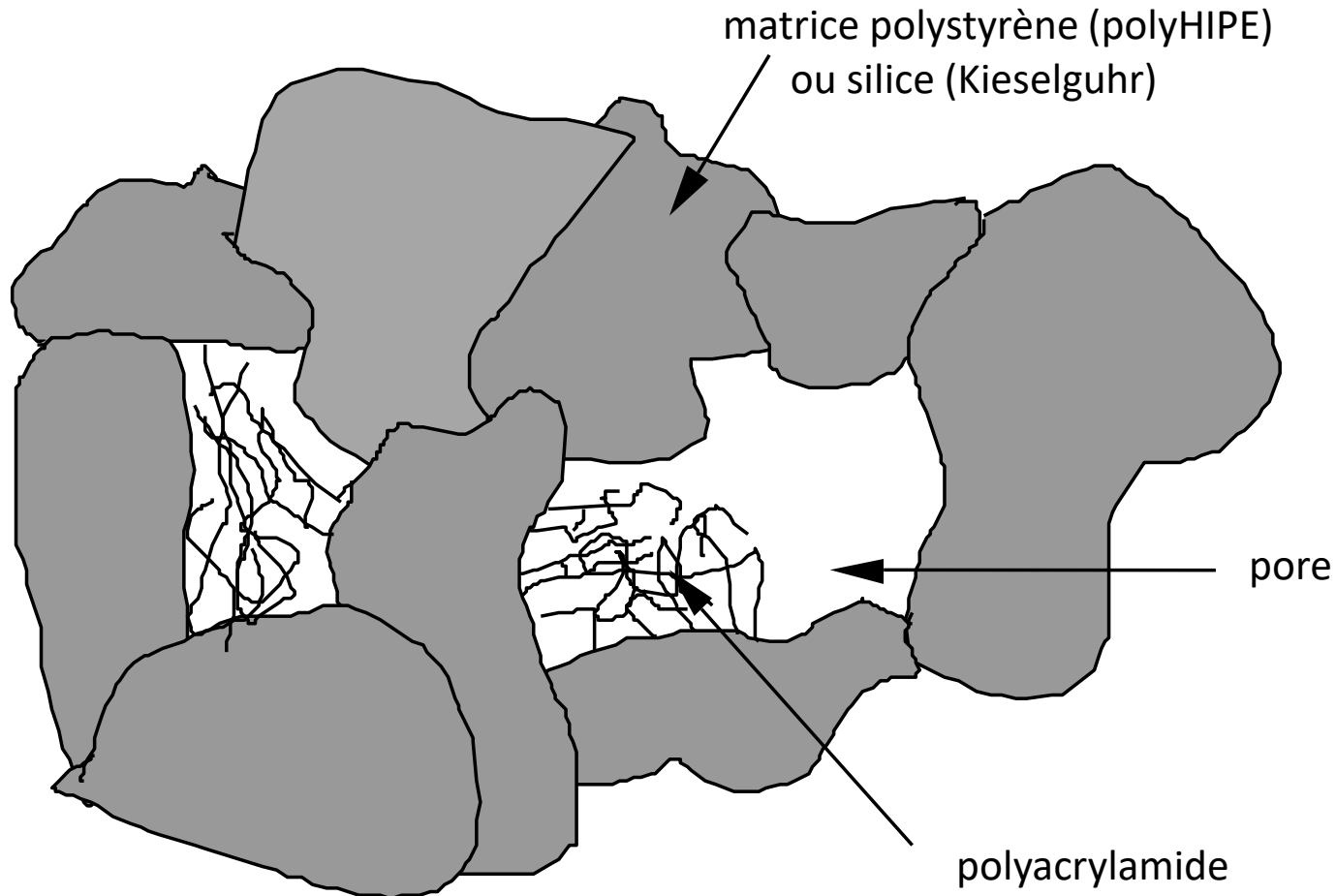
(c) pas de macrogélification totale

(d) le solvant est évaporé après la polymérisation

Polymères composites

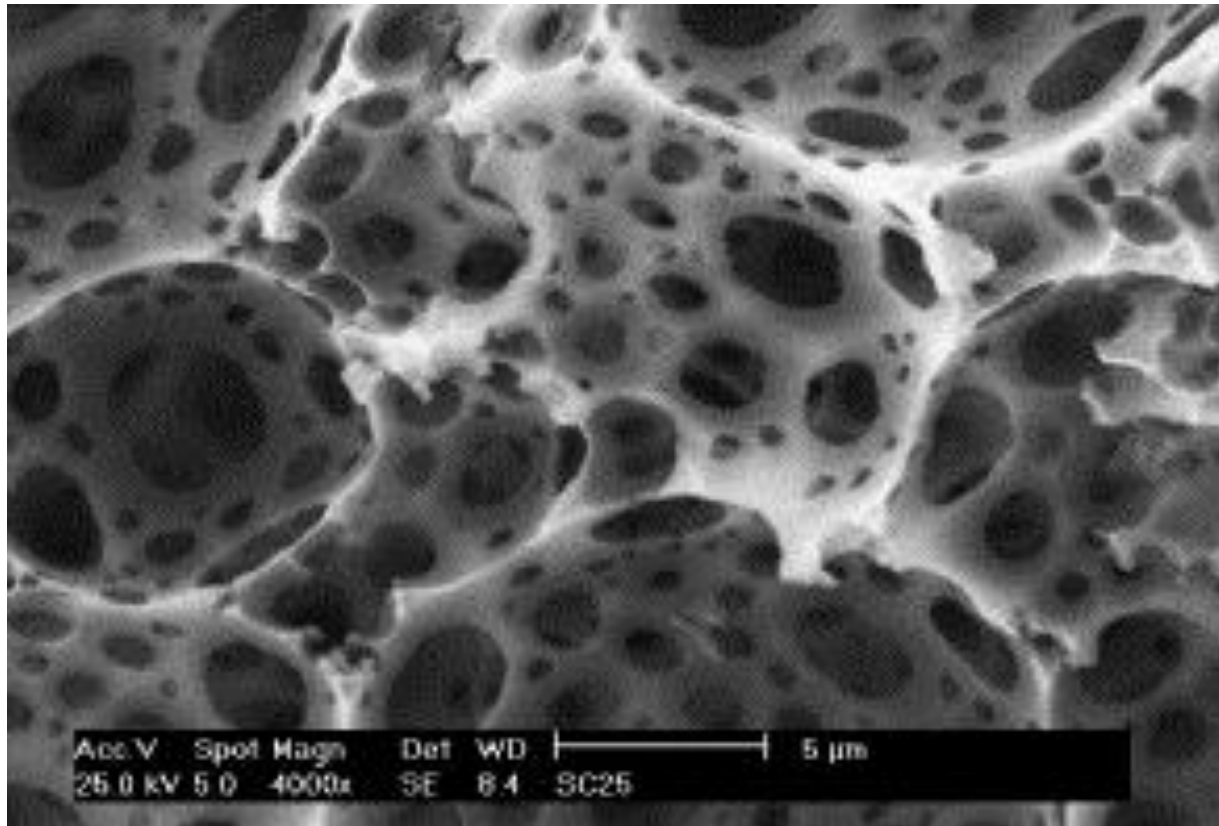
Première génération

Squelette très rigide et très poreux « rempli » de polyamide
Adapté à la synthèse de grosses molécules
Loading élevé (5 mmol/g)



Poly HIPE (polymers high internal phase emulsion)

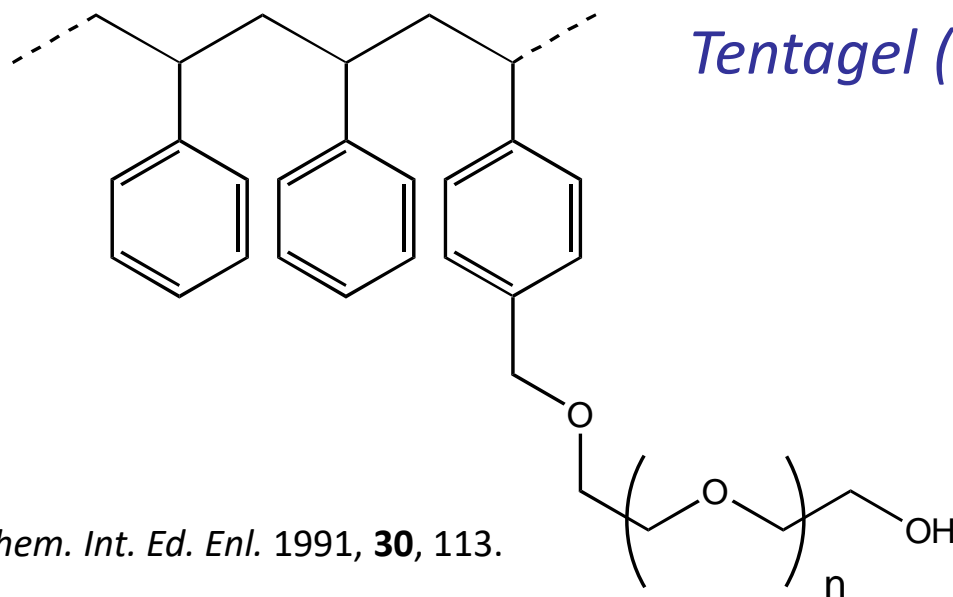
Utilisés comme phase stationnaire
ou comme supports catalytiques



Polymères composites seconde génération

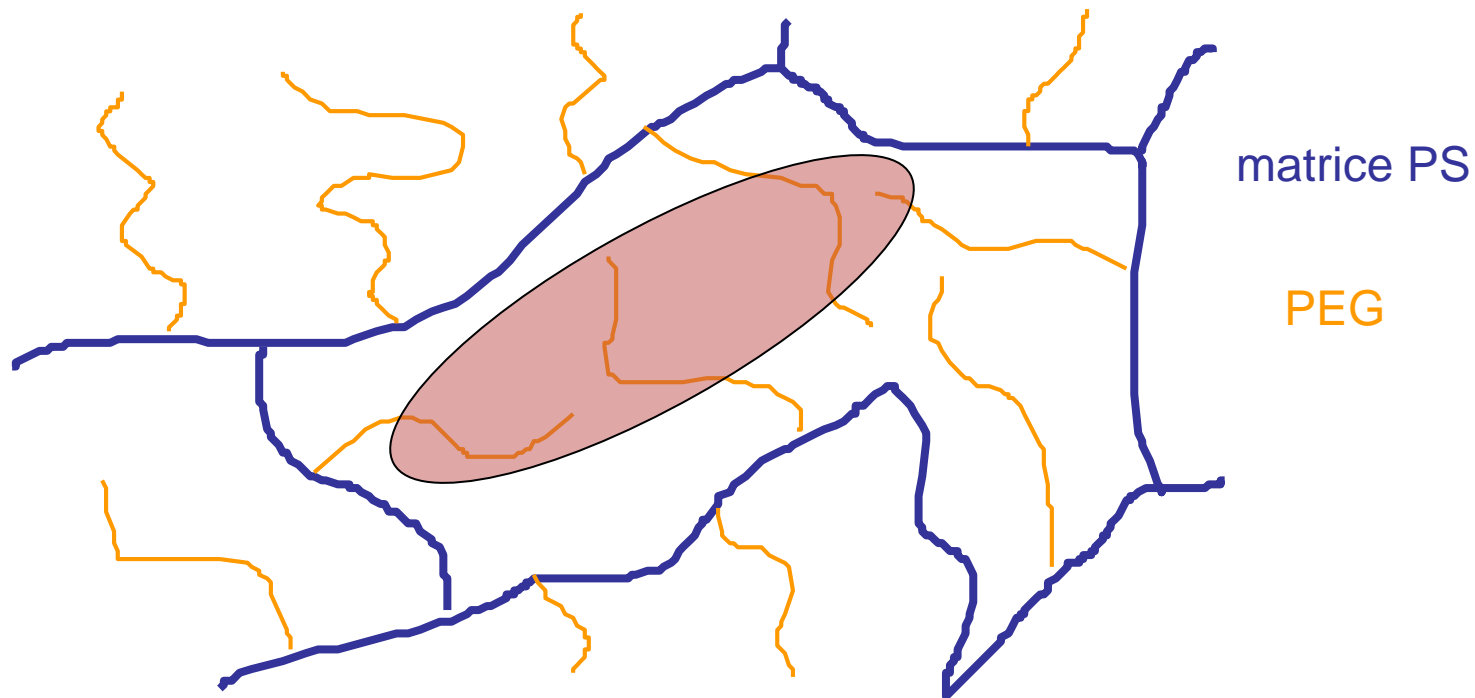
• PEG/PS

- PEG : 3000 à 20000Da
- Proportion de PEG élevé (70/30)
- DVB : 1 à 2%
- Hydrophile, compatible avec bcp de solvants
- Faible loading >0.8 mmol/g



E. Bayer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991, **30**, 113.

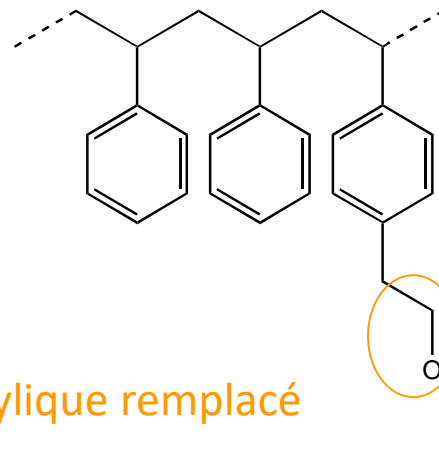
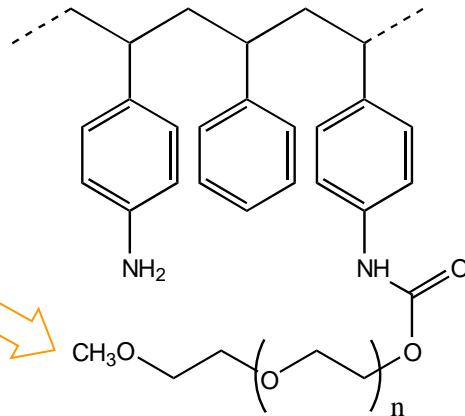
PEG PS: Microenvironnement hydrophile



	Eau	MeOH	CH ₂ Cl ₂	Toluene	DMF	MeCN	THF	Dioxane	Ether
Polystyrene 1% DVB	--	1.6	8.3	8.5	5.6	3.2	8.8	7.8	4.0
TentaGel HL 0.4- 0.6 mmol/g	3.1	3.6	5.7	4.1	4.6	3.9	4.2	4.8	2.4

Novagel (Novabiochem)

Point
d'ancrage
du linker

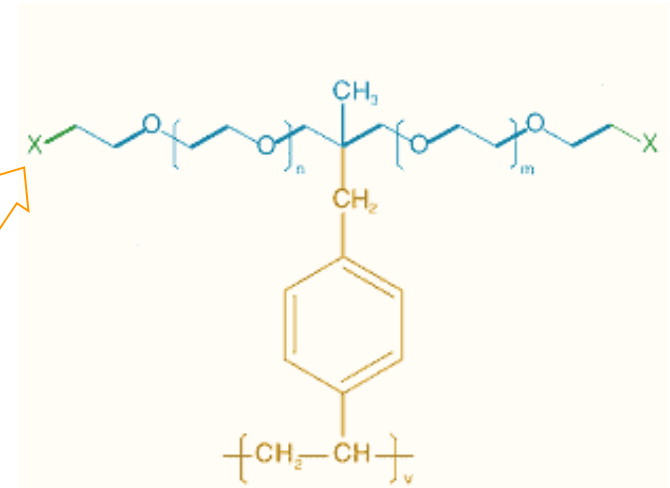


Lien benzylique remplacé

NovaSyn (Novabiochem)

Point d'ancrage
du linker

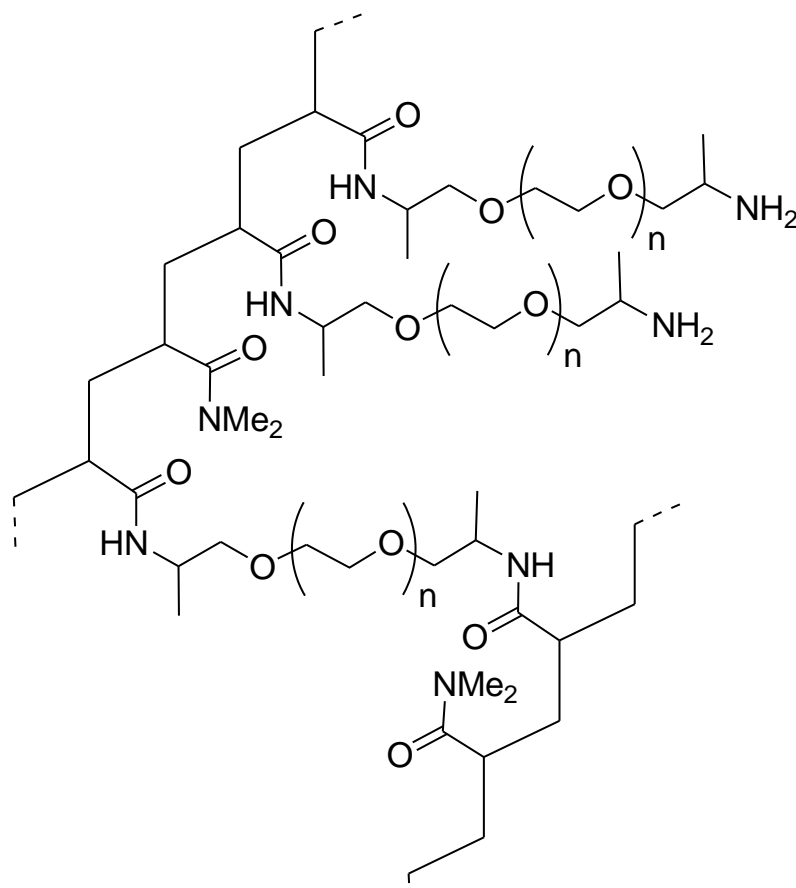
Argogel (Argonaut)



<http://www.novabiochem.com/docs/PROT/01-64-0285-000.pdf>
<http://www.argotech.com/products/resins/argogel.html>

PEGA: PEG-PA

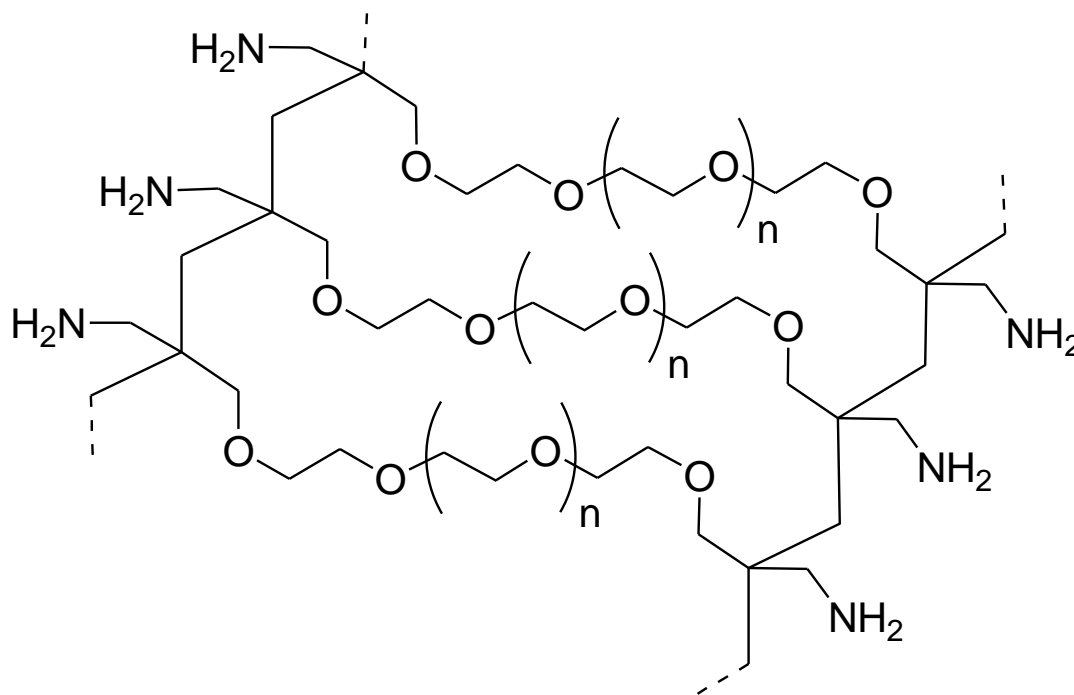
Utilisée pour la chromatographie d'affinité et pour les tests bio sur billes
(laisse passer les molécules >35 k: enzymes OK)



M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* 1992, **33**, 3077.

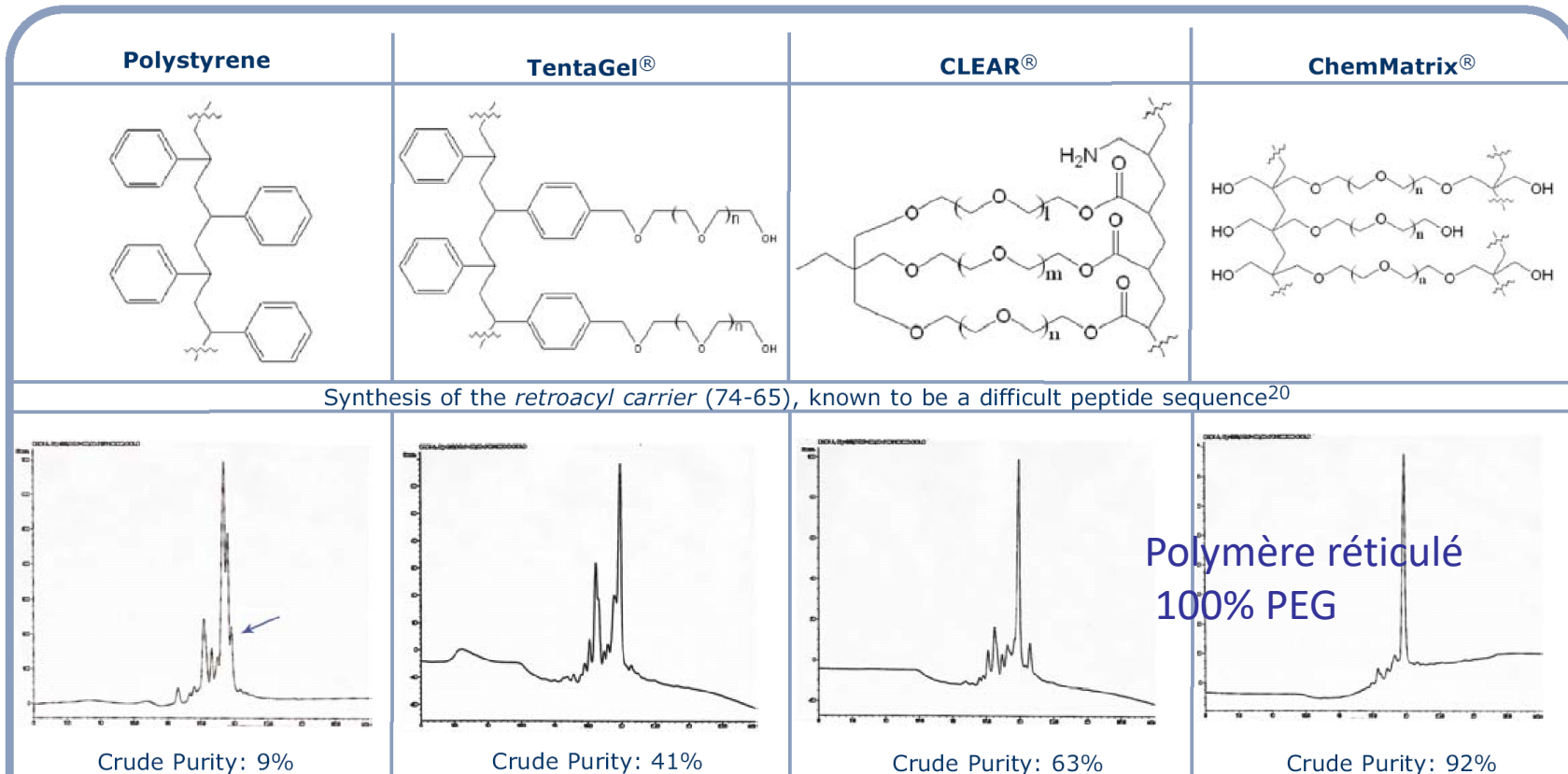
M. Meldal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, **91**, 3314.

Chemmatrix: PEG réticulé



F.Garcia-Martin, *J. Comb. Chem.* 2006, **8**, 213-220.

Influence de la matrice sur la qualité de SPSS



Polymère réticulé
100% PEG

Séquence modèle: H-Val-Gln-Ala-Ala-Ile-Asp-Tyr-Ile-Asn-Gly-OH

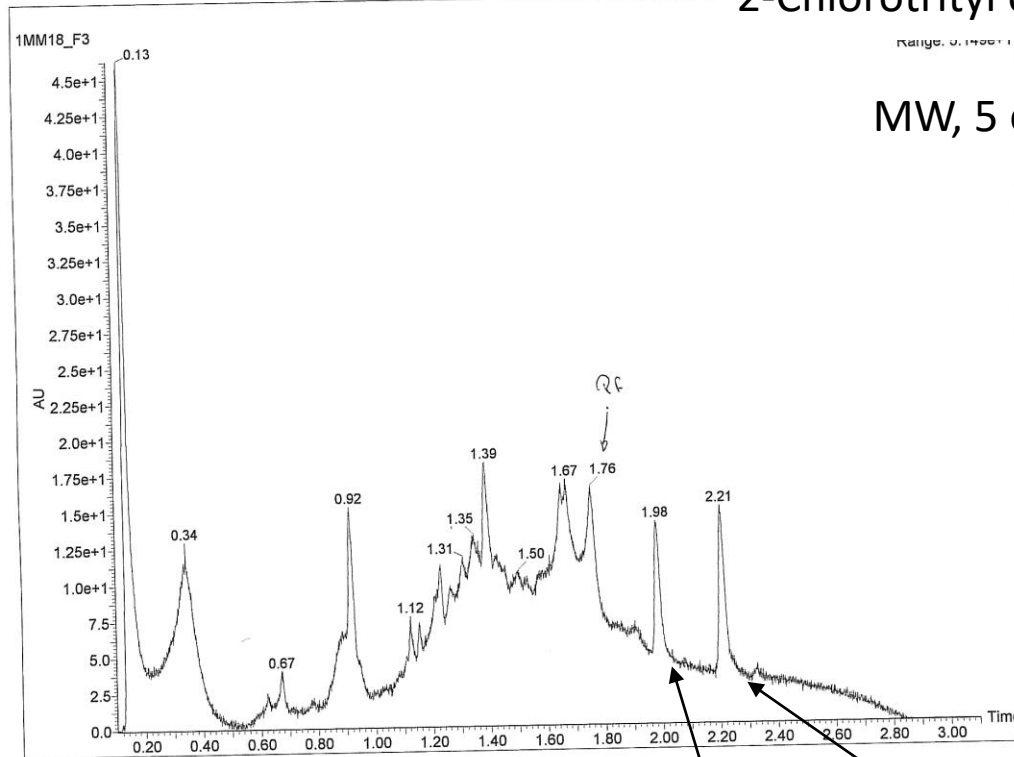
<http://www.boumdesign.qc.ca/matrix/chemmatrix.pdf>

LL-37

LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES

2-Chlorotrityl chloride PS

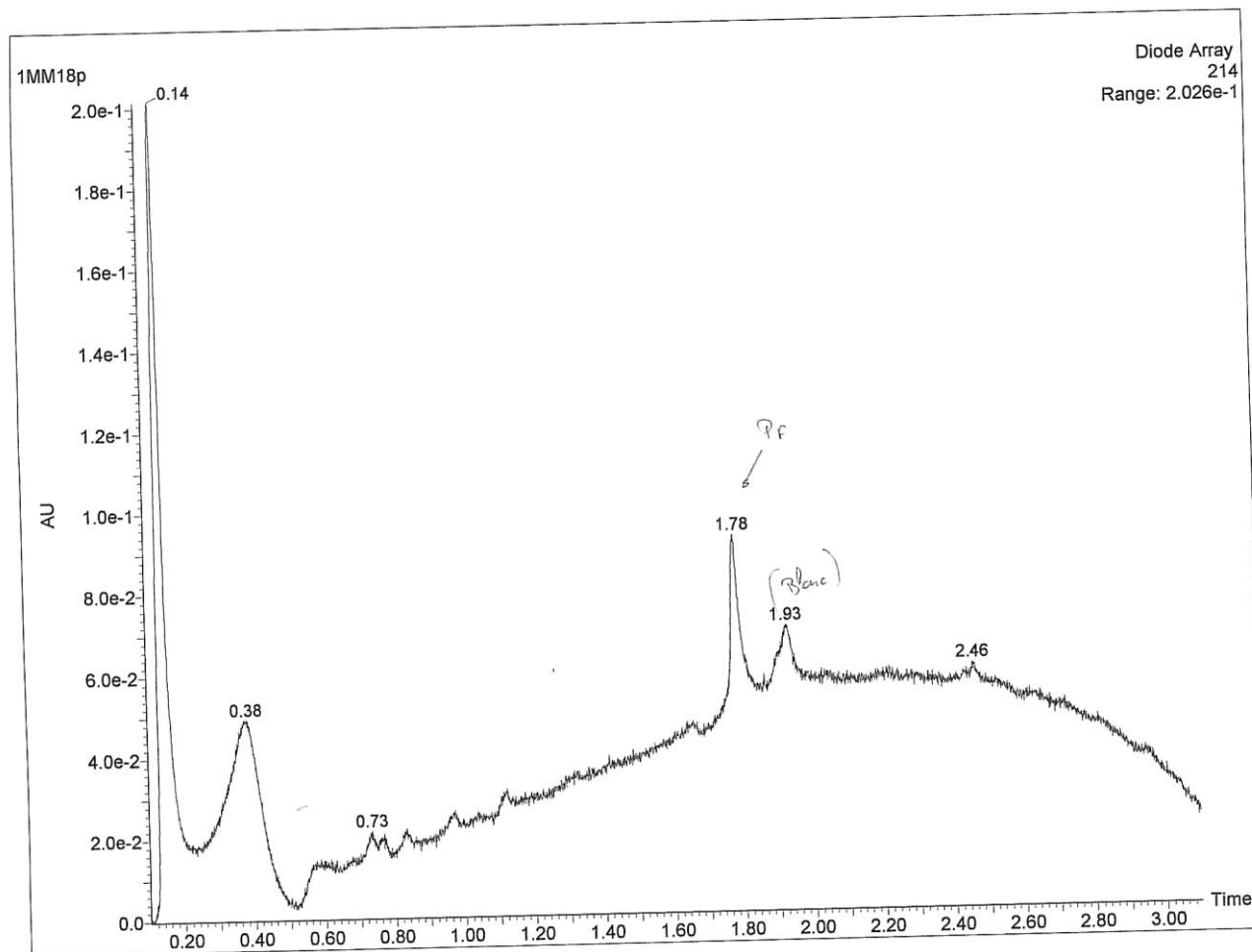
MW, 5 éq., 5 min



Trt

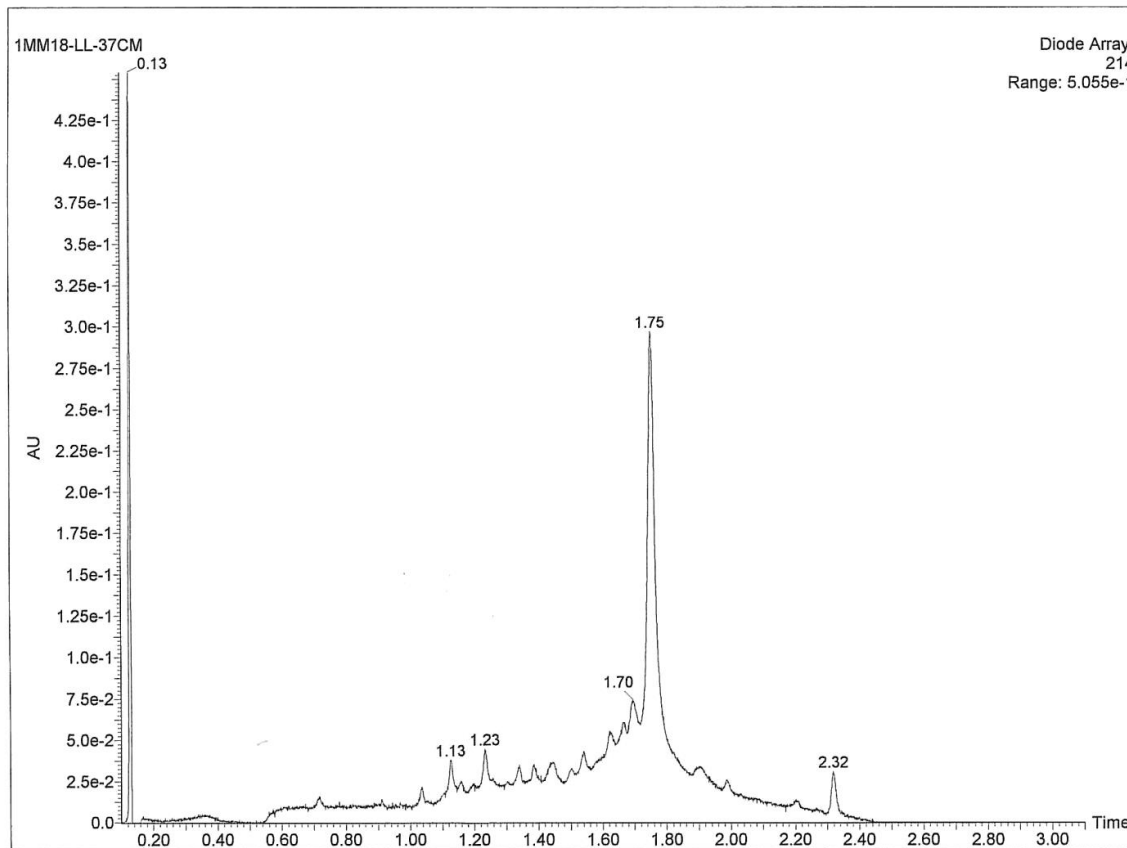
Pbf

Purif Autoprep LC/MS XBridge 19x100 mm



ChemMatrix HMPB

MW, 7 éq., 5 min

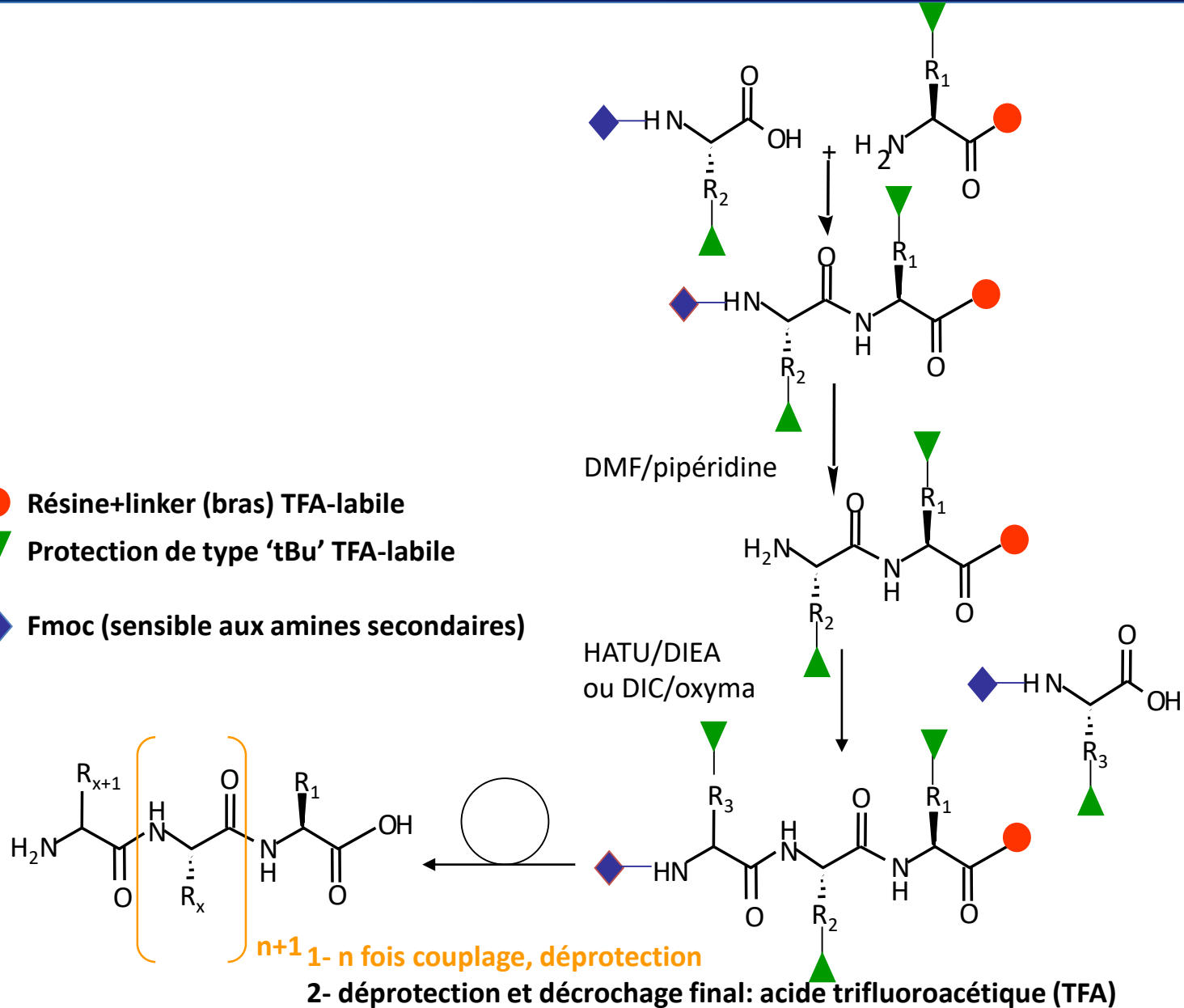


Choix des Résines pour la SPSS

- *Flux continu/batch* : PS gélatineux en batch, macroporeux en flux continu
- *Type* : peptide longs : PEG-PS ou PEGA ou 100% PEG
- *Charge* : 0.5 mmol/g maxi pour les peptides longs
- *Taille* : 200-400 mesh 100 mesh minimum.
- *Réticulation* : gélatineux : 0.5%-2% DVB
- *Gonflement* : solvants polaires aprotiques pendant le couplage. Alcools pour rétracter la bille gélatineuse
- *Agitation* : non mécanique
- *Stockage* : 4°C , suivant linkers

Choix des linkers

- Résine+linker (bras) TFA-labile
- ▼ Protection de type 'tBu' TFA-labile
- ◆ Fmoc (sensible aux amines secondaires)



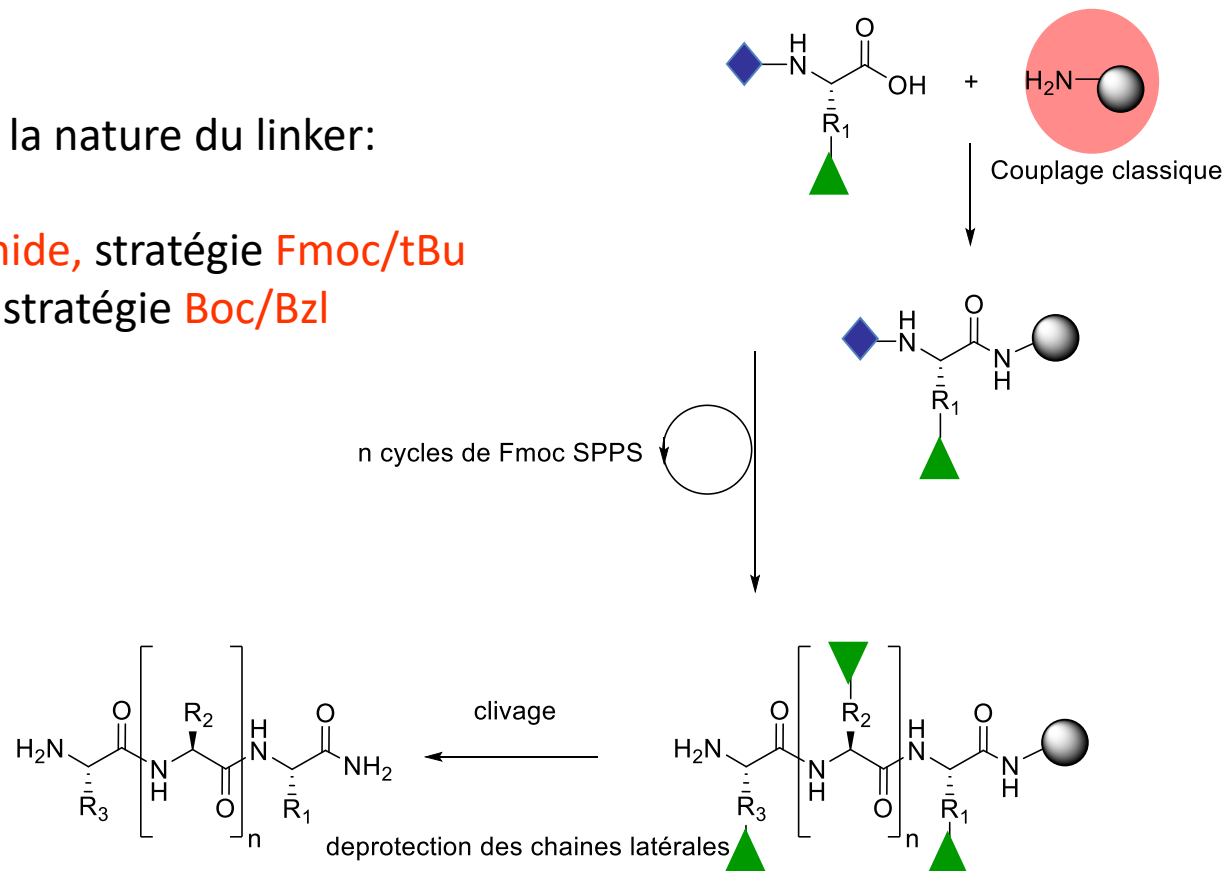
Synthèse de peptides amides

Ancrage de la fonction acide C-terminale sur linker amine pour former un amide

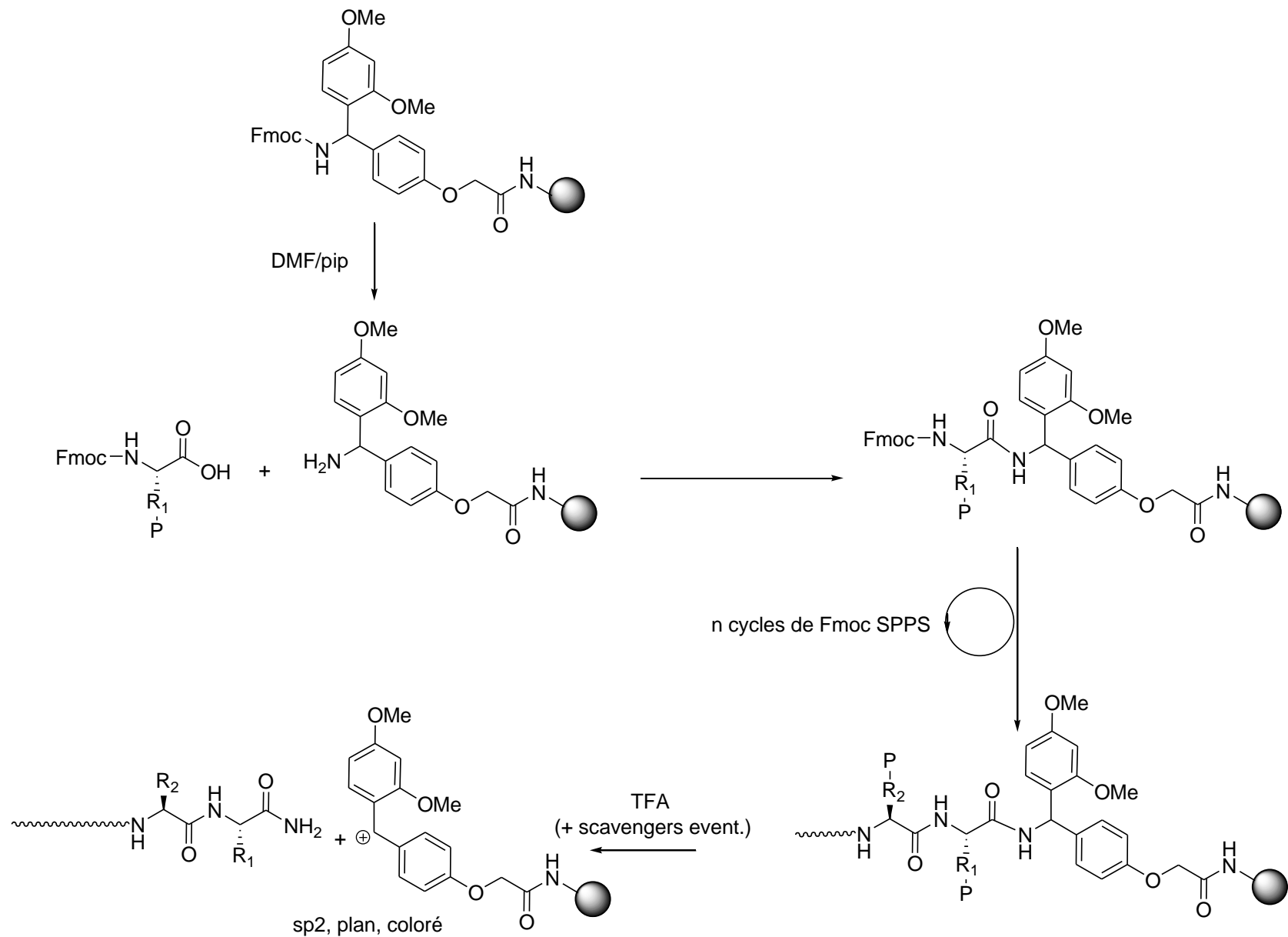
Suivant la nature du linker:

Rink amide, stratégie Fmoc/tBu

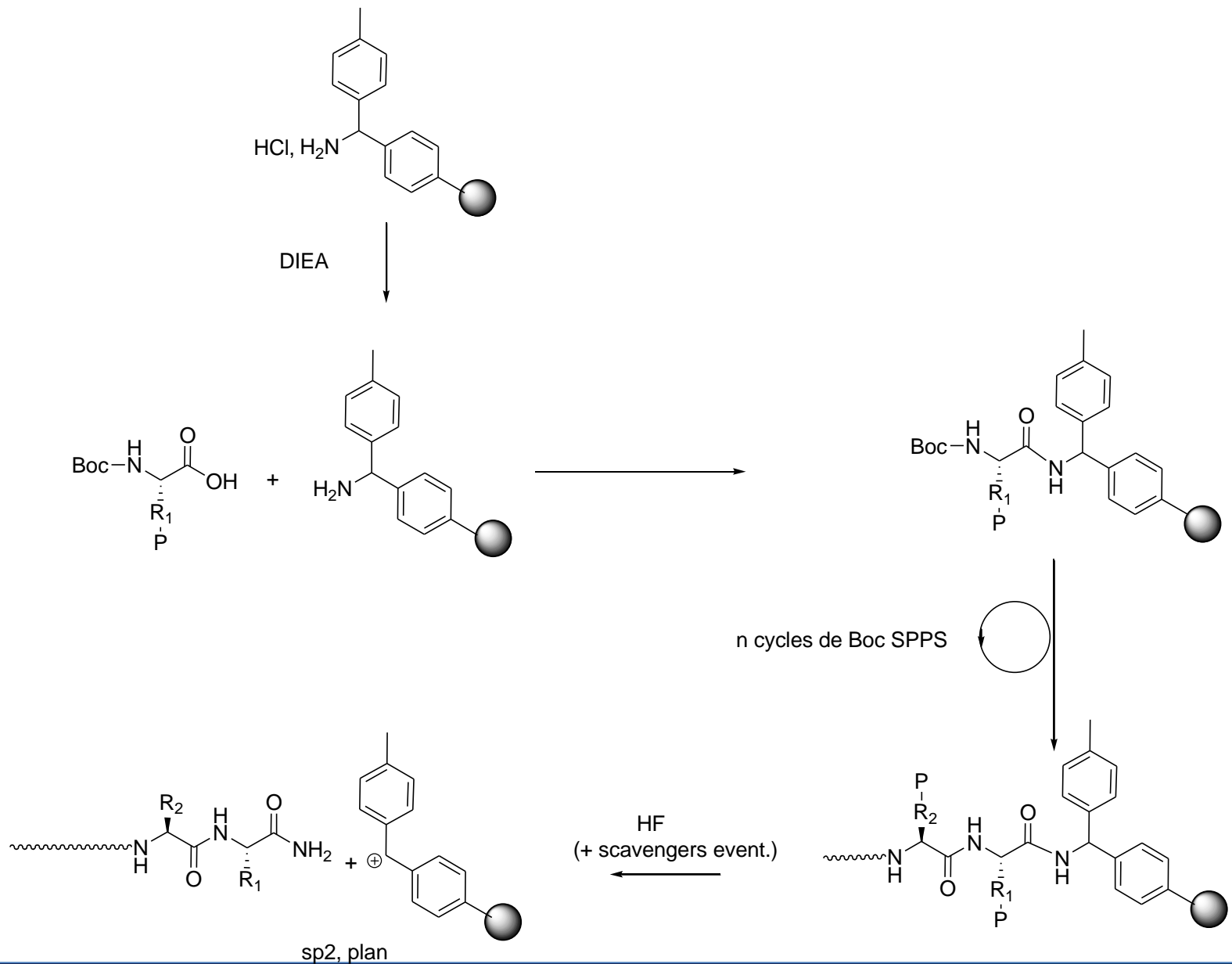
MBHA, stratégie Boc/Bzl



Linker Rink amide Stratégie Fmoc/tBu

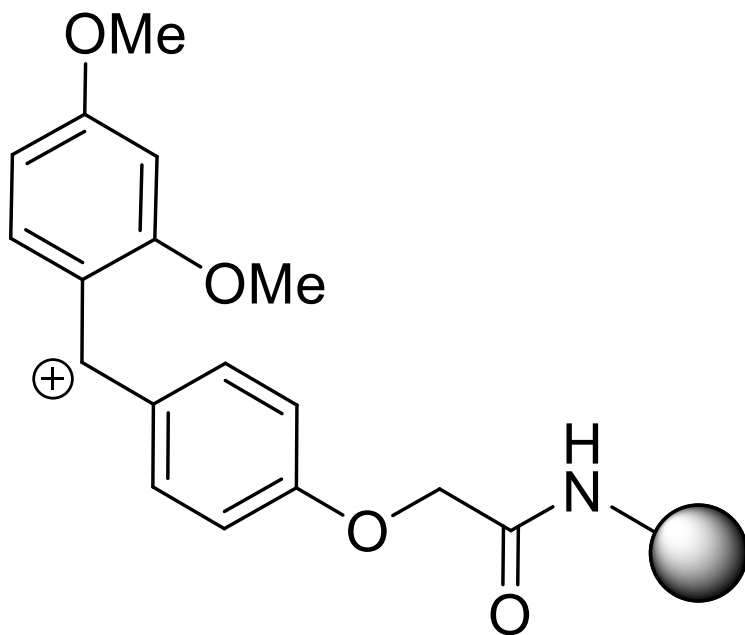


Linker MBHA Stratégie Boc/Bzl



Stratégie Fmoc

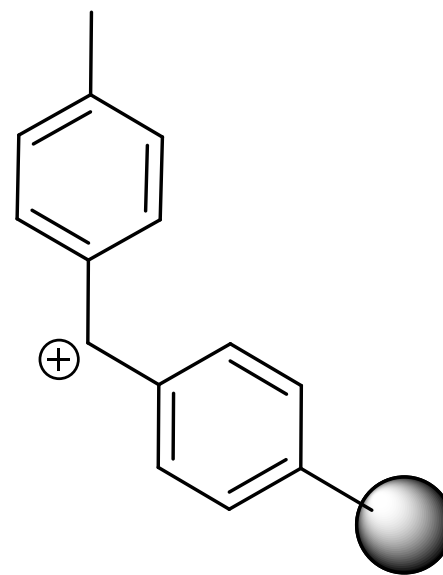
Fmoc-rink amide linker-résine



Carbocation stabilisé:
Formation 95% TFA

Stratégie Boc

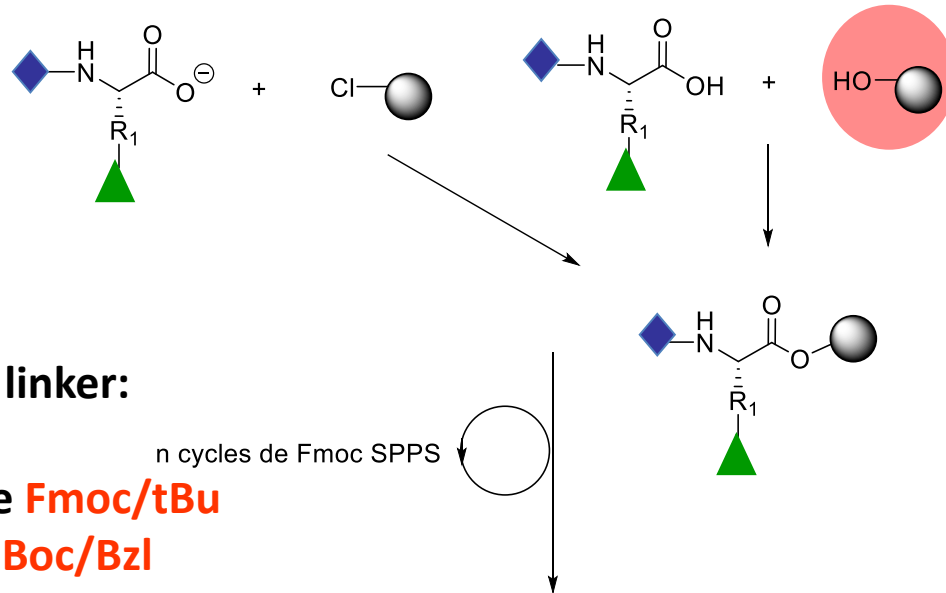
MBHA (methyl benzhydrylamine)-PS



Carbocation peu stabilisé:
Formation HF ou TFMSA

Synthèse de peptides acides

Ancrage de la fonction acide C-terminale sur linker pour former un ester

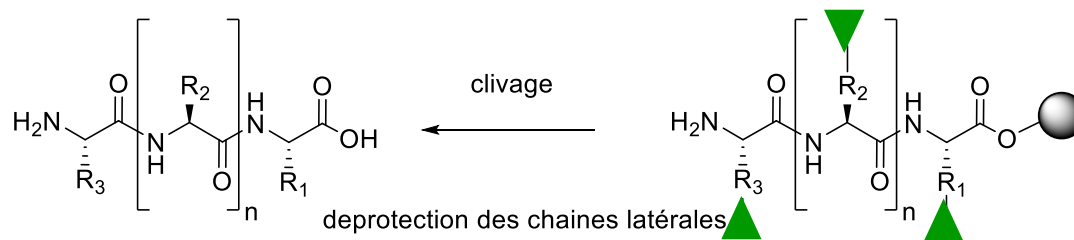


Suivant la nature du linker:

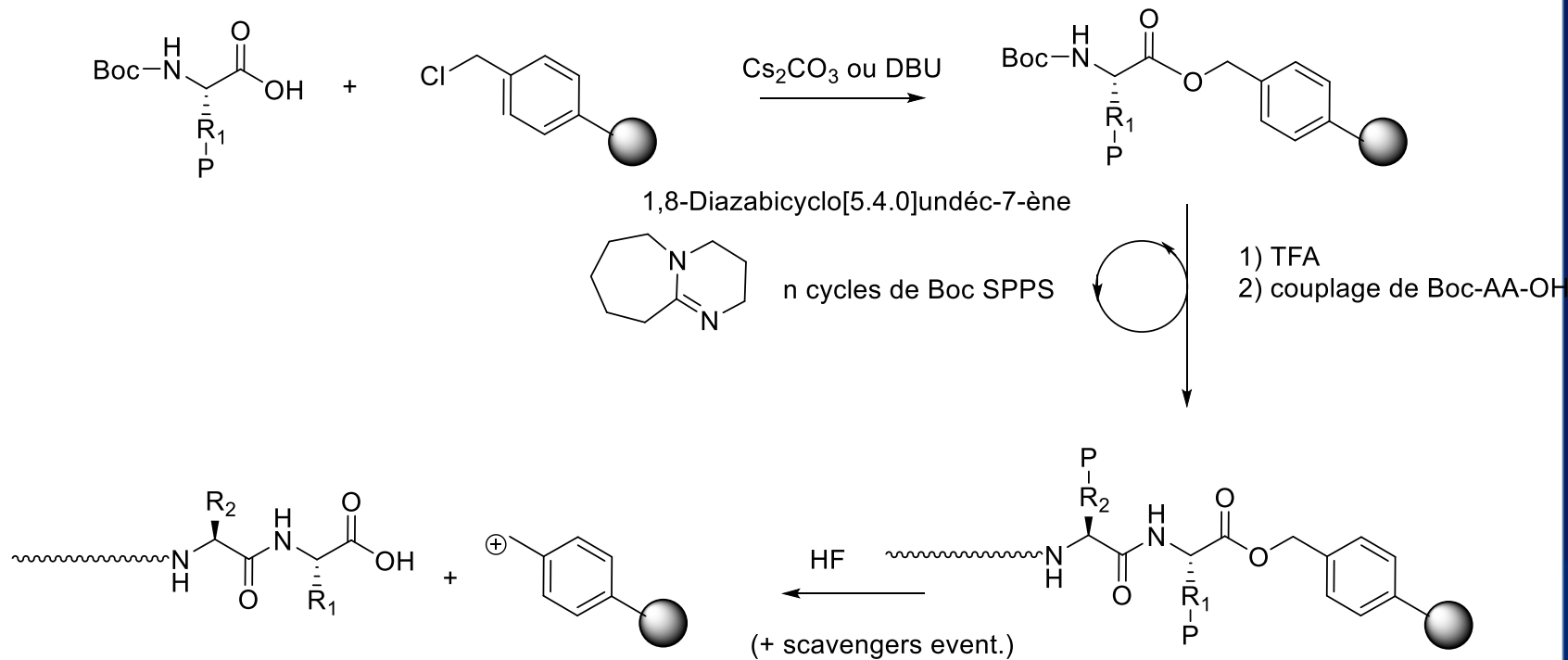
n cycles de Fmoc SPPS

Wang, trityl stratégie Fmoc/tBu

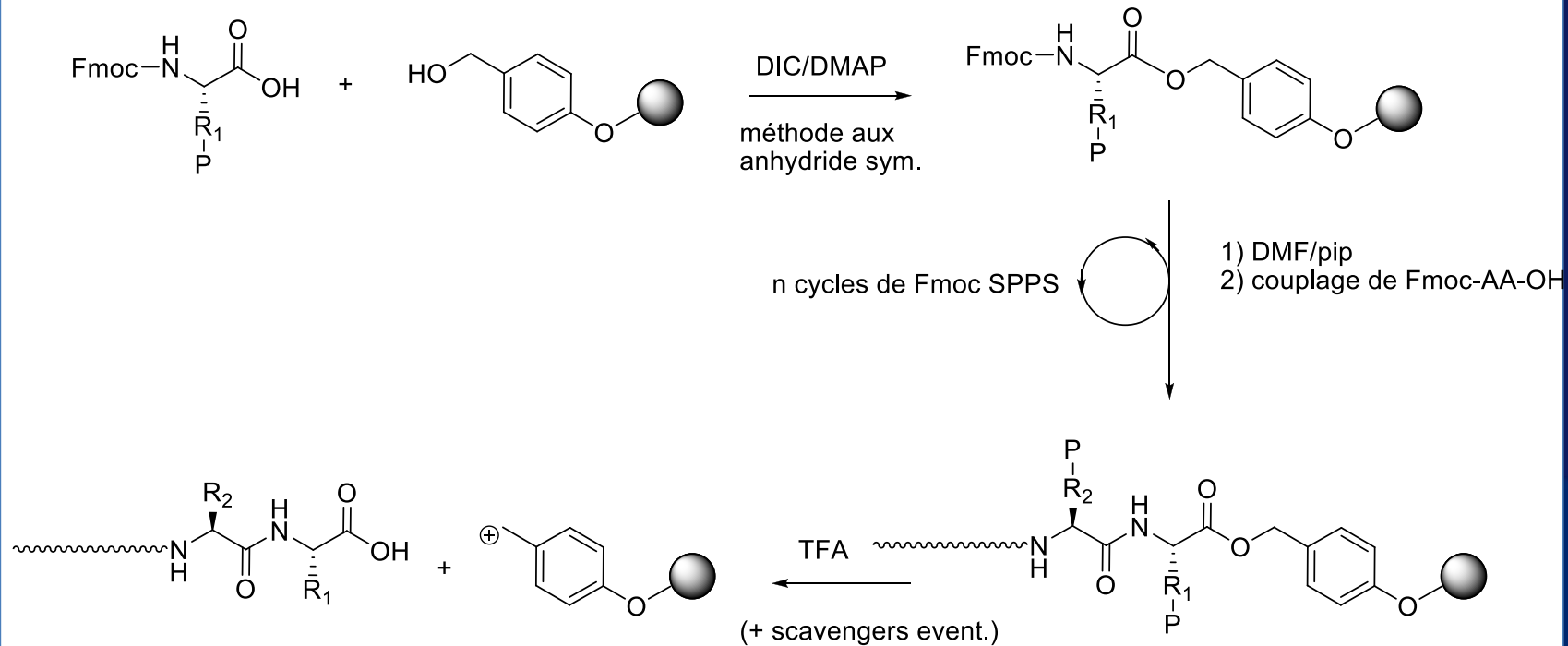
Merrifield, stratégie Boc/Bzl



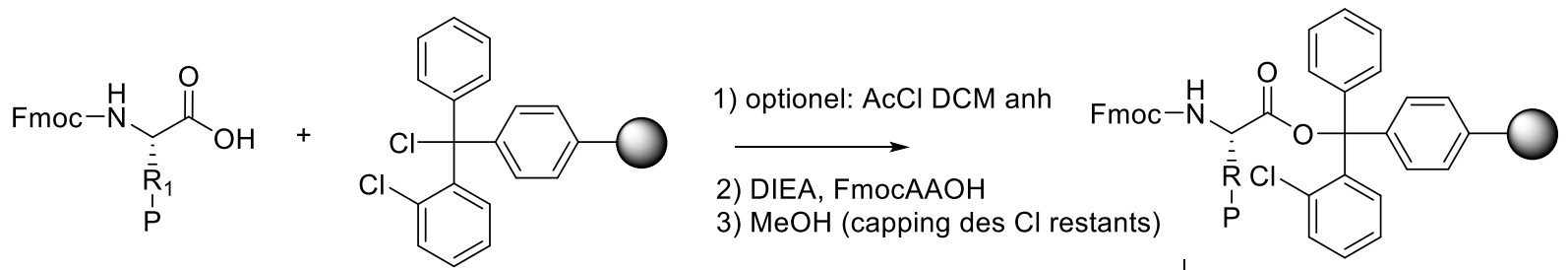
Linker Chloromethylbenzyl (Merrifield resin) Stratégie Boc



Linker wang (hydroxymethylphenoxy-) Stratégie Fmoc/tBu

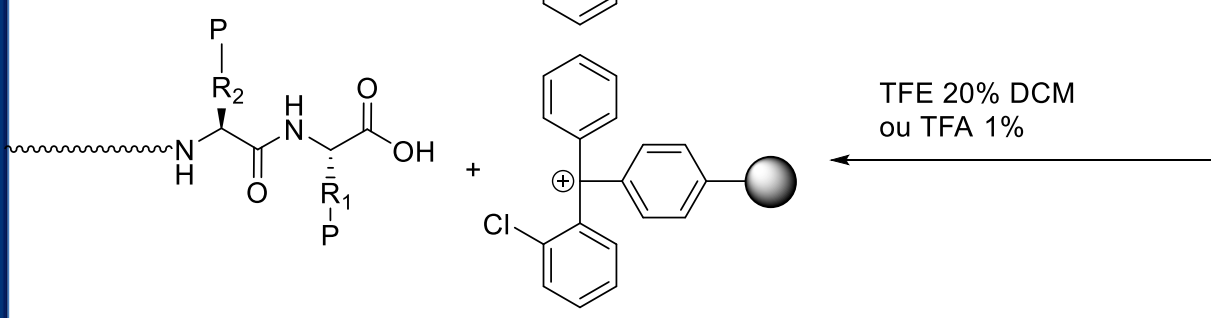
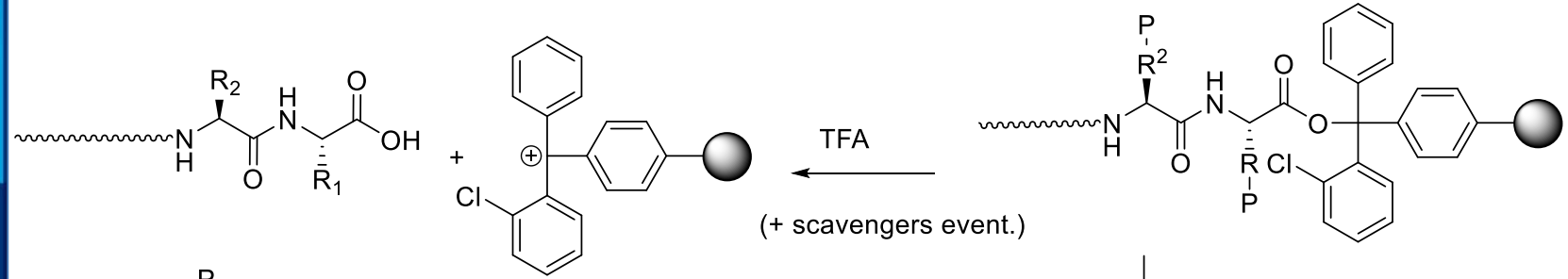


Linker 2 chloro chlorotriptyl Stratégie Fmoc/tBu

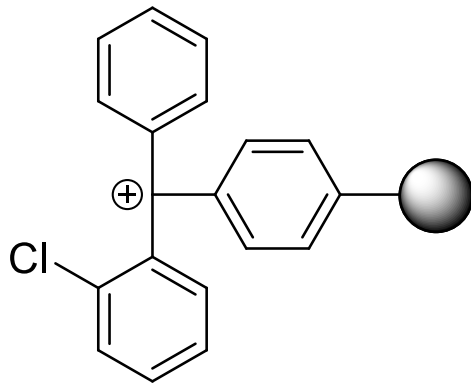


n cycles de Fmoc SPPS

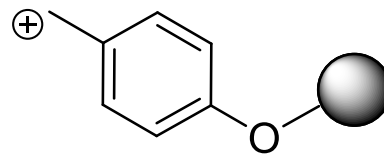
1) DMF/pip
 2) couplage de Fmoc-AA-OH



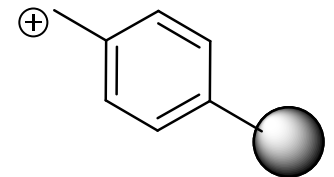
Acido labilité des linkers et stratégies



Carbocation plus stabilisé:
Formation plus facile
1-5% TFA
ou 20% TFE

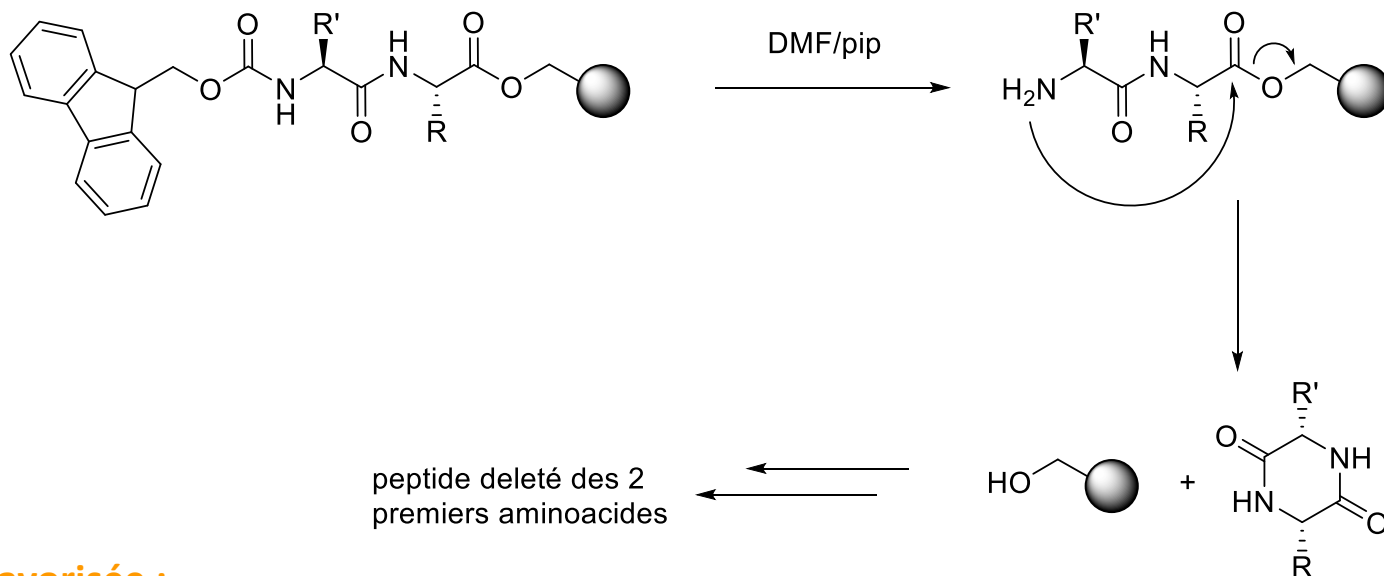


Carbocation moins stabilisé:
Formation >95%
TFA



Carbocation peu stabilisé:
Formation HF ou
TFMSA

Reaction secondaire: formation de dicetopiperazine



DKP favorisée :

- esters favorables aux attaques nucléophiles

Obzl et résines apparentées Merrifield, Wang et surtout HMBA (sensible aux attaques Nu)...
alternance L/D (H-L-AA₁-D-AA₂-OLinker),

R₁ et R₂ sont opposés par rapport au plan de la DKP.

N-Me aminoacides

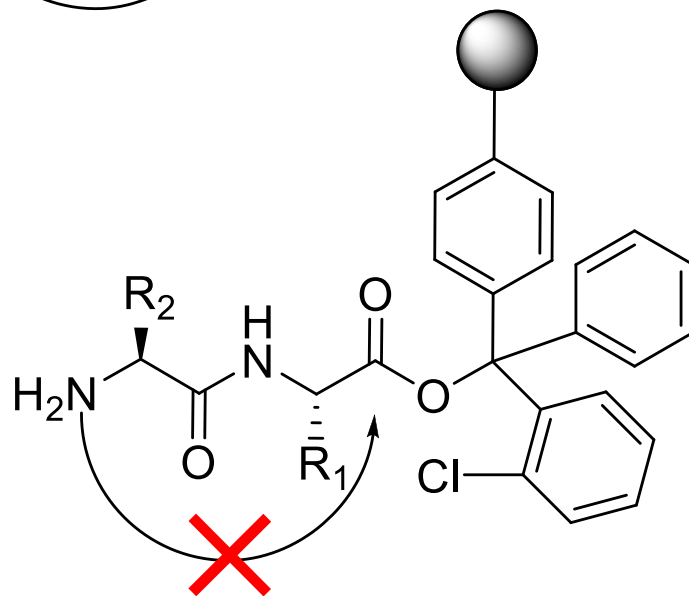
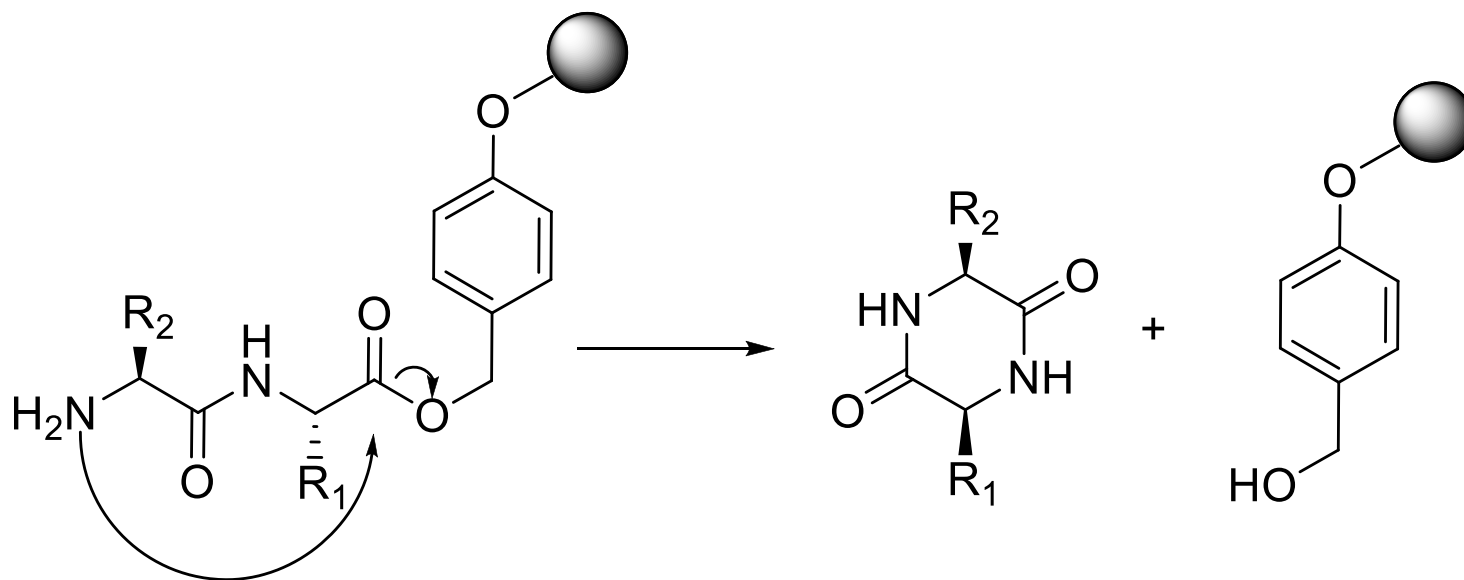
- Gly et/ou Pro
- Milieu basique pendant la déprotection (stratégie Fmoc)

DKP évitée ou minimisée

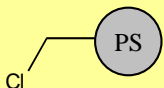
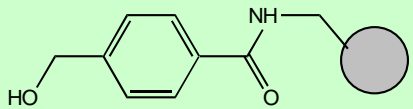
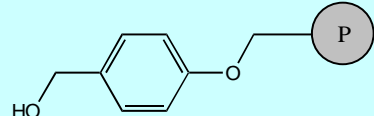
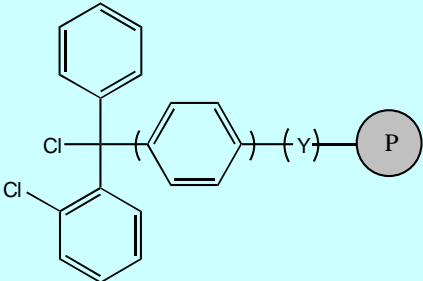
sur support solide : résine encombrée de type Trityl (en stratégie Fmoc)

- Si l'amine reste salifiée (en stratégie Boc)
- Coupler directement un dipeptide sur le premier aminoacide (possible si Gly/Pro)

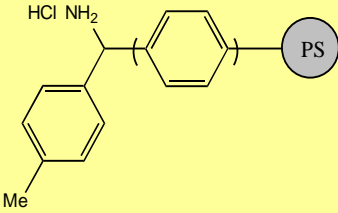
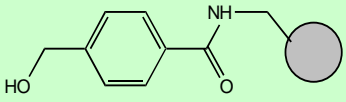
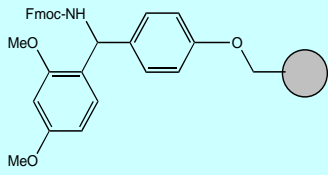
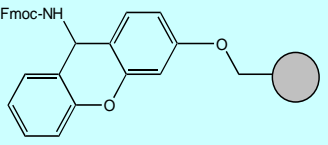
Protection contre la DKP: linker chlorotrityl



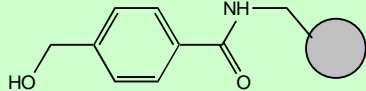
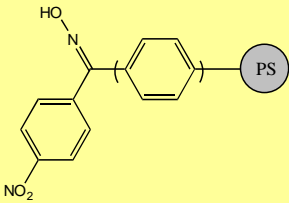
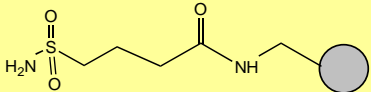
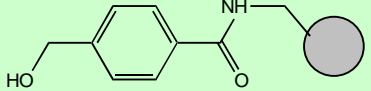
Linkers pour peptides C ter-acides

<p>Chloromethyl PS (Résine de Merrifield)</p>		<p>Méthode de Gisin Cs₂CO₂ ou DBU</p>	<p>HF ou TFMSA</p>
<p>HMBA <i>Utilisable en stratégie Fmoc et Boc (résiste au TFA et à pipéridine)</i></p>		<p>(RCO)₂O DMAP Ou MSNT activation forte</p>	<p>Soude 1h ou TEA 6h</p>
<p>HMPA (si P=PS, résine de « Wang »)</p>		<p>(RCO)₂O DMAP Ou MSNT activation forte</p>	<p>TFA 95%</p>
<p>2-chloro chloroTrityl <i>permet la synthèse de peptides avec des chaînes latérales protégées</i> PS : Y=rien ou OCH₂⁻ PA : Y=CONHCH₂⁻</p>		<p>RCOOH, DIPEA</p>	<p>TFA 1% ds DCM TFE/DCM 30/70 2heures Pour libérer les peptides protégés TFA 95% pour libérer les peptides déprotégés</p>

Linkers pour peptides C ter-amides

<p>MBHA (4-Methylbenzhydrylamine) <i>n'existe qu'en PS</i></p>		<p>Couplage classique après neutralisation</p>	<p>HF ou TFMSA</p>
<p>HMBA <i>Utilisable en stratégie Fmoc et Boc (résiste au TFA et à pipéridine)</i></p>		<p>(RCO)₂O DMAP Ou MSNT activation forte</p>	<p>NH₄OH</p>
<p>Rink amide</p>		<p>Couplage classique après déprotection du Fmoc</p>	<p>TFA 95%</p>
<p>Sieber amide permet la synthèse de peptides amides avec des chaînes latérales protégées</p>		<p>Couplage classique après déprotection du Fmoc</p>	<p>TFA 1% ds DCM</p>

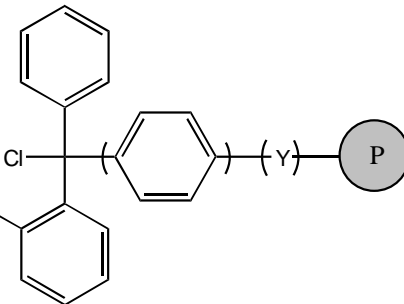
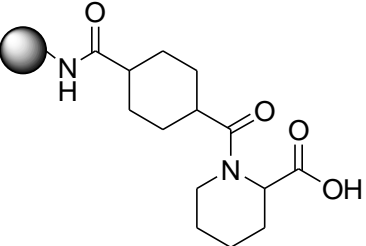
Linkers pour peptides ester et thioesters, peptides alcools

HMBA		$(\text{RCO})_2\text{O}$ DMAP Ou MSNT activation forte	ROH + DIPEA
Kaiser Oxime		$(\text{RCO})_2\text{O}$ DMAP activation forte	ROH (RSH) + DBU <i>thioacide avec TbuNH_4^+ F^-, $(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{S}$</i>
4-Sulfamylbutyryl (Safety catch)		DIC, N-Melm ou PyBop	1) activation I- CH_2CN ou TMS CH_2CN 2) RSH
HMBA pour alcools		$(\text{RCO})_2\text{O}$ DMAP activation forte	NaBH_4 , EtOH

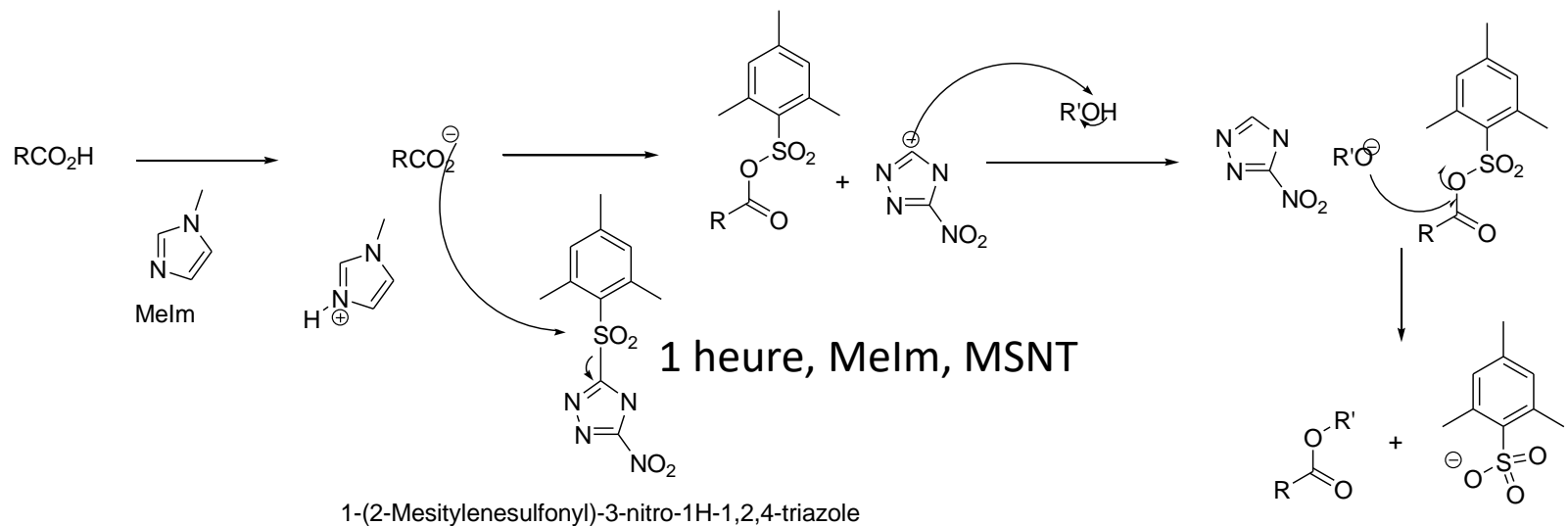
Linkers pour Peptides Cter amides secondaires

<p>BAL 4(4formyl-3methoxyphenoxy) butyryl et dérivés</p>		<p>1) amination red. NaBH₃CN 2) Acylation</p>	<p>TFA 95%</p>
<p>4-Sulfamylbutyryl (Safety catch)</p>		<p>DIC, N-Melm ou PyBop</p>	<p>1) activation I-CH₂CN ou TMS CH₂CN 2) RNH₂</p>

Linkers pour peptides hydrazides, amines, alcools

<p>2-chloro chloroTrityl <i>permet la synthèse de peptides avec des chaînes latérales protégées</i> PS :Y=rien ou OCH₂- PA :Y=CONHCH₂-</p>		<p>RR'NH ou ROH, DIPEA</p> <p>Ou NH₂NH₂ puis couplage (peptide hydrazides)</p>	<p>TFA 1% ds DCM TFE/DCM 30/70 2heures Pour libérer les peptides protégés</p> <p>TFA 95% pour libérer les peptides déprotégés</p>
<p>Pipecolic linker</p>		<p>RR'NH ou ROH, BOP, DIEA</p> <p>Ou NH₂NH₂ BOP, DIEA puis couplage (peptide hydrazides)</p>	<p>TFA 95% pour libérer les peptides déprotégés</p>

Formation d'un lien ester sur support solide avec MSNT



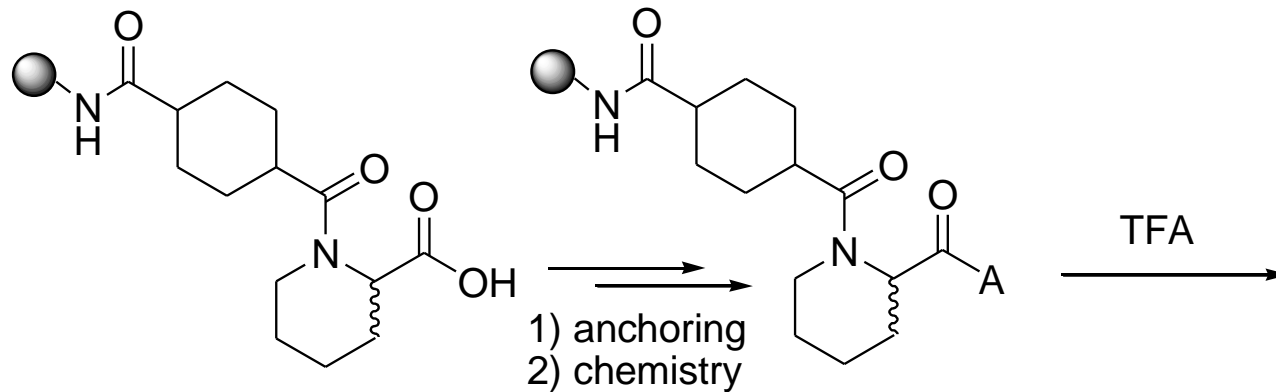
B. Blankemeyer-Menge, et al. (1990) *Tetrahedron Lett.*, **31**, 1701.

J. Nielsen (1996) *Tetrahedron Lett.*, **37**, 8439.

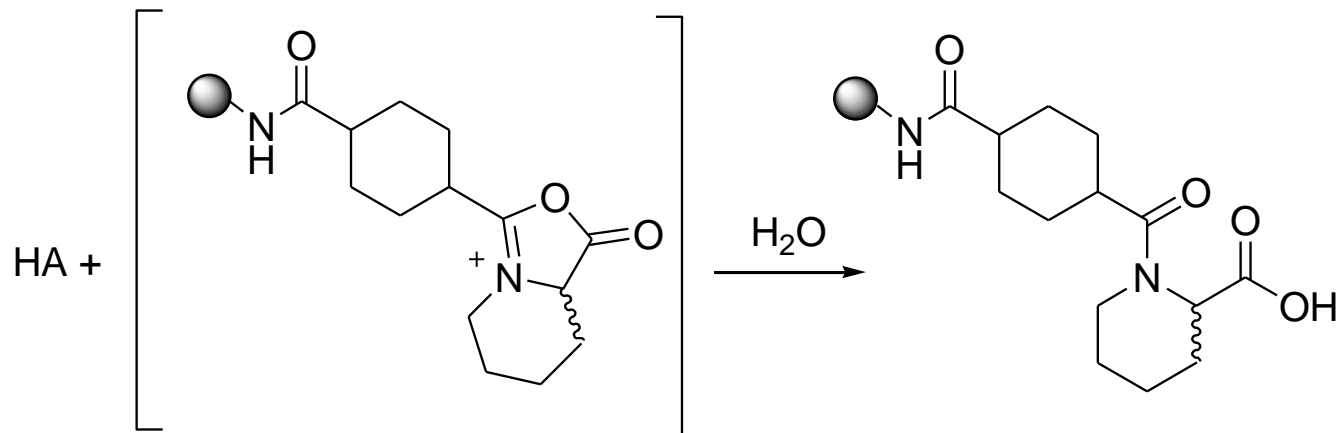
Ici R'OH= resine alcool. Peu d'épimerisation

	Fmoc AA eq.		DMAP	NMM	Melm	t(min)	% (D)	Rdt%
27	Lys(Boc)	5	HOBt-ester			60	0.9	83
28	"	5	symm. anhydride			60	16.0	97
29	"	2	symm. anhydride	1		30	1.0	44
30	"	2	MSNT		4	25	3.0	100
31	"	2	MSNT		1.5	30	<0.2	72

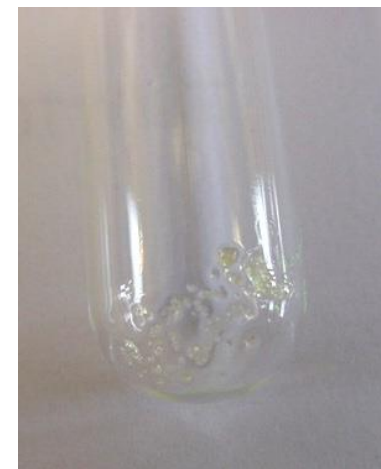
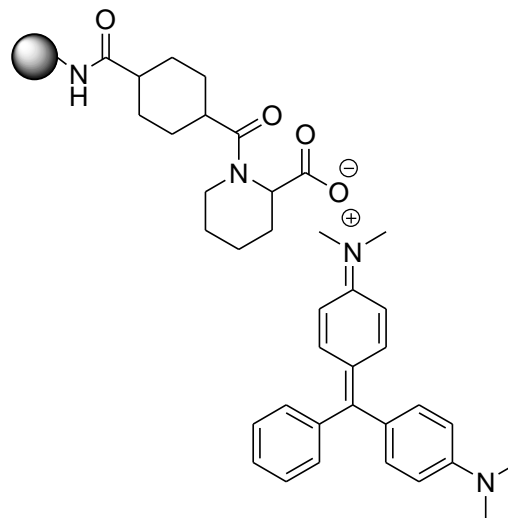
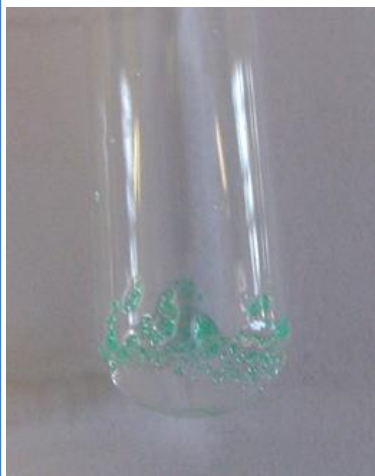
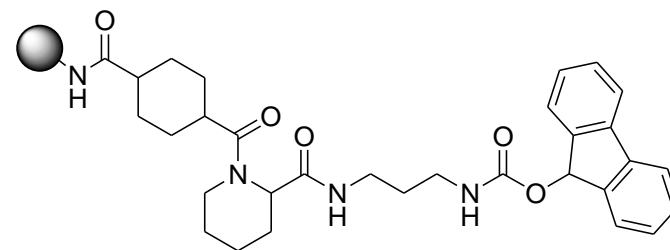
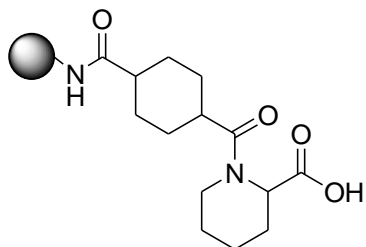
Pipecolic linker: Principe



i.e. A = NRR', OR, NHNHR



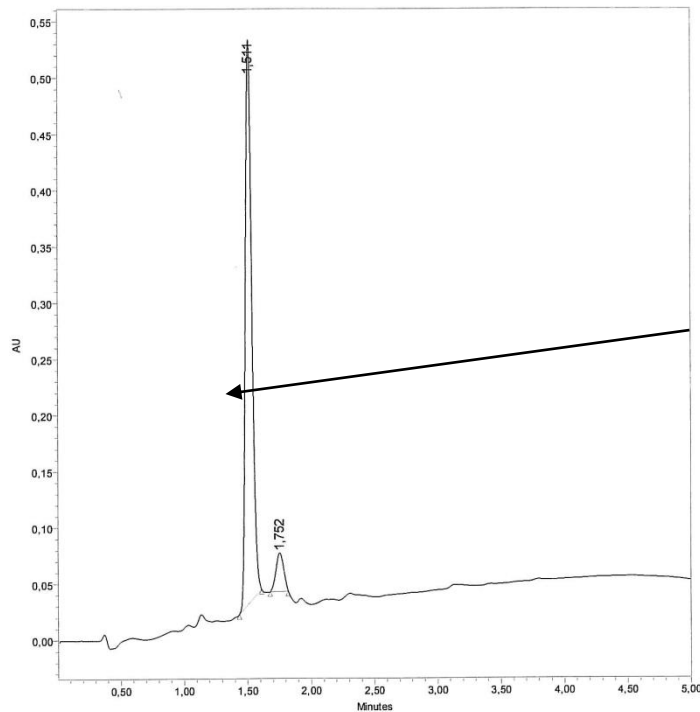
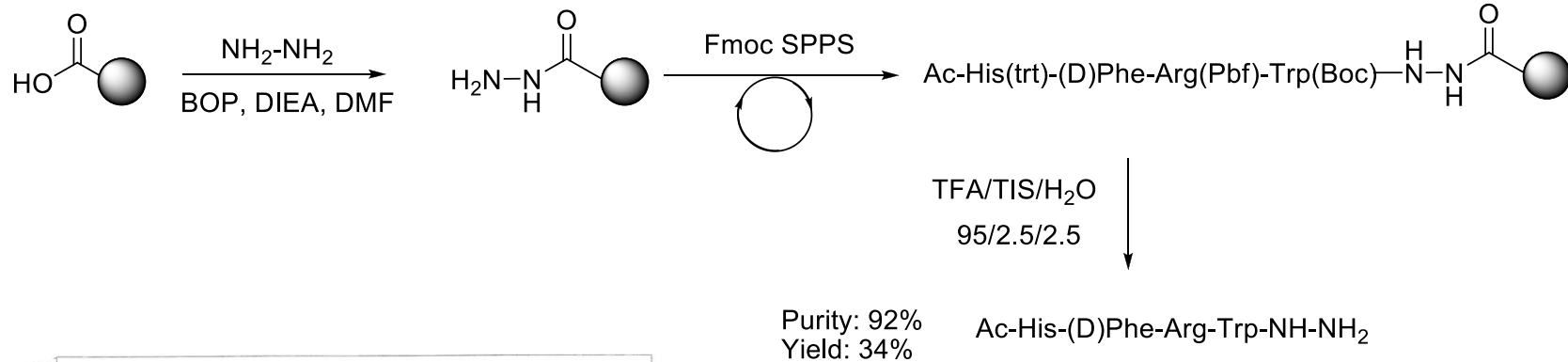
Pipecolic linker: Monitoring of free COOH



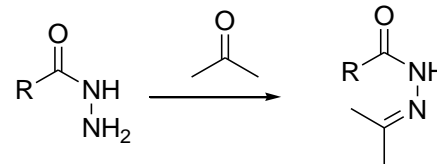
Malachite green test

M. E. Attardi, G. Porcu, M. Taddei, *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 7391

Linker pipecolique: synthèse de peptides C-ter hydrazides

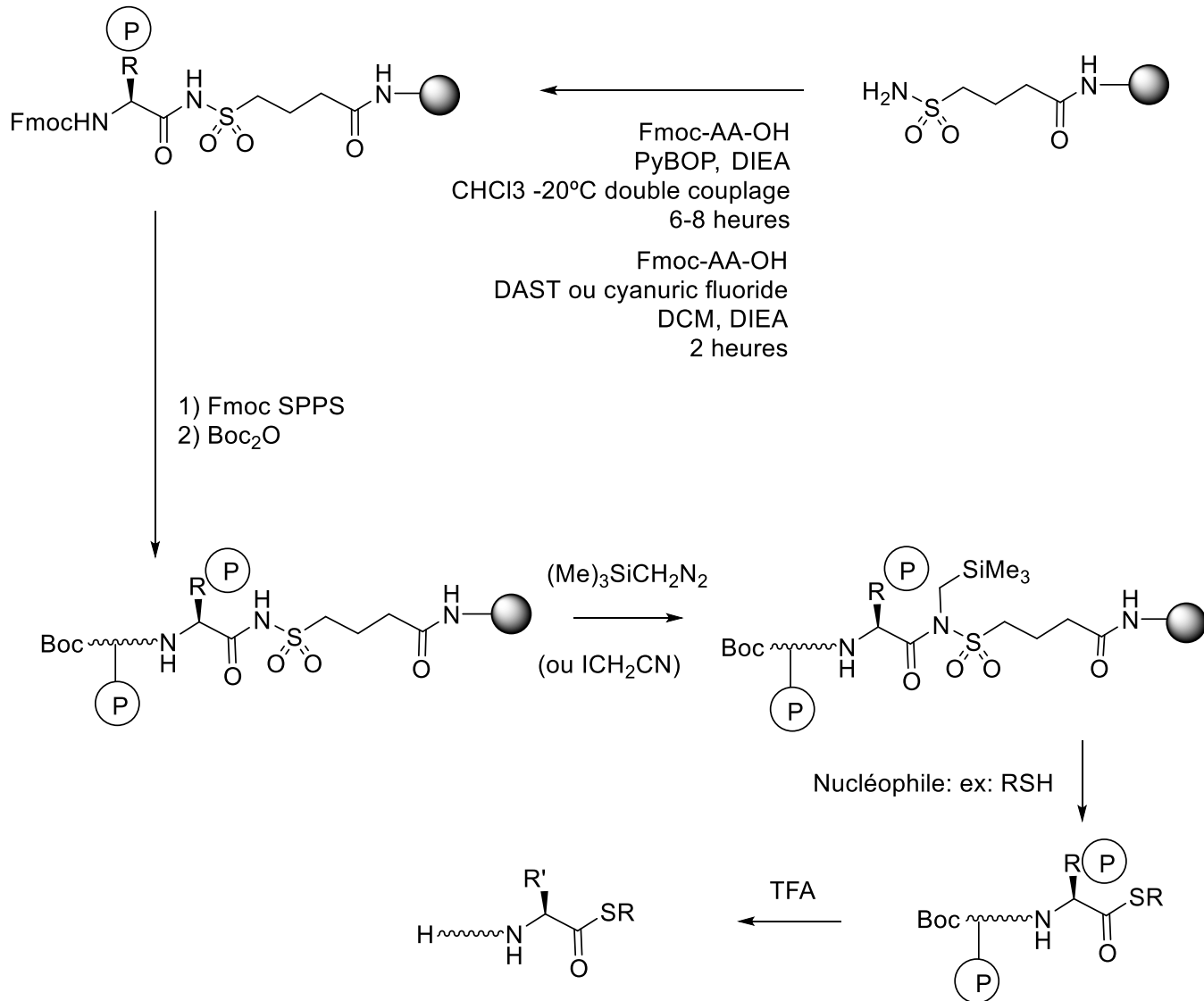


hydrazone with acetone



linker safety catch (STC): préparation de peptide Cter-modifiés

Application majeure: Cter thioesters pour ligation native



L'accrochage du premier aminoacide sur linker STC est délicate:
Sulfonamide : Réactivité proche de l'alcool.

Le recours à des activations fortes entraîne une augmentation de l'épimérisation.

Méthode 1¹: PyBop, DIEA, -20°C DCM 8 heures 0.5 M double couplage

Méthode 2²: fluorure d'acide : cyanuric fluoride 3 eq (0.5 M) ou DAST,
DIEA 2eq, DCM 1 heure

Ancrage sur STC-PS
% rendement

Fmoc-AA-F	PS 60 min
Ala	85
Asn	67
Asp	80
Cys	93
Gln	100
Glu	65
Gly	100
His	70
Ile	67
Leu	85
Lys	73
Met	67
Phe	100
Pro	66 ^b
Ser	86
Thr	80
Trp	100
Tyr	100
Val	95

[1] Ingeno et al. Org. Lett. 2002, 4, 1187-1188

[2] Backes et al. J. Org. Chem. 1999, 64, 2322

épimérisation du fluorure d'acide en fonction des bases

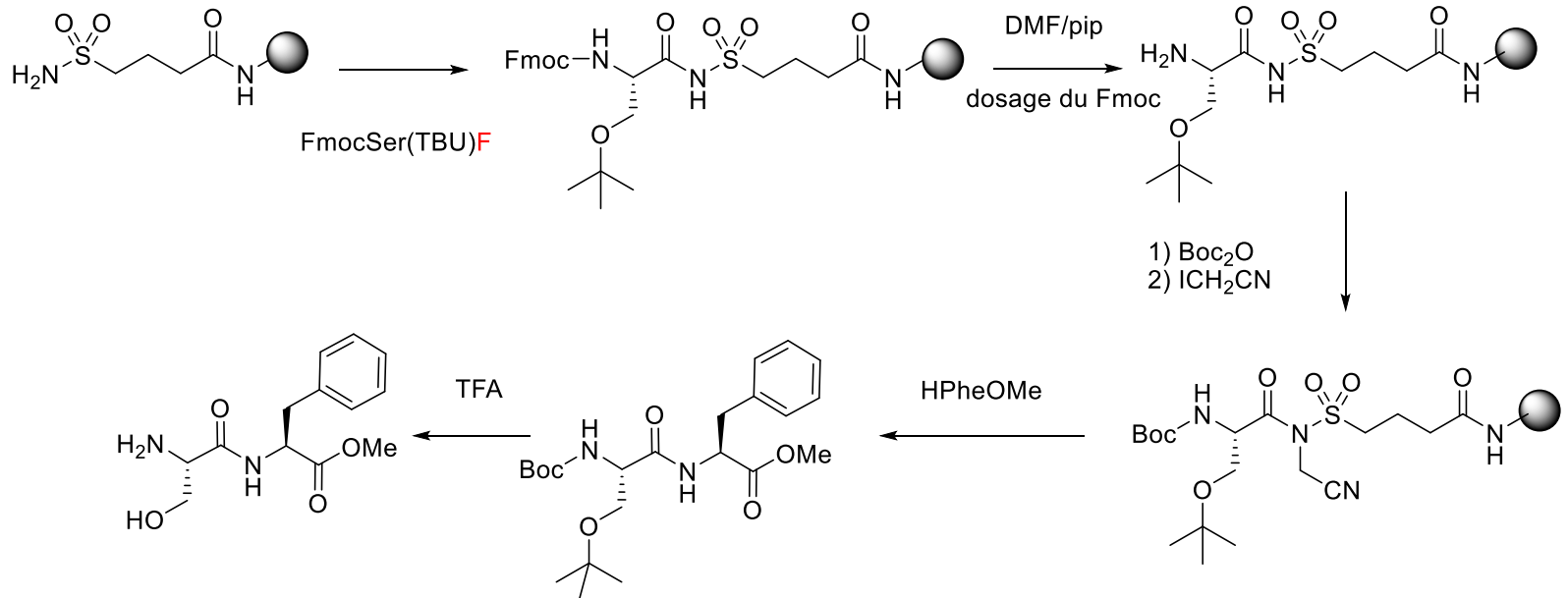
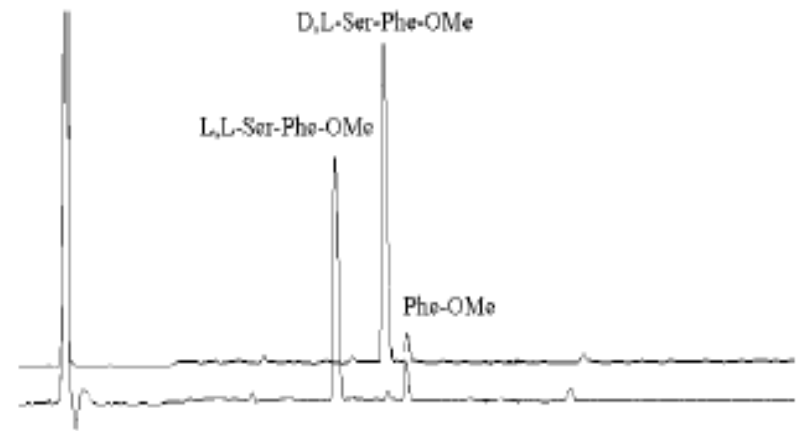


Table 1. Anchoring via Fmoc-Ser(*t*Bu)-F to Sulfonamide SCL-PS and Racemization Values Obtained in the Presence of Various Bases^a

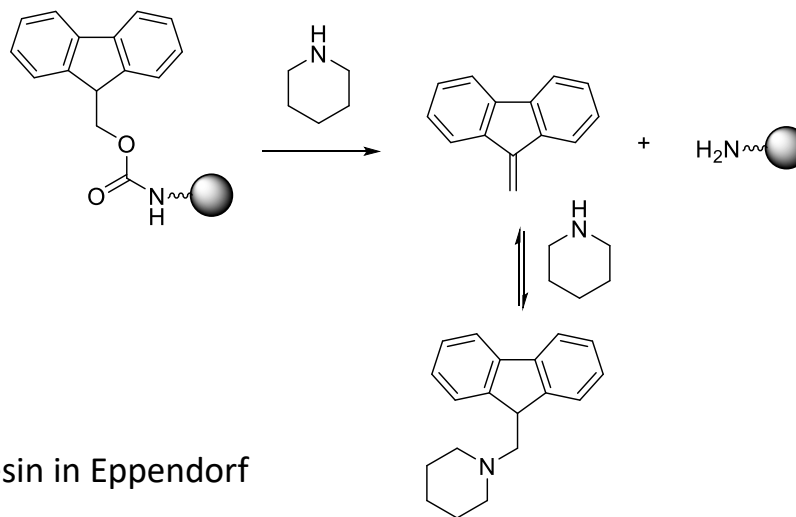
entry	base	equiv of base									
		0.5		1		1.5		2		3	
		yield %	yield %	yield %	D,L %	yield %	D,L %	yield %	D,L %	yield %	D,L %
1	no base	0.2	0.2	0.2	nd	0.2	nd	0.2	nd	0.2	nd
2	DMAP	32	50.5	96.8	14.7	99.3	17.5	100	22.6		
3	DIEA	28.8	40	53.6	<0.1	86.4	0.5	99.2	1.3		
4	NMI	4.6	28.1	35.3	2	55.6	4.1	65.4	6.6		
5	TMP	0.2	0.2	2	nd	6	nd	10	nd		
6	DABCO	6	40.5	51.2	11.4	60.4	25.4	68.1	34.2		

^a 3 equiv of Fmoc-Ser(*t*Bu)-F; coupling concentration 0.5 M in DCM; reaction time 60 min.



Estimation par comparaison aires HPLC des dipeptides Ser-Phe-OMe et DSer-Phe-OMe

Dosage du Fmoc sur une résine



Weight precisely $w=5-10$ mg of resin in Eppendorf

Add 1ml of 20% Pip in DMF.

Shake 20 min

transfer 100 μ l on the solution (without pipetting beads!) in 10 ml DMF (i.e. dilution x100)

mix well, you obtain the solution 'S' to be measured

pipette 2ml of this solution (or less, you just have to fill the UV cell) and measure the Absorbance at 301 nm.

NB: use as reference solution a 100x dilution of the same 20% Pip solution in DMF.

Loading = $101 \times \text{Abs at } 289.8\text{nm} / 6.098 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1} \times w$ (w = mass of resin in mg)

the loading is in mmol/g

repeat the measure 3 times with the 'S' solution

The Fmoc substitution may be calculated with the following formula using the maximum at 289.8 nm (for the maximum at 301.0 nm, the calculation is performed analogously)

$$S_{\text{Fmoc}} [\text{mmol g}^{-1}] = \frac{E_{289.8 \text{ nm}}}{\epsilon_{289.8 \text{ nm}}} \frac{10^6 \text{ mmol mol}^{-1} \text{ mg g}^{-1} V D}{m_{\text{Resin}} l}$$

where:

S_{Fmoc} = Fmoc substitution [mmol g^{-1}]

$\epsilon_{289.8 \text{ nm}}$ = Molar absorption coefficient at 289.8 nm: $\epsilon_{289.8 \text{ nm}} = 6089 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$E_{289.8 \text{ nm}}$ = Absorption of the sample solution at 289.8 nm

m_{Resin} = Sample weight of the resin [mg]

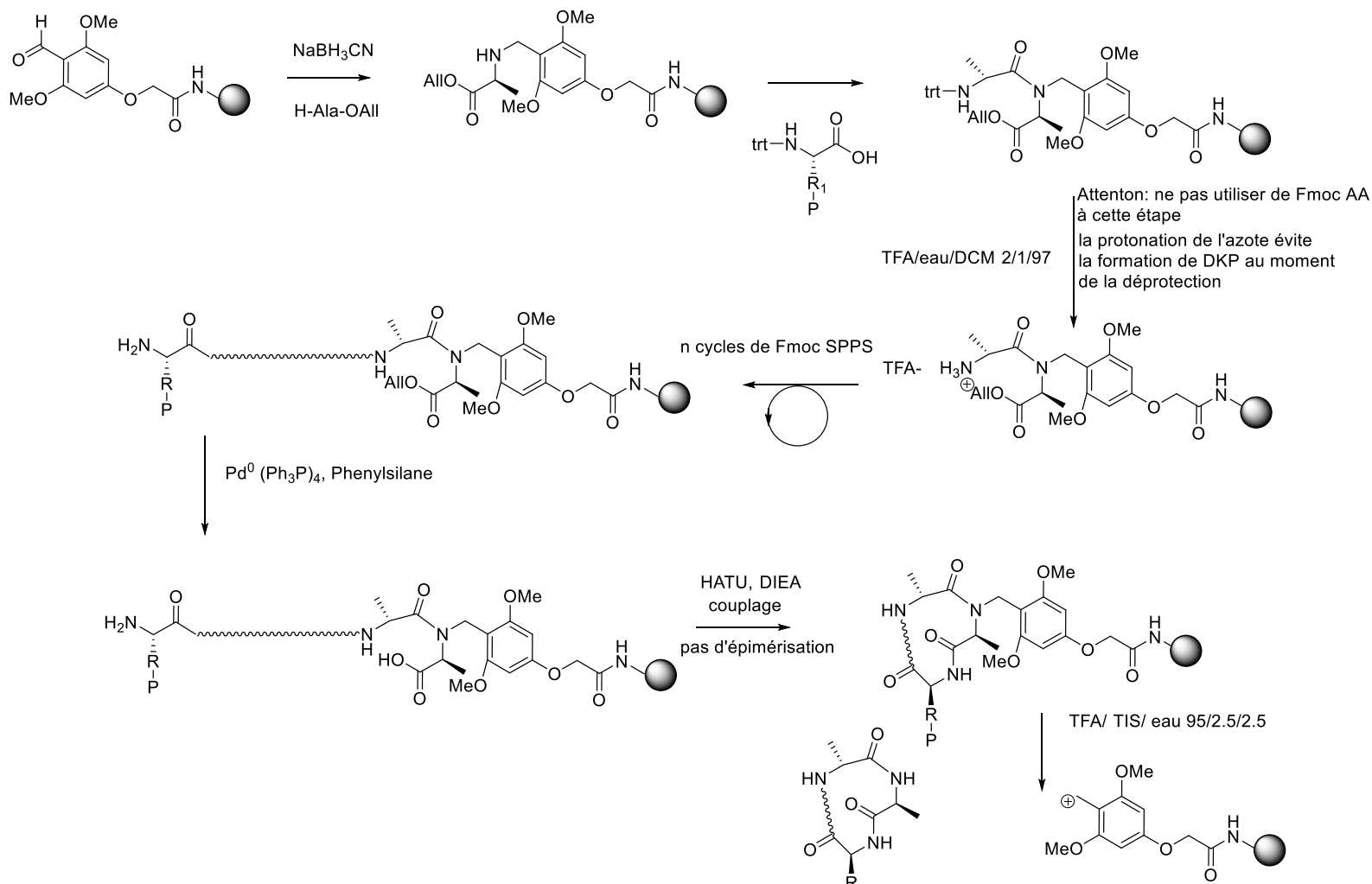
$10^6 \text{ mmol mol}^{-1} \text{ mg g}^{-1}$ = Factor for conversion of mol to mmol and mg^{-1} to g^{-1} : 1000 [mol to mmol] 1000 [mg^{-1} to g^{-1}]

V = Sample volume in [l] (e.g. 0.1 l)

l = Optical path length of the cell in cm (e.g. 1 cm)

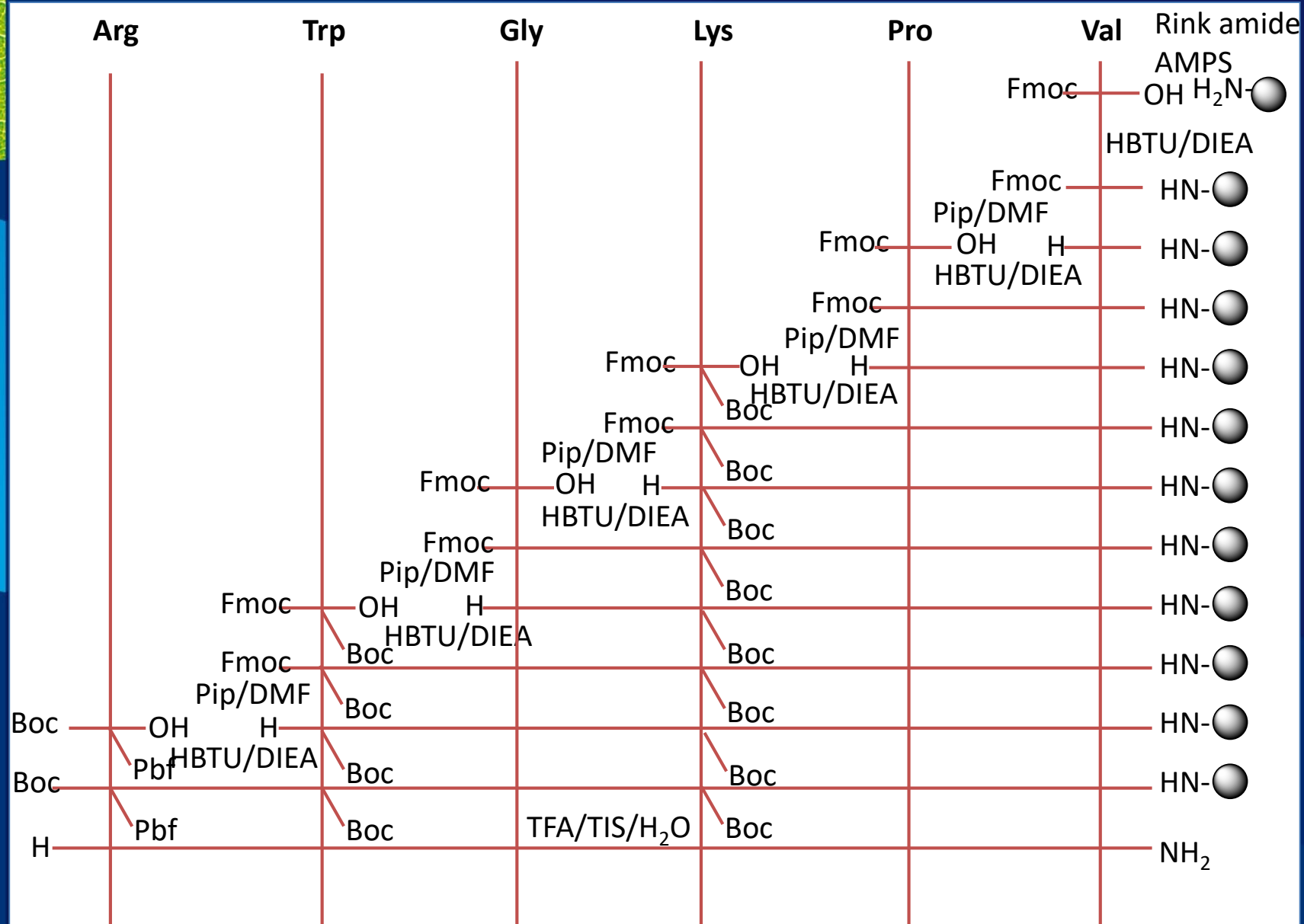
D = Dilution factor

Exemple de synthèse d'un peptide cyclique résine BAL

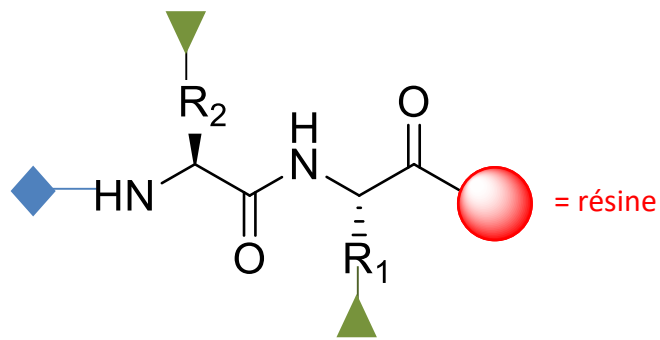


J. Alsina, T. S. Yokum, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* 1999, 64, 8761–8769.

Notation: Schéma de synthèse H-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂



Stratégies en synthèse peptidique sur support solide



◆ Boc / Bzl ▲

Déprotection TFA

Stable Amines, H₂

● Clivage HF anhydre

▲ HF-labiles
et résistantes au TFA

◆ Z / tBu ▲

(en solution seulement)

Déprotection à H₂ Pd/C

Stable TFA, amines

● Clivable au TFA

▲ TFA-labiles
et stables H₂ Pd/C

◆ Fmoc / tBu ▲

Déprotection amines II

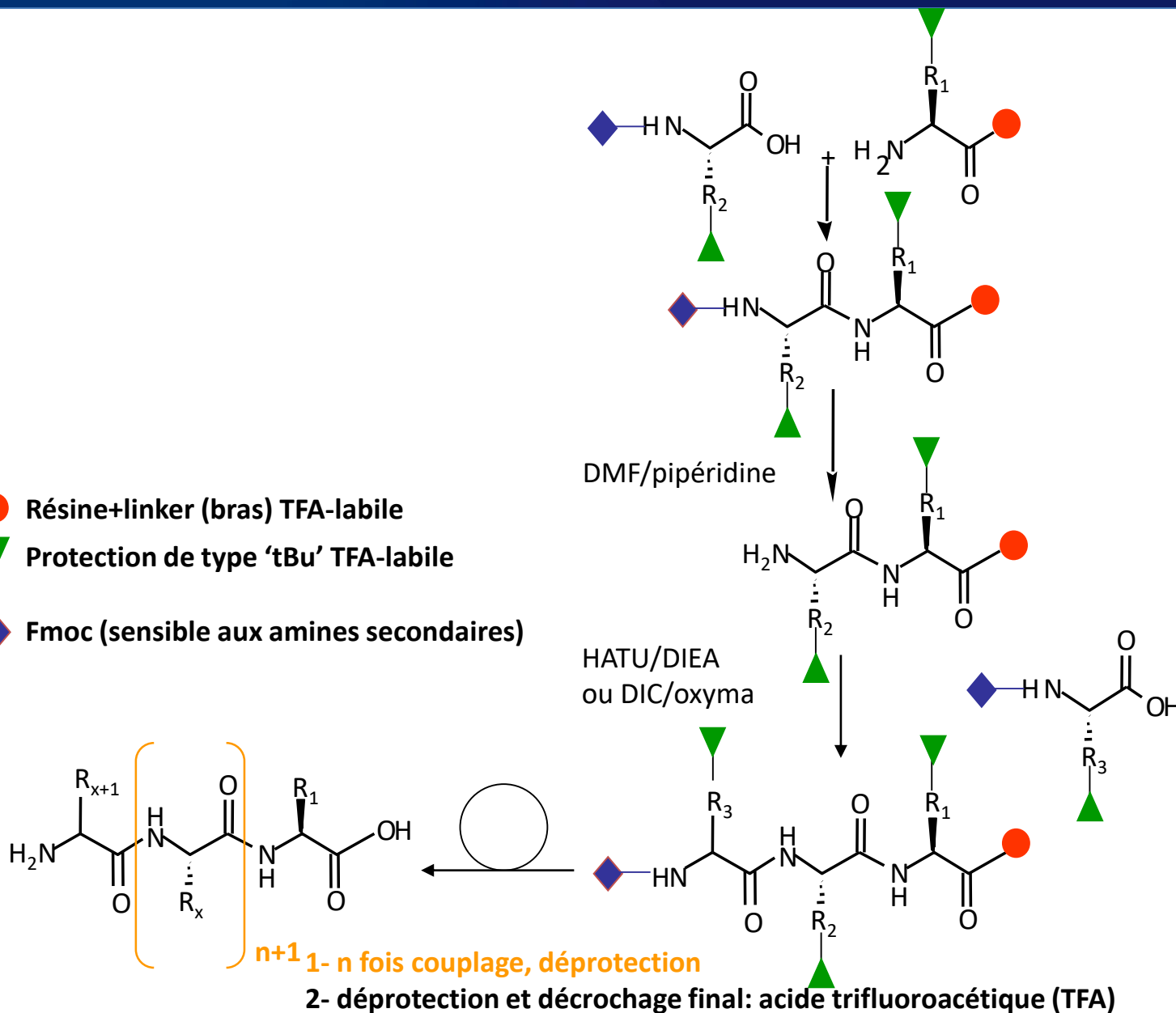
Stable TFA, amine I,III

● Clivable au TFA

▲ TFA-labiles
et stables Amines II

Principe général de la stratégie Fmoc/tBu SPPS

- Résine+linker (bras) TFA-labile
- ▼ Protection de type 'tBu' TFA-labile
- ◆ Fmoc (sensible aux amines secondaires)



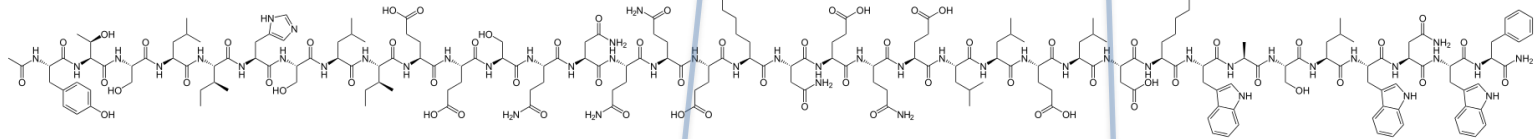


	<i>Fmoc/tBu</i>	<i>Boc/Bzl</i>
Orthogonalité N α vs chaînes latérales	oui	Les deux sont labiles dans des conditions très acides
Traitement au TFA	Clivage final seulement	A chaque étape
Traitement à l'amine secondaire (pipéridine)	A chaque étape	non
Traitement HF	non	Clivage final
Automatisation	oui	oui sauf clivage final
Echelle	Toute échelle	Clivage final délicat
Monitoring N- α déprotection	Dosage UV de l'adduit DBF-pip à 301 nm	Test quantitatif à la ninhydrine : délicat
Formation de DKP	Suivant les linkers très favorisée en condition de déprotection	Plus facile à éviter : couplage et neutralisation concomitante
Clivage final	Possible en réacteur standard	Équipement spécial
Recommandé pour	Peptides sensibles aux acides (peptides sulfatés, O-glycosylés)	séquences « difficiles » (aggrégation brisée par les traitements acide/base)

Synthèse sur support solide industrielle

Enfuvirtide (peptide de 36 AA 2003), reproduit une partie de la région répétée HR2 de la glycoprotéine gp41 de l'enveloppe du VIH intervenant au moment de la fusion. Commercialisé par Roche comme inhibiteur de fusion membranaire dans le traitement du HIV en conjonction avec la tri thérapie, le besoin était de 180 mg/jour/patient, ce qui implique une production de l'ordre de 3 tonnes par an pour ouvrir le besoin planétaire.

Ac-TyrThrSerLeulleHisSerLeulleGluGluSerGlnAsnGlnGlnGluLysAsnGluGlnGluLeuGluLeuAspLysTrpAlaSerLeuTrpAsnTrpPhe-NH₂

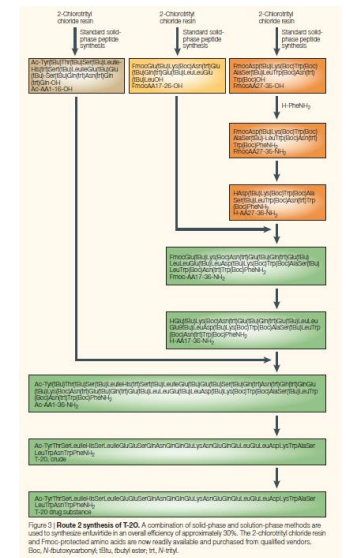


7% Rdt après purification

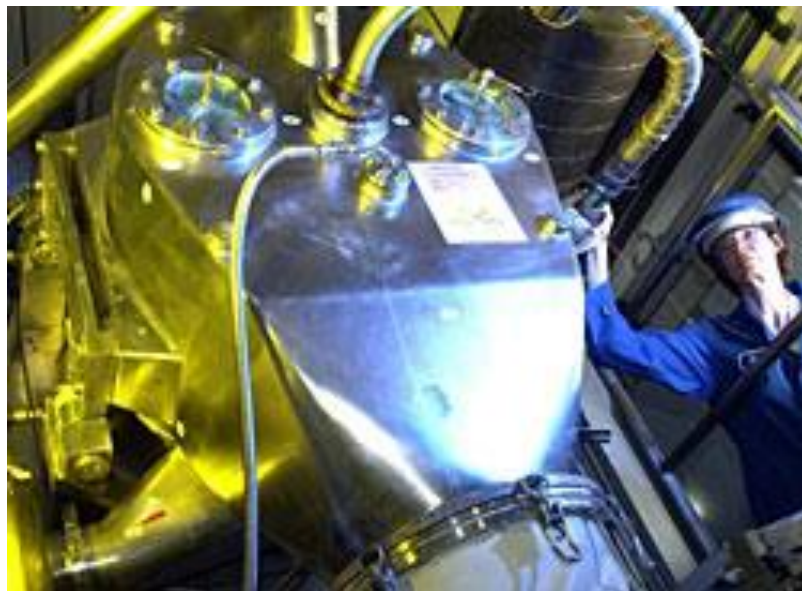
35% Rdt Brut

Synthèse sur résine trityl en trois fragments

Contrôle des produits secondaires
(délétions, doubles incorporations, épimérisation)



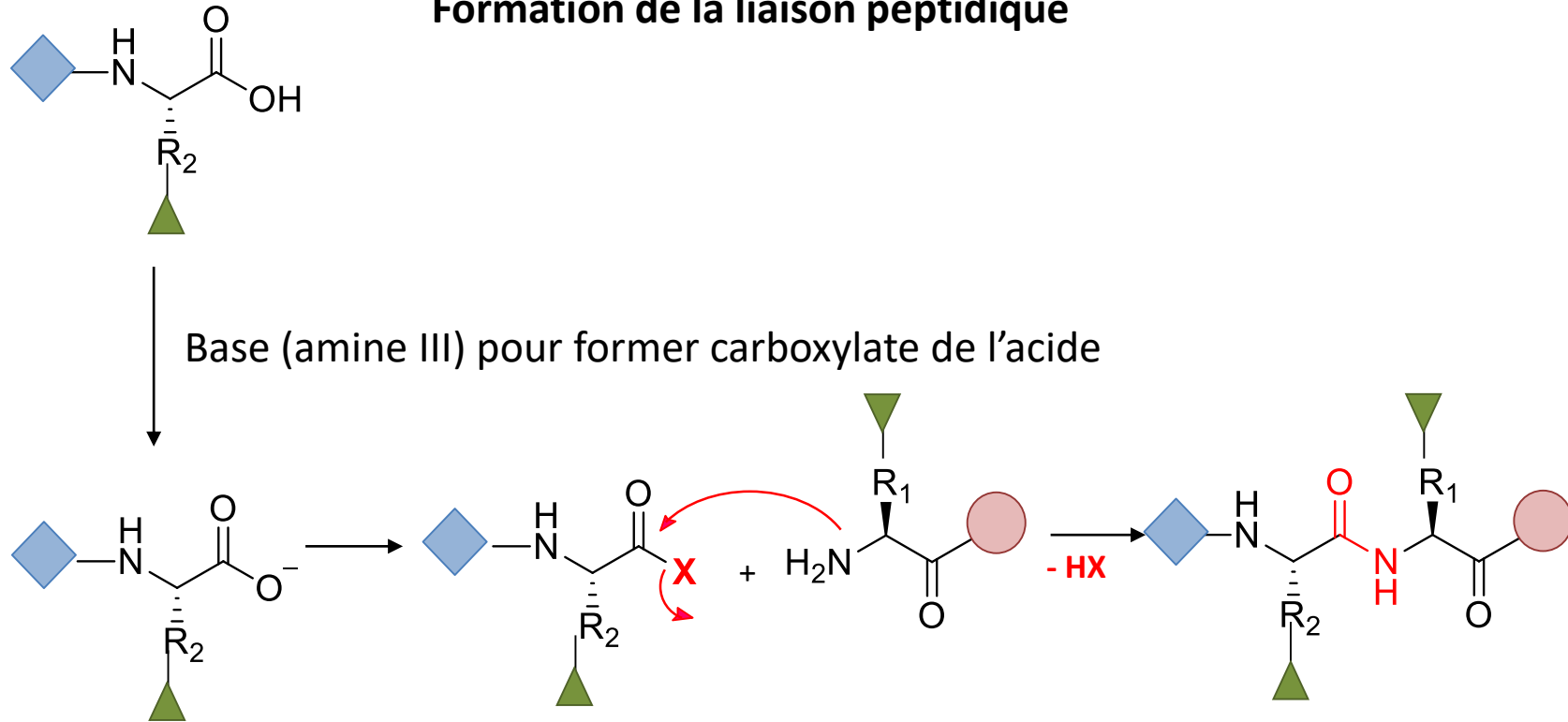
Synthèse sur support solide industrielle



IV - Activation de la fonction acide

IV - Activation de la fonction acide

Formation de la liaison peptidique



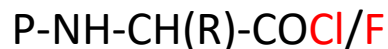
X = groupe activant

ELECTROATTRACTEUR

**C du carbonyle suffisamment électrophile
pour faciliter attaque nucléophile de l'amine**

Méthodes d'activation

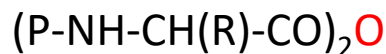
Halogénures d'acide



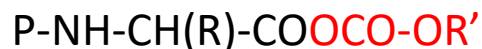
Esters actifs



Anhydrides symétriques



Anhydrides mixtes



Agents de couplage



Phosponiums (BOP), uroniums, (HBTU), DIC/HOBt

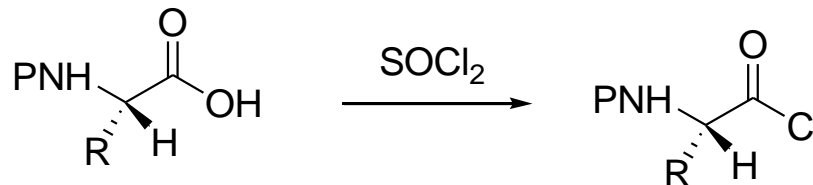
IV - Activation de la fonction acide

Halogénures d'acide

Halogénures d'acide

Chlorures d'acides

Préparation:



Advantages

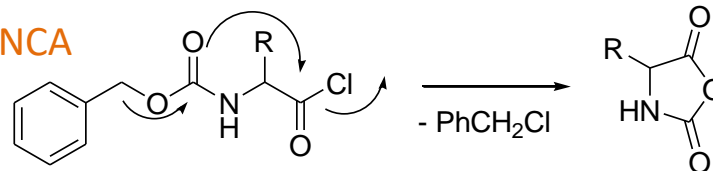
Très puissants pour le couplage sur des acides aminés encombrés (N-Me, AIB...)

Inconvénients

- Epimérisation: Chlorures d'acides rapidement convertis en oxazolone
Impossible d'utiliser des protections acido-labiles (stratégie Boc/Bzl et stratégie Fmoc/tBu : peut être utilisée mais les protections des chaînes latérales \neq tBu, Boc, trityl...)
- En chauffant, formation de NCA (N-carboxyanhydrides) .
- Sur P-Asp(OR)OH, formation d'aspartimide

➔ Peu utilisés

- Z-N $^{\alpha}$ -aminoacide-Cl: instable, donne NCA



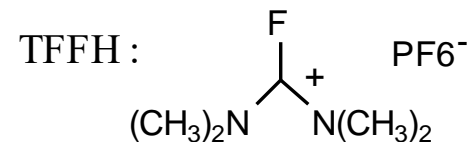
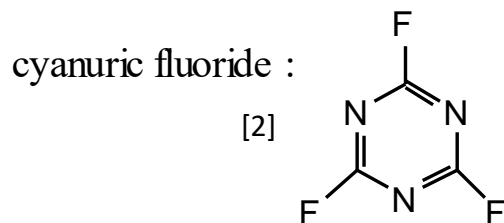
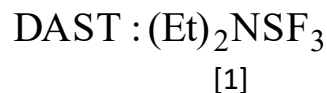
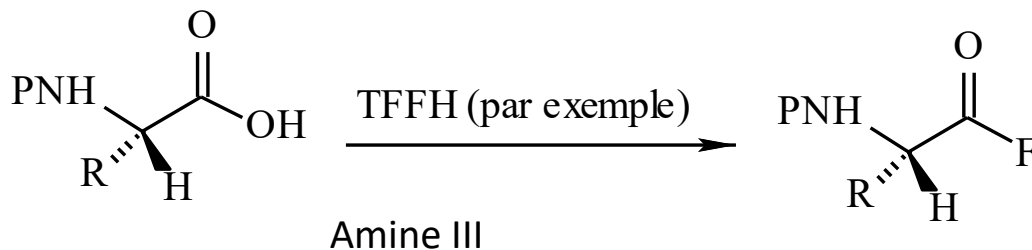
Préparation *In situ*

BTC : $(\text{Cl}_3\text{CO})_2\text{O}$ (bis trichlorométhylcarbonate) **FmocAAOH** + **BTC** + **base** \rightarrow **FmocAACl**

Halogénures d'acide

Fluorures d'acide

Préparation:



Avantages/Inconvénients

Très puissants pour le couplage sur des aminoacides encombrés (N-Me, AIB...)

Certains réactifs pour les préparer ne nécessitent pas d'amines tertiaires: peu épimérisants

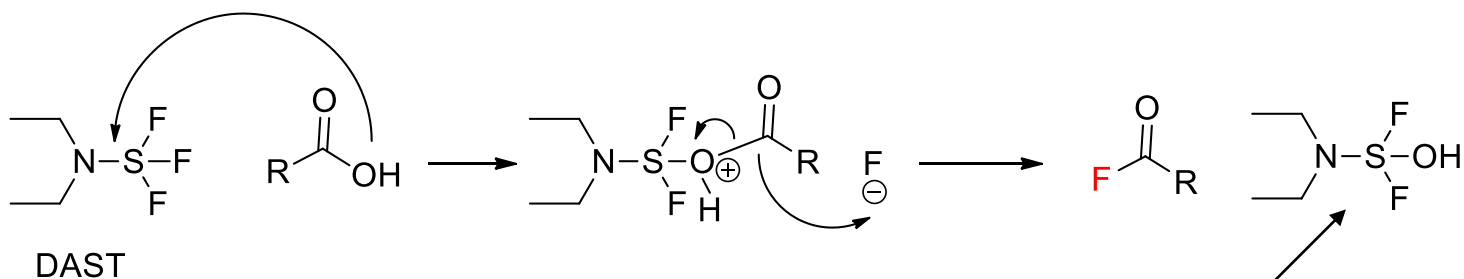
Contrairement aux chlorures, ils sont plus résistants aux nucléophiles neutres comme l'eau et il est possible de les préparer à l'avance et de les isoler (avec DAST surtout)

Attention, l'acide libéré est suffisant pour cliver des triesters phosphate sensibles de type $\text{Xxx}(\text{PO}_3\text{Bzl}_2)$ ou $(\text{PO}_3\text{tBu}_2)$ avec Xxx Ser, Thr ou Tyr

[1] Kaduk et al. Lett. Pep. Sci. 1995, 2, 285

[2] Carpino et al. J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 9651

DAST : Dimethyl aminosulfur trifluoride



DAST

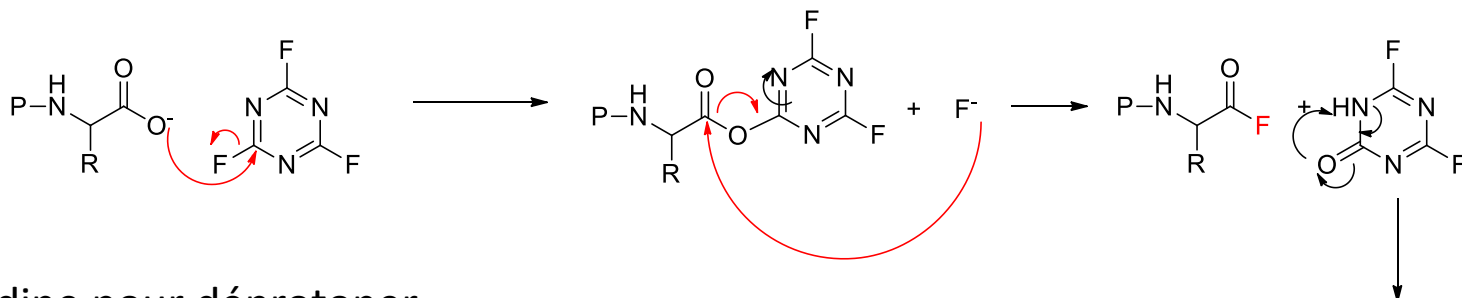
1.2 eq.

1. eq.

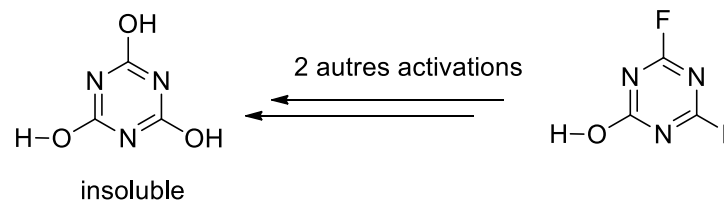
Pas de base nécessaire

Élimination rapide par extraction
eau glacée
Si on veut isoler le fluorure en
phase orga pour le cristalliser

Cyanuric acide [carpino]



Pyridine pour déprotoner



Kaduk, C.; Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Forner, K.; Carpino, L. A.; Bienert, M. *Lett. Pept. Sci.* **1995**, *2*, 285-8.

L. A. Carpino, D. Sadataalae, H. G. Chao, R. H. Deselms, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9651.

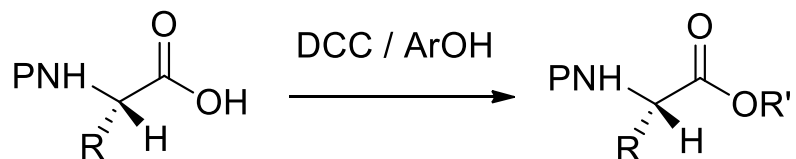
IV - Activation de la fonction acide

Esters Actifs

Esters actifs

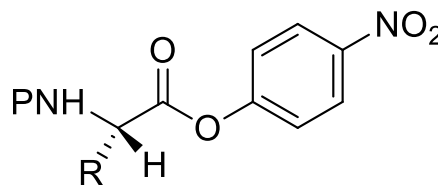
Esters de phénol substitués

Préparation: comme pour la préparation d'esters benzyliques



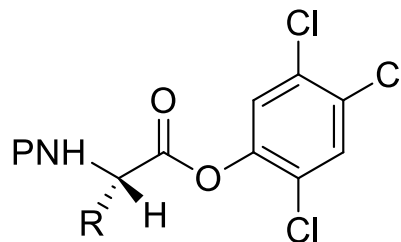
R' groupement électroattracteur

p-nitrophenyl ester



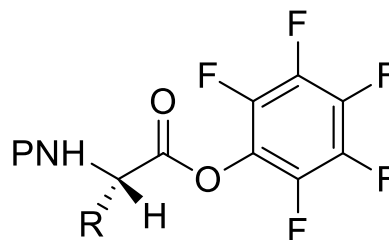
RCOONp

2,4,5-trichlorophenyl ester



RCOOTcp

pentafluorophenyl ester



RCOOTcp

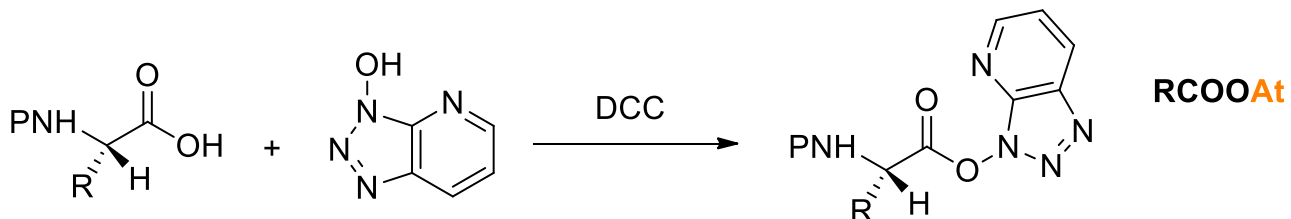
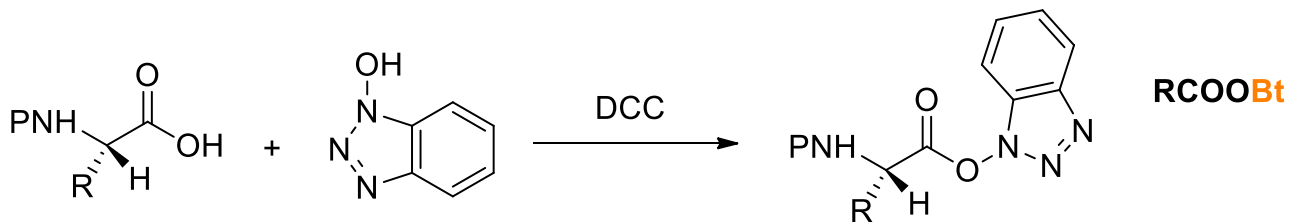
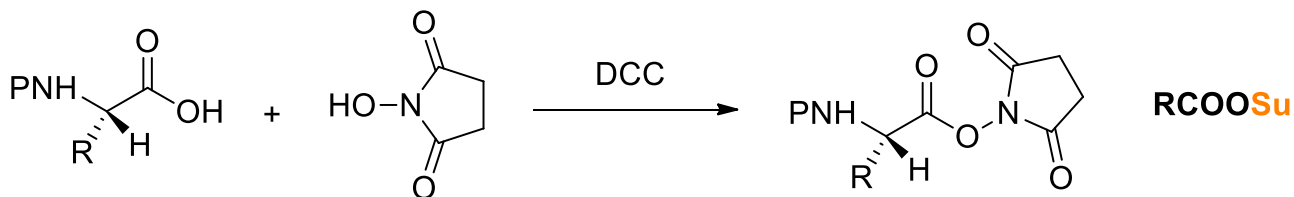
Isolables mais peu réactifs

Possibilité de catalyser par HOBT ou HOAt

Esters actifs

Esters actifs O-acyl hydroxylamines

Préparation: comme pour la préparation d'esters benzyliques



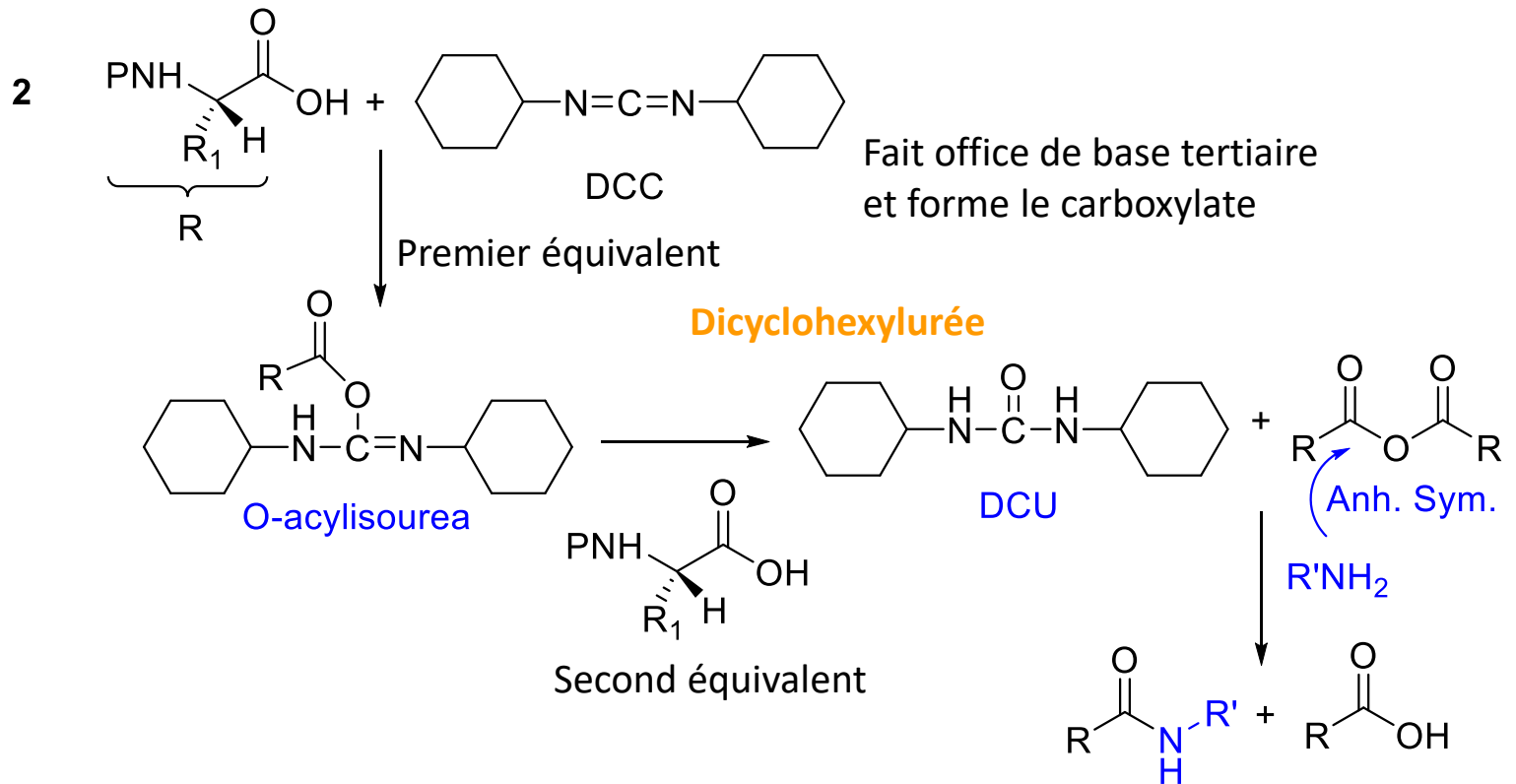
Plus réactifs que les esters aryliques mais seul le OSu est isolable

IV - Activation de la fonction acide

Anhydrides

Anhydrides symétriques

Préparation:



Avantages/Inconvénients

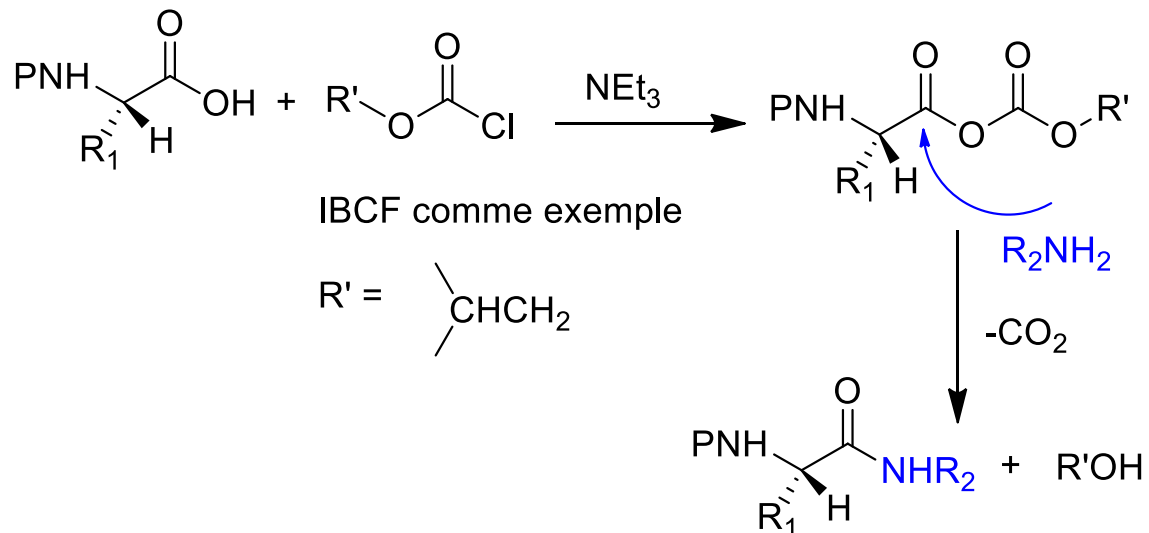
Très réactifs mais perte d'un équivalent d'acide aminé

Réaction secondaire: formation δ -lactame avec Arg, racémisation de l'His N^t-protégée

Anhydrides mixtes

Préparation:

Anhydrides formés avec acide carboxylique (problème de régiosélectivité) →
Anhydrides d'acides carboniques



Avantages/Inconvénients

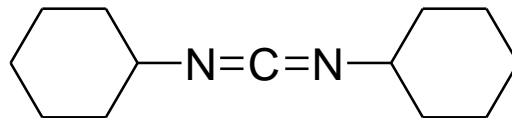
Ne génère que : CO_2 et ROH facilement éliminable

IBCF instable: A préparer à -20°C

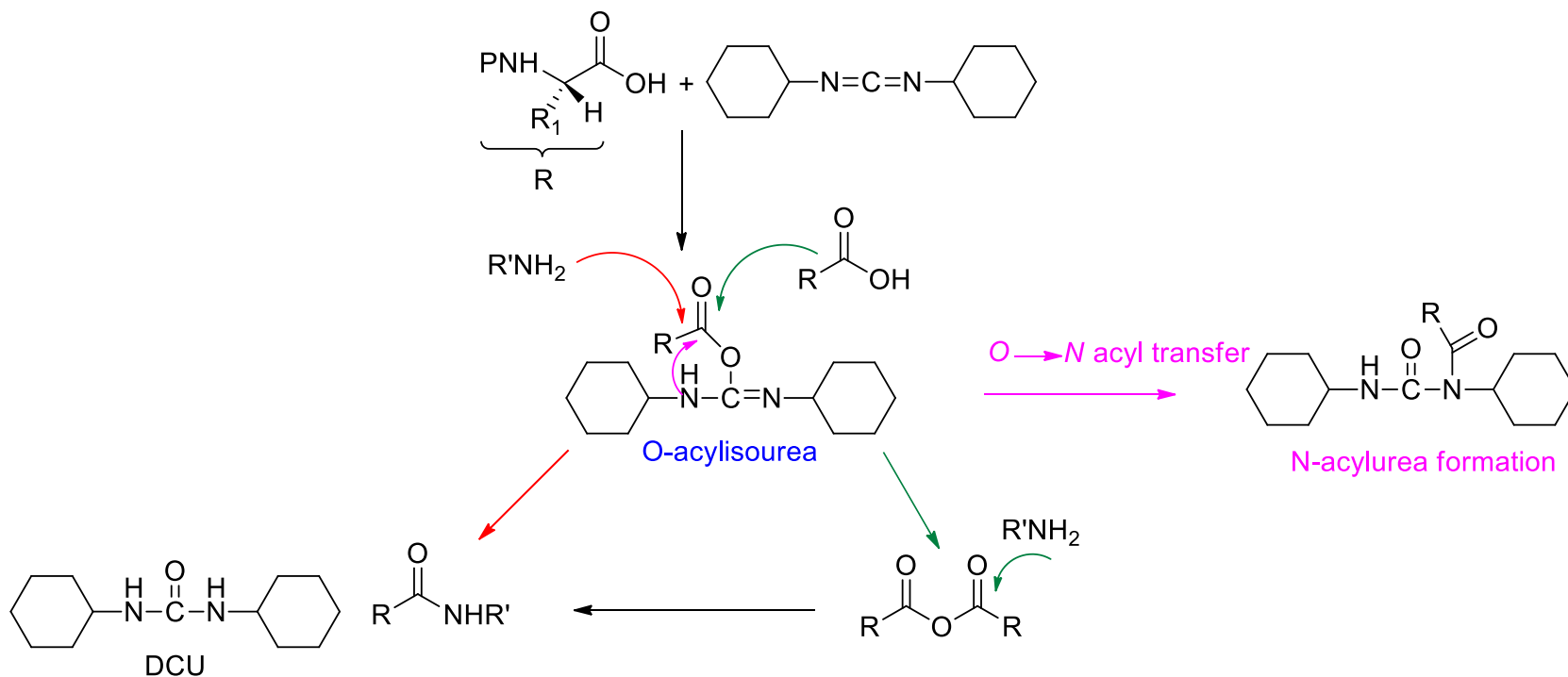
IV - Activation de la fonction acide

Carbodiimides et Agents de couplage

Agents de couplage: carbodiimides+ Nucléophiles auxiliaires



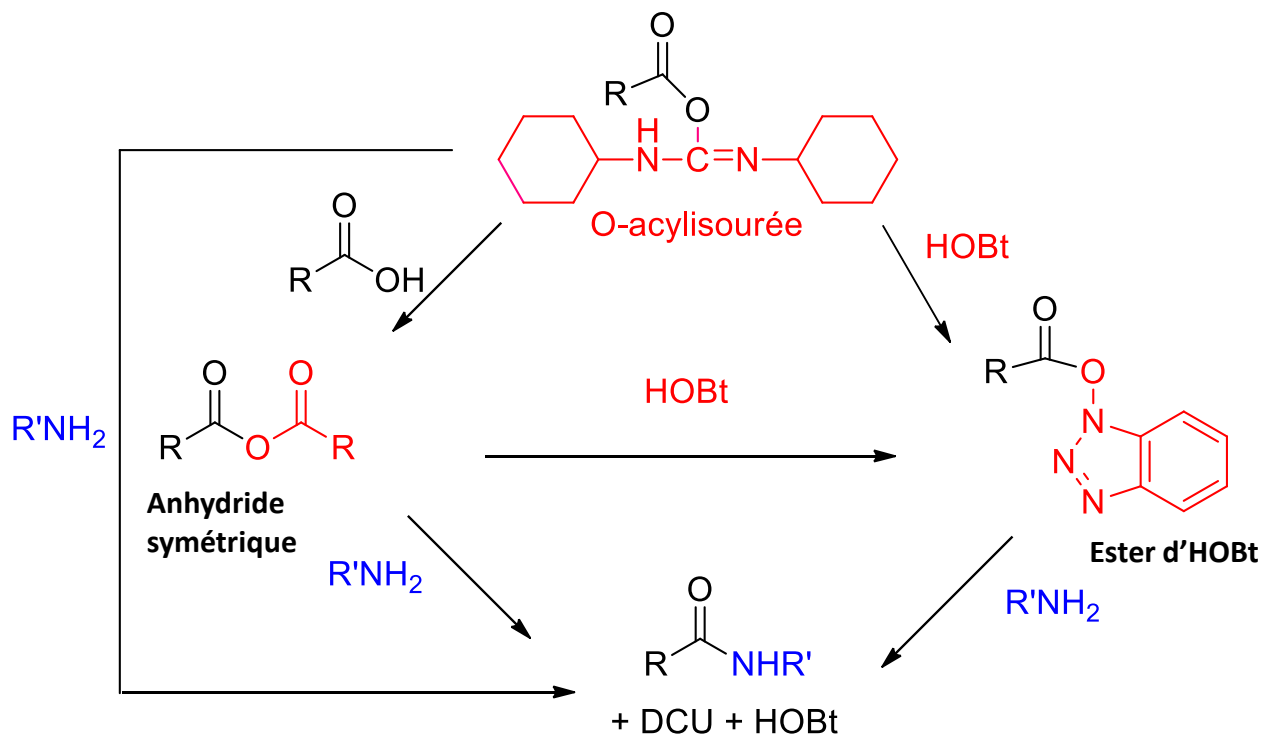
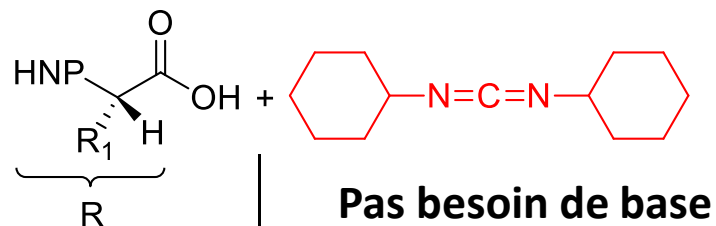
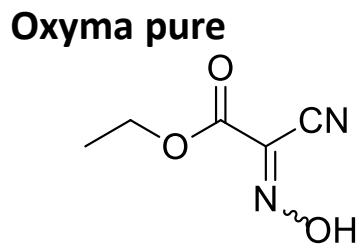
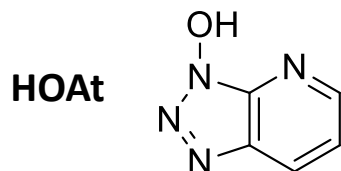
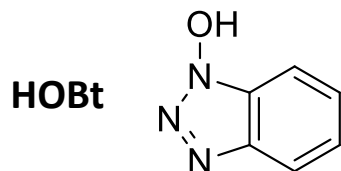
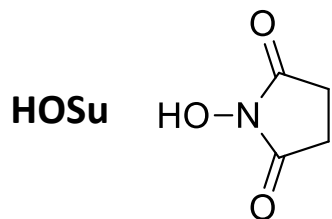
Dicyclohexylcarbodiimide: DCC



Utilisation de **carbodiimides seuls** engendre un certain nombre de réactions secondaires:
- formation de *N*-acylurea, épimérisation (formation oxazolone)
→ peut être évité avec des **nucléophiles auxiliaires**

Agents de couplage carbodiimides+ Nucléophiles auxiliaires

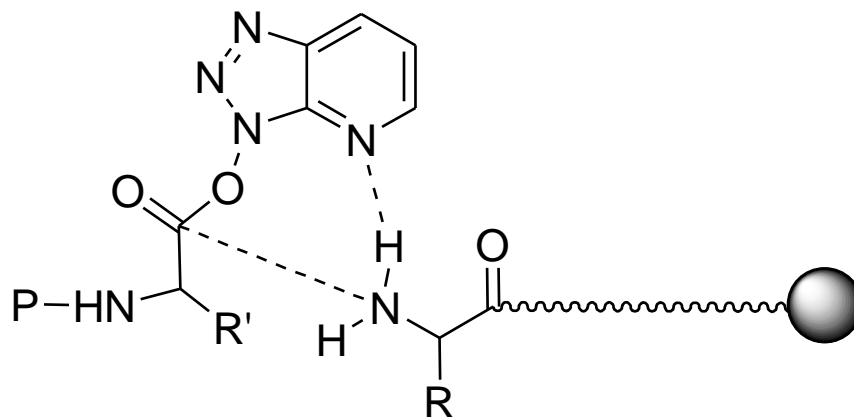
Nucléophiles auxiliaires



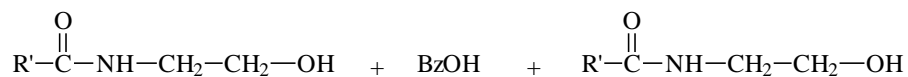
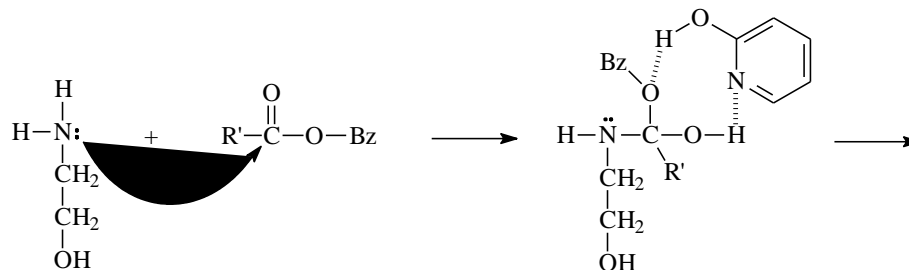
Oxyma: alternatif non explosif à HOBT. En couplage DCC/Oxyma (au lieu HOBT): Rdt plus élevés et moins d'épimérisation. Attention: dégradation à température élevée (microonde) plus facile (commence à 91°C vs 110°C)

Agents de couplage et Auxilliaires HOAt et HOBt

Différence entre auxiliaires HOAt et HOBt



Assistance de l'azote pyridinique pour approcher l'amine libre



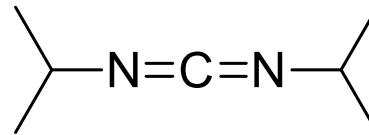
Analogie à l'aminolyse d'esters catalysée par hydroxypyridine

Agents de couplage carbodiimides+ Nucléophiles auxiliaires

Autres carbodiimides dont l'urée correspondante est soluble:
Utiles sur support solide et en phase aqueuse

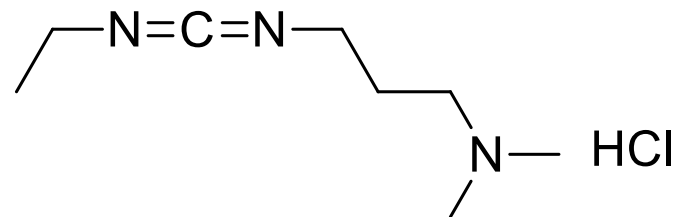
DIC

(Diisopropylcarbodiimide)



EDAC · HCl, EDC · HCl, WSC · HCl

(N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide · HCl)



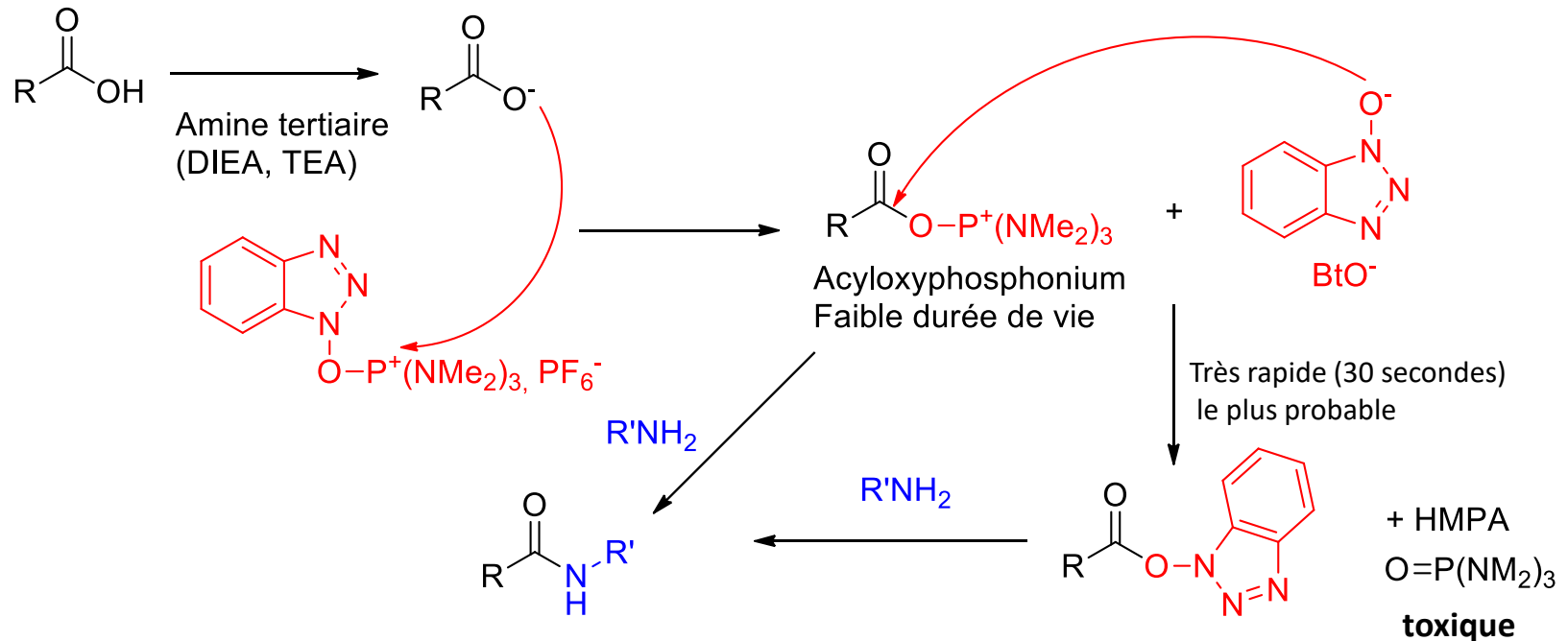
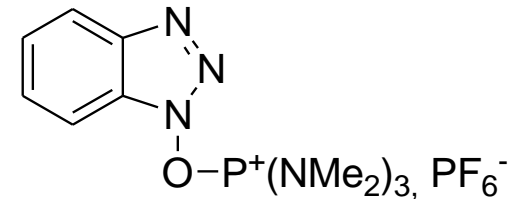
Agents de couplage

Phosphonium and uronium



Base: Diisopropyléthylamine (DIPEA), N-méthylmorpholine (NMM) les plus utilisées en Fmoc/tBu-based SPPS.

Si risque d'épimérisation: collidine est recommandée

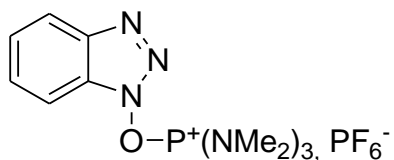


*hexafluorophosphate de 1-H -benzotriazol- 1-yloxy-tris(diméthylamino) phosphonium

Agents de couplage

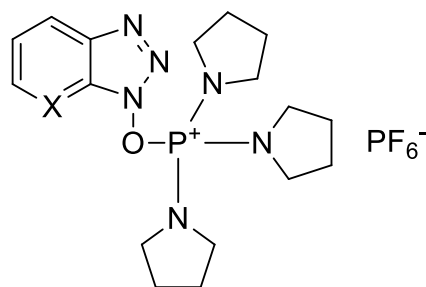
Phosponium

BOP



Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)-
phosphonium hexafluorophosphate

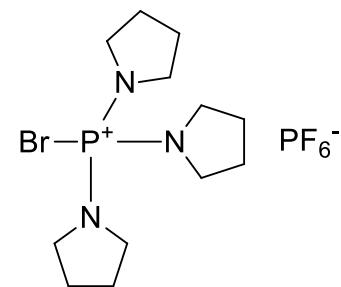
PyBOP et PyAOP



X = C, PyBOP Benzotriazol-1-yloxy-tripyrrolidino
phosphonium hexafluorophosphate

X = N, PyAOP 7-Aza-benzotriazol-1-yloxytripyrrolidino
phosphonium hexafluorophosphate

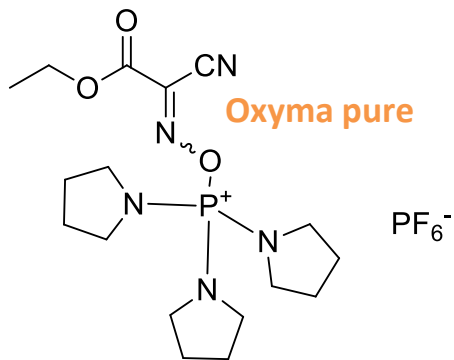
PyBrOP



Bromo-tripyrrolidino phosphonium
hexafluorophosphate

**puissant, couplage de NMe-AA
limite : épimérisation peut être
importante**

PyOxim



Oxyma pure

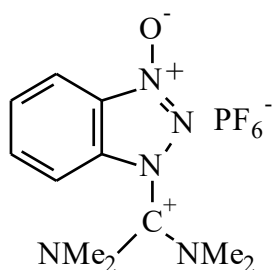
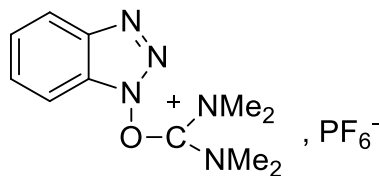
**PyBOP, version non
toxique du BOP
PyAOP plus puissant**

Ethyl cyano(hydroxyimino)acetato-O₂-tri-
(1-pyrrolidiny)phosphoniumhexafluorophosphate

Agents de couplage

Uronium

HBTU

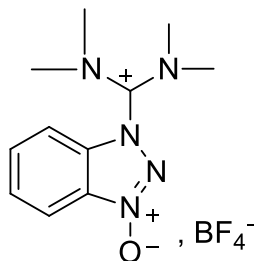


Forme cristalline:

O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-
tetramethyluronium hexafluorophosphate

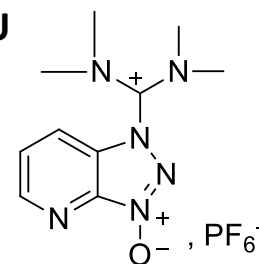
HBTU et TBTU: Puissants agents de couplage
avec peu d'épimérisation
Ajout d'HOBT peut réduire l'épimérisation
(dans certains cas)

TBTU



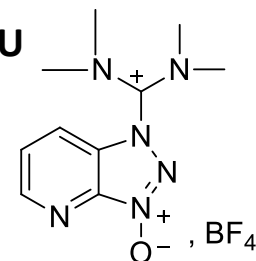
O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-
tetramethyluronium tetrafluoroborate

HATU



O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-
tetramethyluronium hexafluorophosphate

TATU



O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-
tetramethyluronium tetrafluoroborate

HATU et TATU plus puissants que leurs
analogues HBTU et TBTU
Moins d'épimérisation

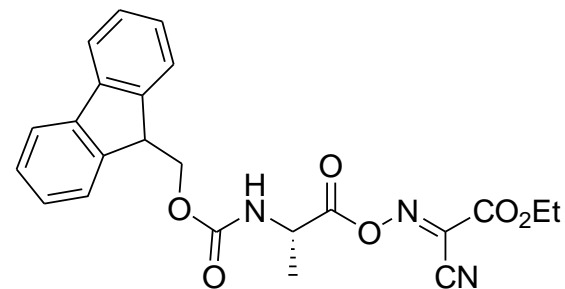
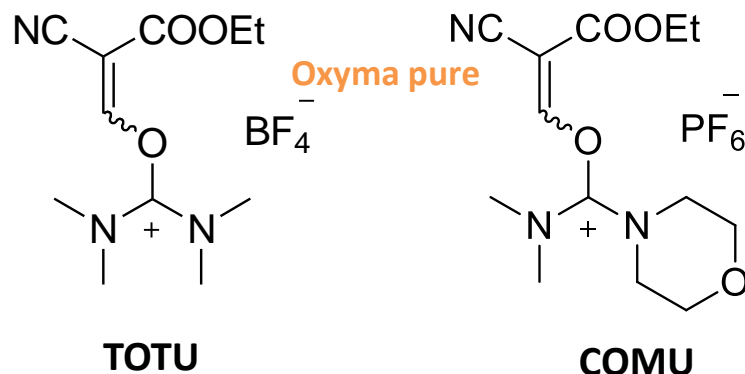
Remarque: Entre TBTU et HBTU pas de différence: **pas d'influence du contre ion**

Agents de couplage

TOTU et COMU

TOTU, COMU: alternative aux agents dérivés d'HOBt, aussi puissant qu'HATU, meilleure solubilité des sous produits en milieu aqueux, moins de risque de toxicité (allergie) et d'explosion que les réactifs basés sur HOBt.

Rm: par rapport à ce qui est donné dans littérature, COMU plutôt instable en solution



Ex: Fmoc AlaOH activée au COMU

Couplage DCC /2-hydroxyiminocynoacetate J. Izdebski, *Polish Journal of Chemistry* **1979**, *53*, 1049.

R. Subiros-Funosas, G. A. Acosta, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Letters* **2009**, *50*, 6200

El-Faham, A.; Funosas, R. S.; Prohens, R.; Albericio, F., *Chemistry-a European Journal* **2009**, *15* (37), 9404-9416.

Subiros-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F., *Chemistry-a European Journal* **2009**, *15* (37), 9394-9403.

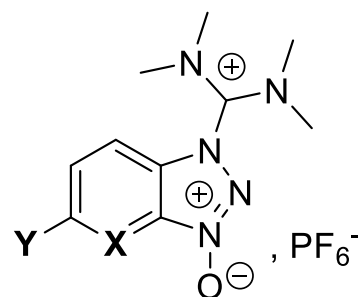
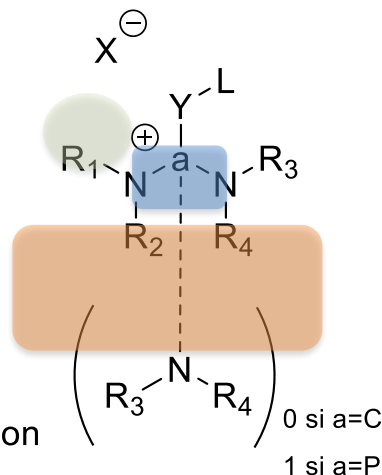
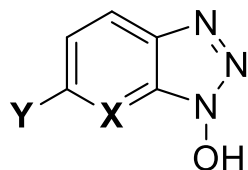
Agents de couplage

Le contre ion (PF_6^- ou BF_4^-) plus 2 parties essentielles:

iminium/uronium ou phosphonium et dérivés benzotriazole ou oxima pure

La partie iminium/uronium phosphonium n'intervient que peu dans l'efficacité du couplage car l'intermédiaire non isolable a une durée de vie faible

Il semble que $\text{HOAt} \geq \text{Oxima} > 6\text{-Cl-HOBt} > \text{HOBt}$



a=C uronium 2 liaisons
 a=P phosphonium 3 liaison
 HOBt: X = CH, Y = H
 HOAt: X = N, Y = H
 6-Cl-HOBt: X = CH, Y = Cl

HBTU: X = CH, Y = H
 HATU: X = N, Y = H
 HCTU: X = CH, Y = Cl

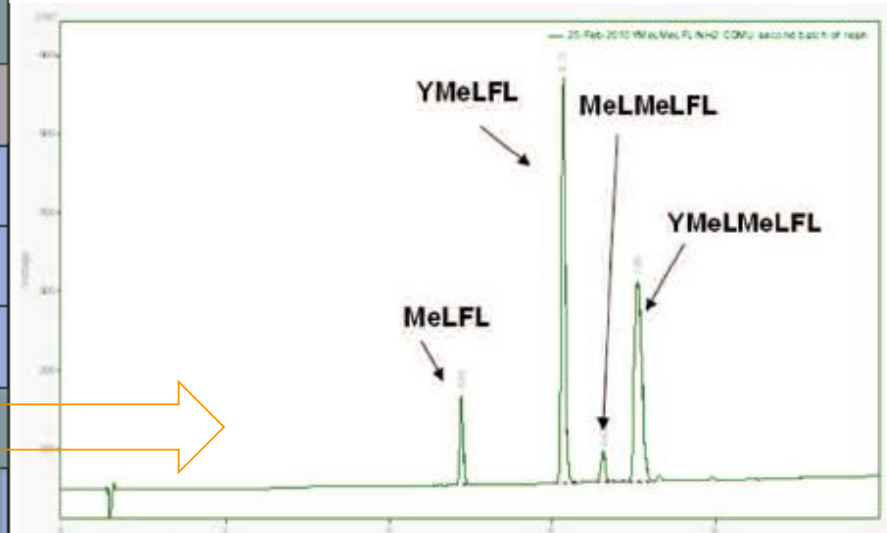
Agents de couplage

Efficacité

Modèle pour obtenir des délétions : $H\text{-Tyr-MeLeu-MeLeu-Phe-Leu-NH}_2$

% Composition of products by HPLC

Coupling reagents	MeLFL	YMeLFL	MeLMeLFL	YMeLMeLFL
PyBOP	60	31	5	4
PyOxim	10	45	5	40
HBTU	57	31	8	4
HCTU	31	35	9	25
HATU	0	16	7	77
TOTU	5	58	2	35
COMU	9	47	4	40
Ezracom	9	50	5	36
HDMC	24	46	7	21

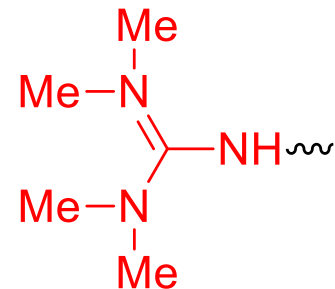


Agents de couplage

Avantages/Inconvénients

- Très pratiques, puissants
- Uroniums = phosphoniums
- Les uroniums sont plus stables (stockage à en solution dans les robots)
- HOAT > Oxima > 6cl-HOBt > HOBt
- Avec les **uroniums**, risque de **guanylation** si l'amine ne réagit pas vite (par exemple peptide cyclique...)

Amine + uronium



Risque de guanylation de l'amine N-terminale déprotégée

Agents de couplage

Stabilité dans vials fermés (synthétiseurs)

Coupling reagent	2 days	7 da
COMU	67	46
HDMC	99	99
HATU	99	99
HBTU	100	98
HCTU	99	99
TOTU	89	85

Fiche Novabiochem 2013 « Critical evalaution of coupling reagents for SPPS »

V- Synthèse de peptides difficiles

Principaux problèmes de synthèse peptidique

- **Réactions secondaires** : selon les aminoacides mais les réactions intramoléculaires sont les plus courantes. i.e deshydratations (-18). Les protections latérales sont souvent très efficaces.

- **Epimérisation** pendant le couplage : normalement faible avec els N-urethanes.
Solution: **Ajouter des** Nu aux : HOBt, HOAt, descendre le pH (carbodimides)

- **Double incorporation:**

Cause: Déprotection prématurée du Fmoc lors d'un couplage trop long

Solution: **Diminuer le temps** de couplage au profit **d'activation plus forte**

- **Déprotection** des chaînes latérales **incomplète** (clivage)

Solutions: **Augmenter le volume de clivage et le temps.**

Utiliser des protection plus faciles à enlever

- **Peptides de délétion**

Solutions:

- **Double couplage, changement de réactif de couplage** ou **capping.**

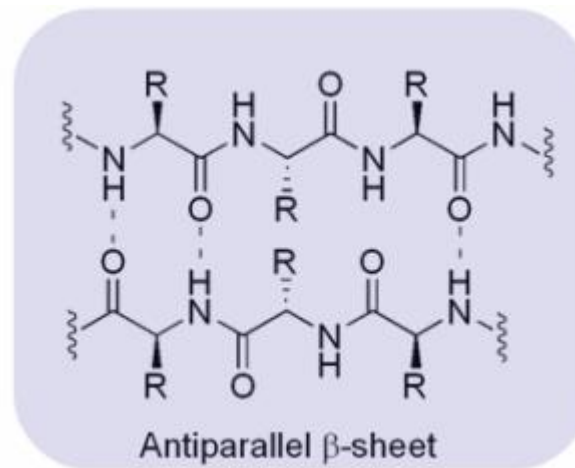
Si la délétion persiste: phénomène d'agrégation pouvant entraîner mauvais couplage ou déprotection insuffisante

Agrégation

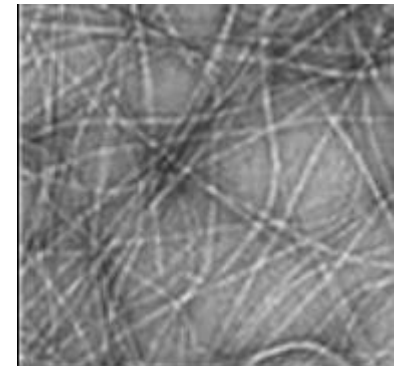
Formation de feuilletts β antiparallèles intra et inter chaînes via un réseau de liaisons hydrogènes et l'hydrophobicité.

Après une vingtaine de cycles, l'aggrégation réduit l'efficacité des couplages/déprotection

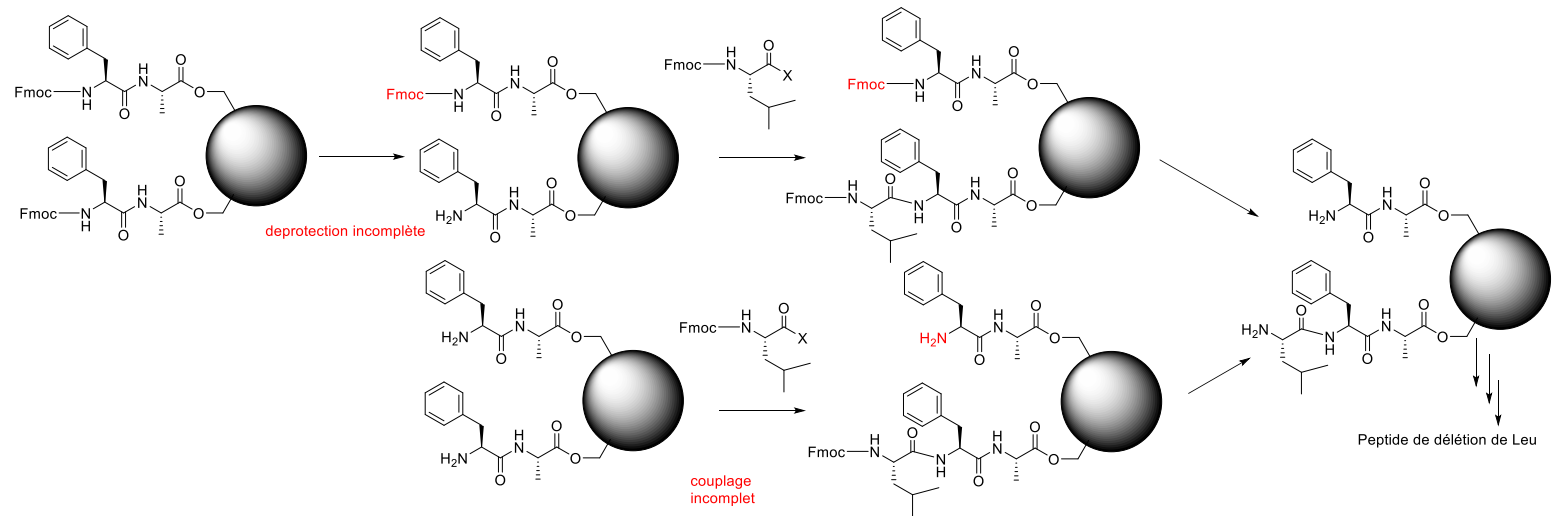
Courant avec les séquences riches en Ala, Val, Ile, Asn et Gln (mais favorisé par les protections permanentes en cours de synthèse)



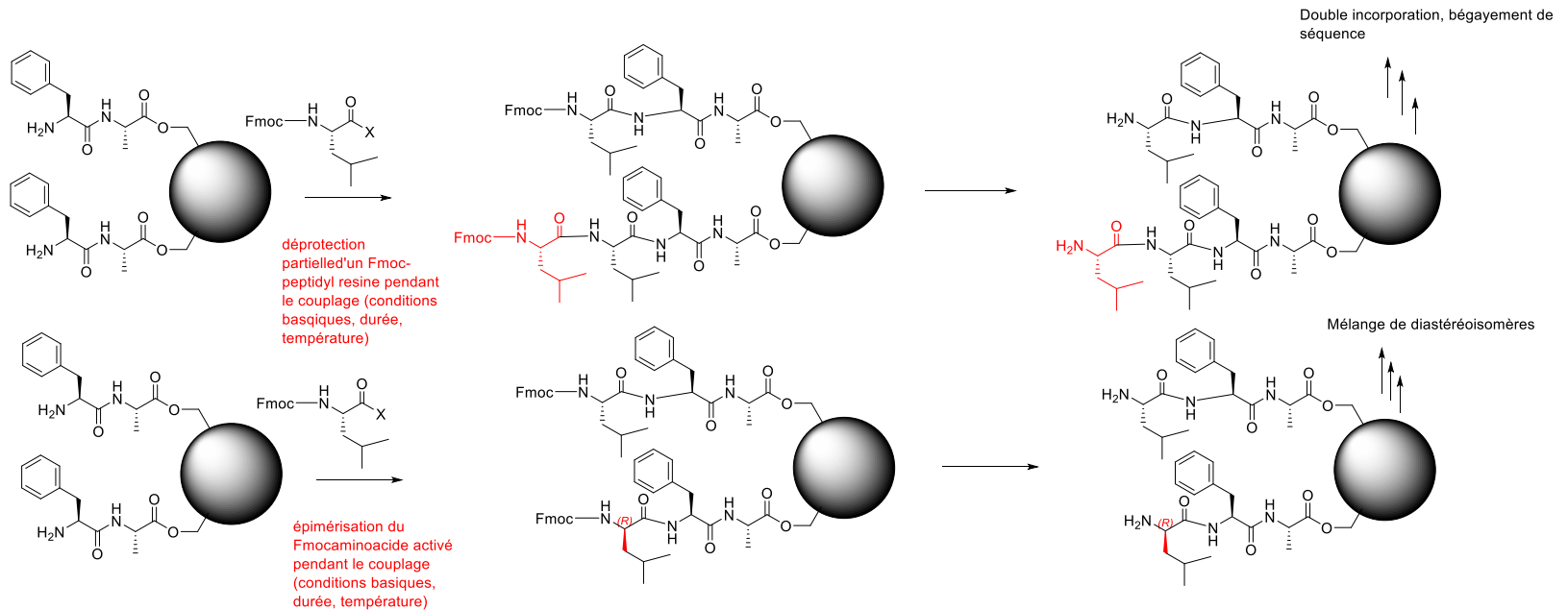
Certains peptides naturels s'agrègent en forment des fibrilles insolubles
(exemple: peptide amyloïde)



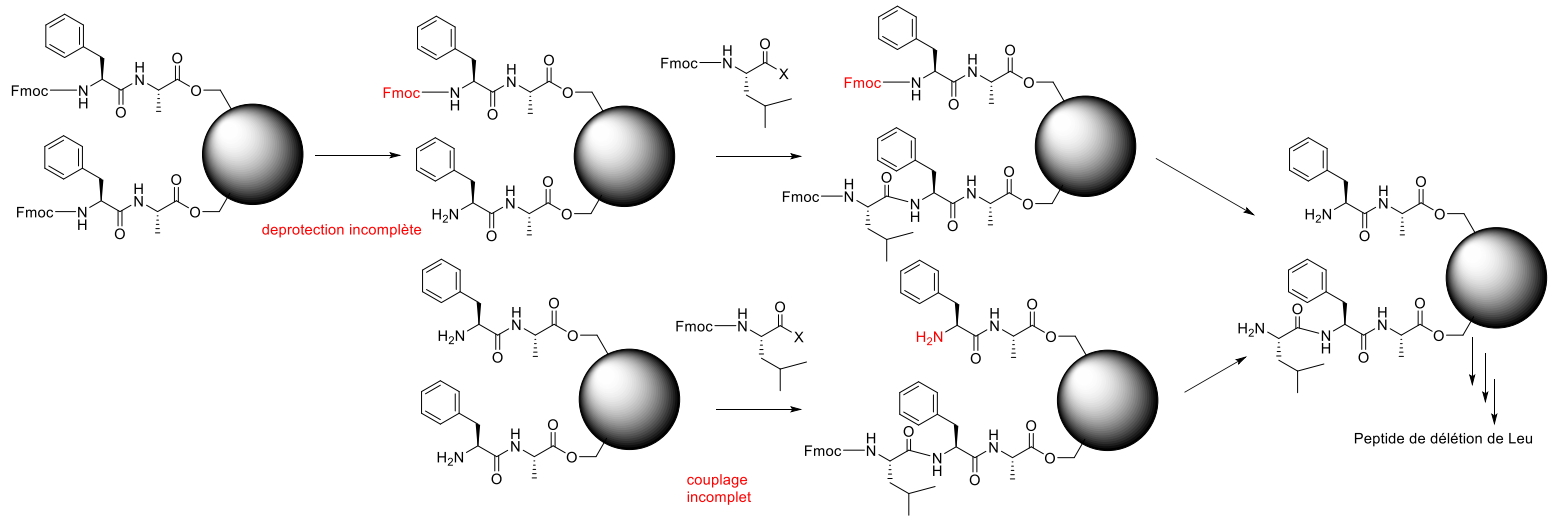
Problèmes de synthèse peptidique



Problèmes de synthèse peptidique



Problèmes de synthèse peptidique



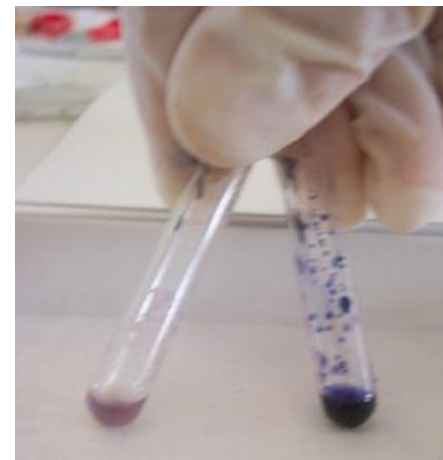
Diagnostic préventif d'un couplage incomplet: Détection des amines primaires libres

Test de Kaiser: 100°C 3minutes

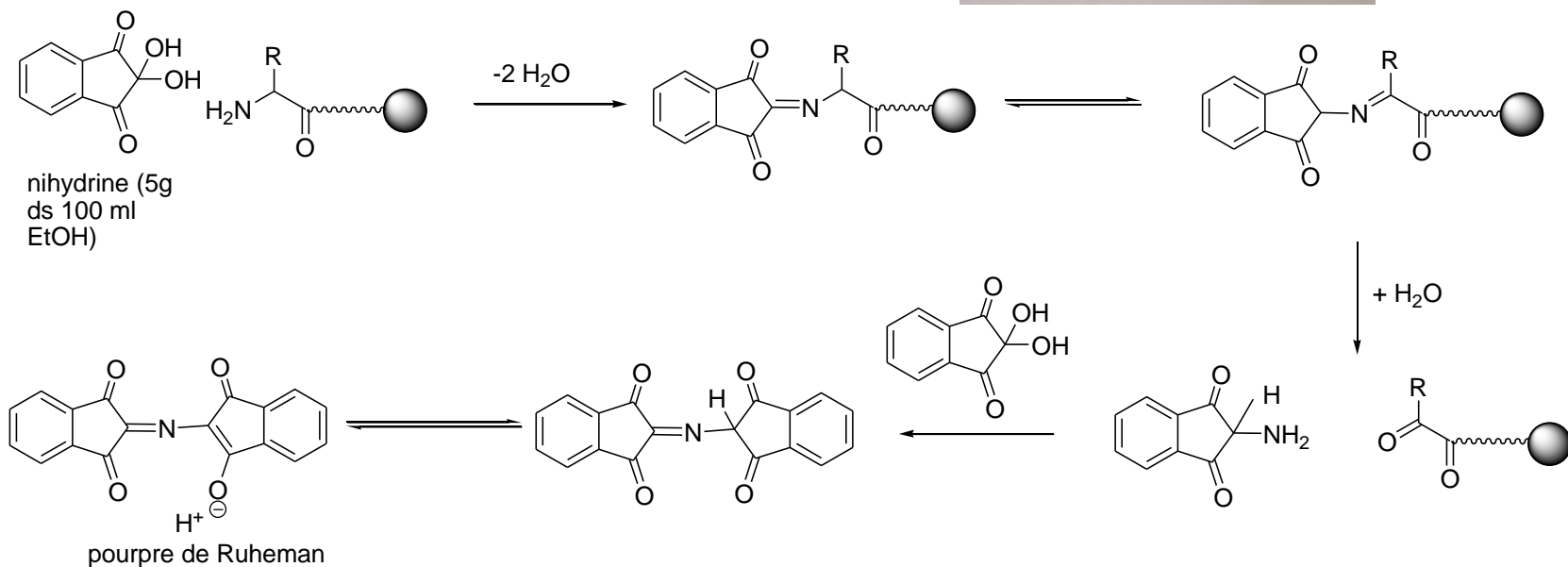
Solution 1: 5g ninhydrine ds 100 ml EtOH

Solution 2: 80 g de phénol dans 20 ml EtOH

Solution 3 : 2ml 1mM KCN dans 98 ml pyridine



Couleur brune avec la proline et les amines II

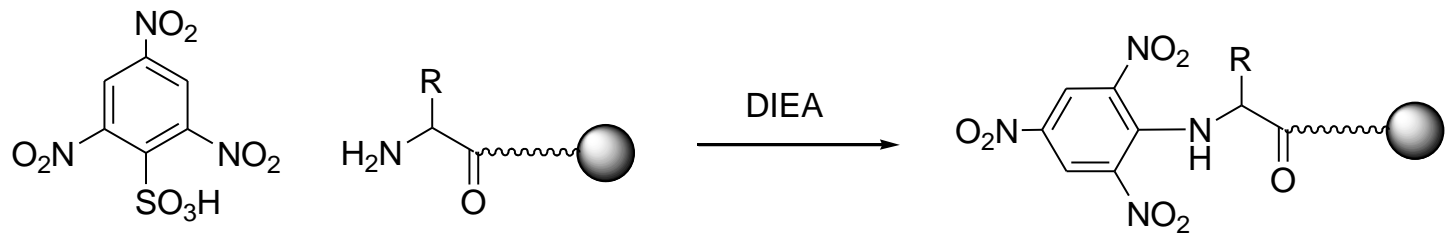


Diagnostic préventif d'un couplage incomplet: Détection des amines primaires libres

Test au TNBS:

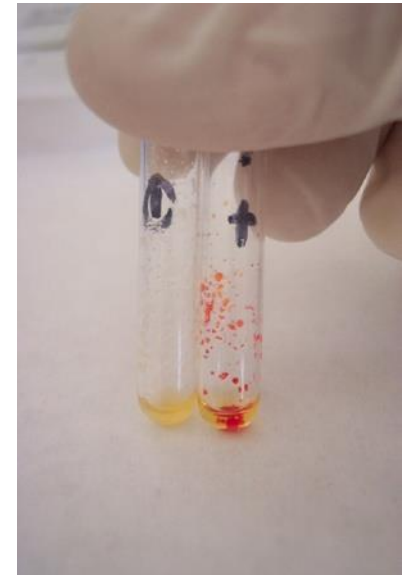
Solution 1: 10% DIEA dans DMF

Solution 2 : 1M TNBS dans eau



HSO₃⁻ DIEA, H⁺
bisulfite

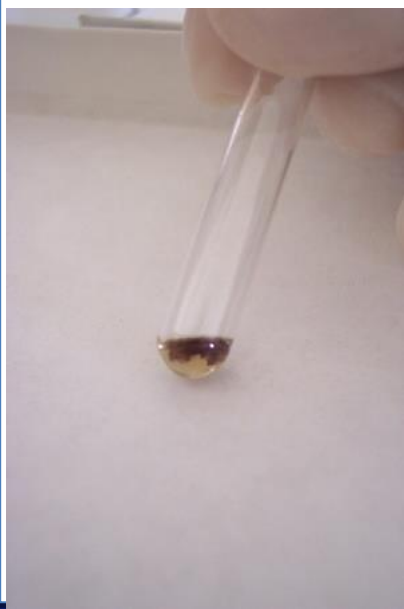
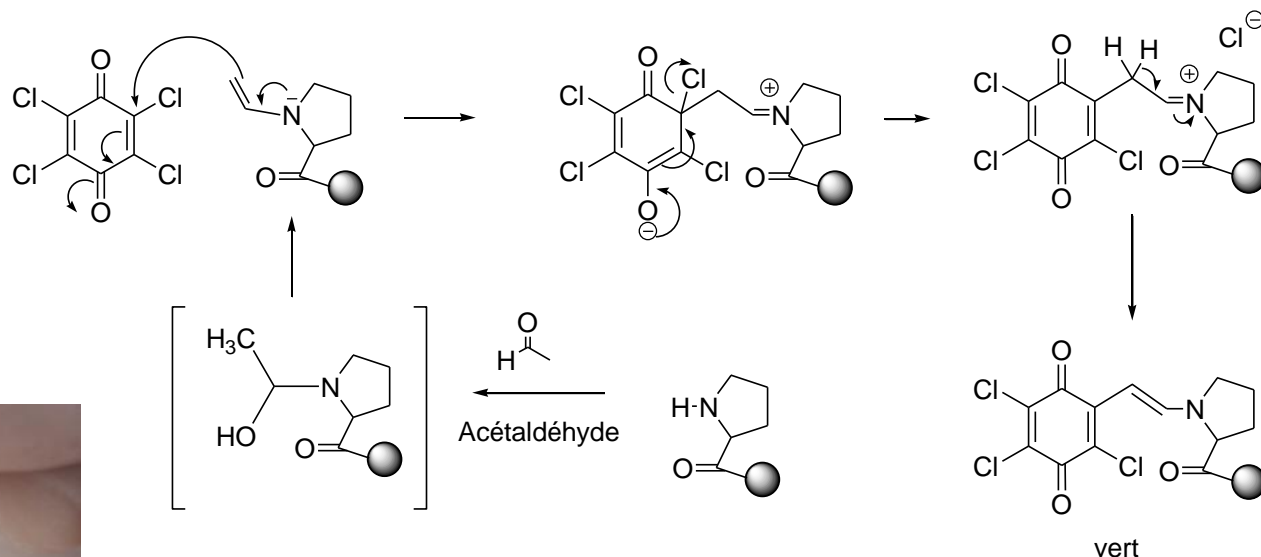
Attention: marche mal sur
le premier aminoacide ancré sur trityl



W.S. Hancock, J.E. Battersby, *Anal. Biochem.* 71 (1976) 260.

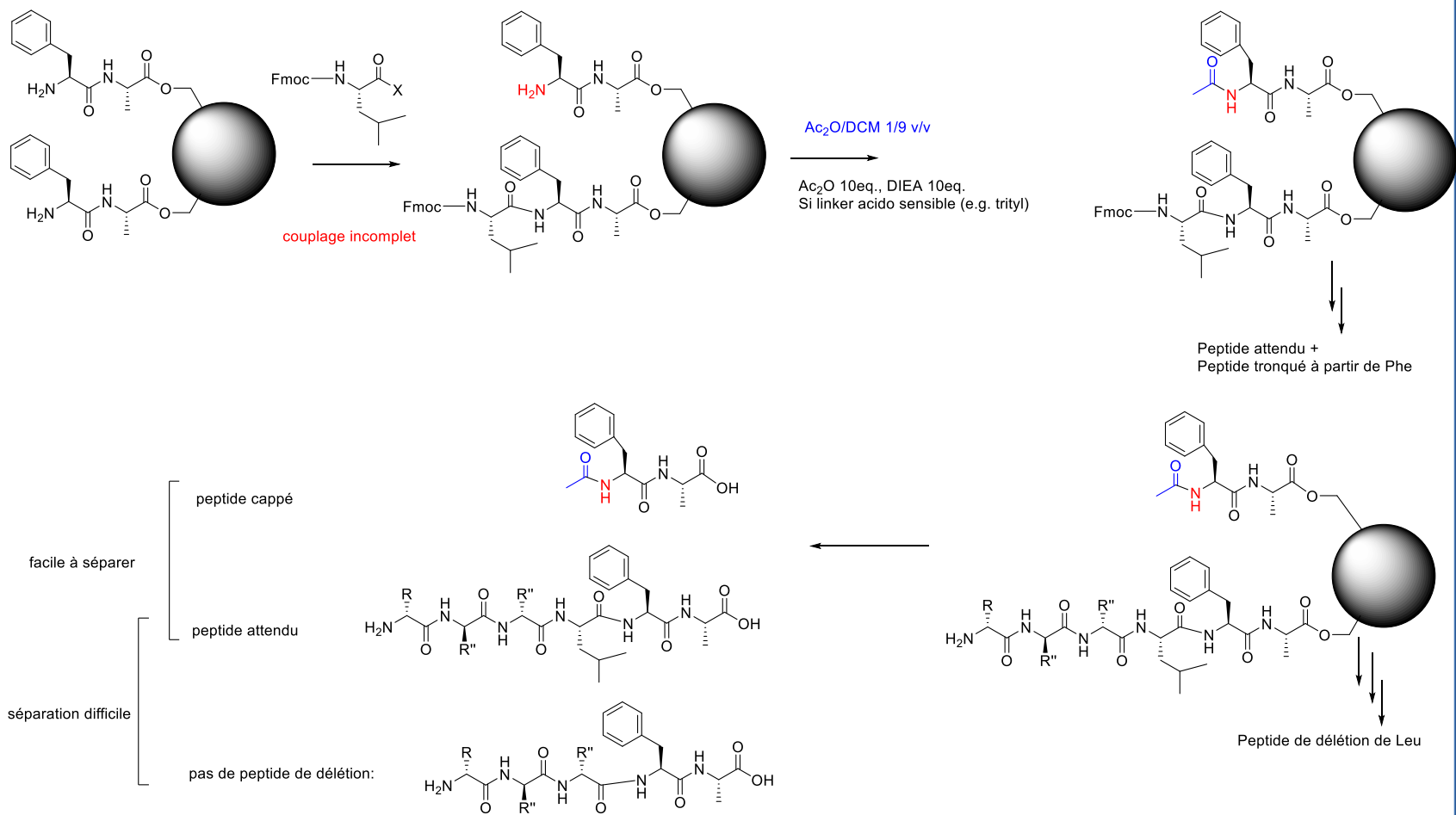
Diagnostic préventif d'un couplage incomplet: Détection des amines secondaires libres

Test au Chloranil (amines II libres):



Pour les amines primaires, on peut utiliser
l'acétone à la place de l'acétaldéhyde

Si le double couplage échoue : « capping »



Clivage et traitement

Milieu acide

Carbocations -> utiliser des scavengers

Cocktail 1 : 95/2.5/2.5

TFA/eau/triisopropylsilane

Cocktail 2 : 90/2.5/2.5/5

TFA/anisole/thioanisole/ EDT

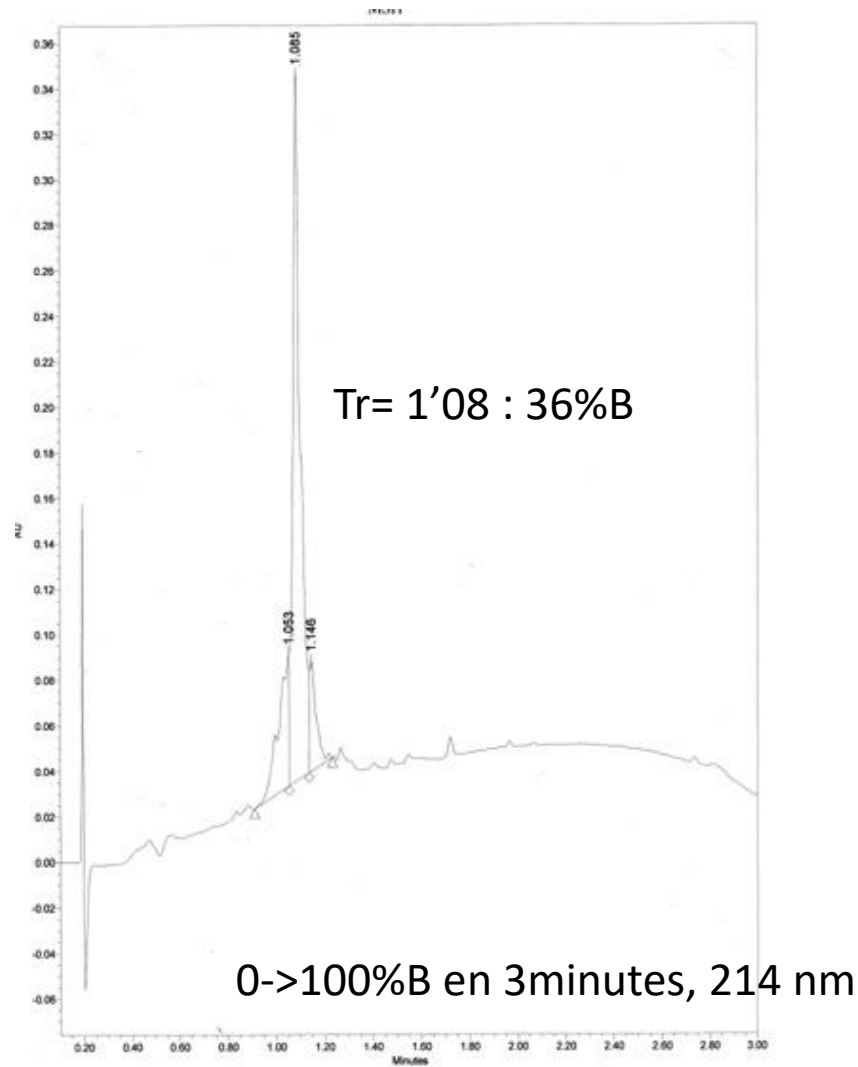
Volume : compter au moins 10ml pour 100 mg de résine et 20ml pour les peptides les plus riches en protections pour éviter les déprotection incomplètes (trt, pbf, pmc..)

Temps : 1.5 heures à 12 heures suivant le nombre de protections.



Diagnostic du clivage: Analyse LC-MS

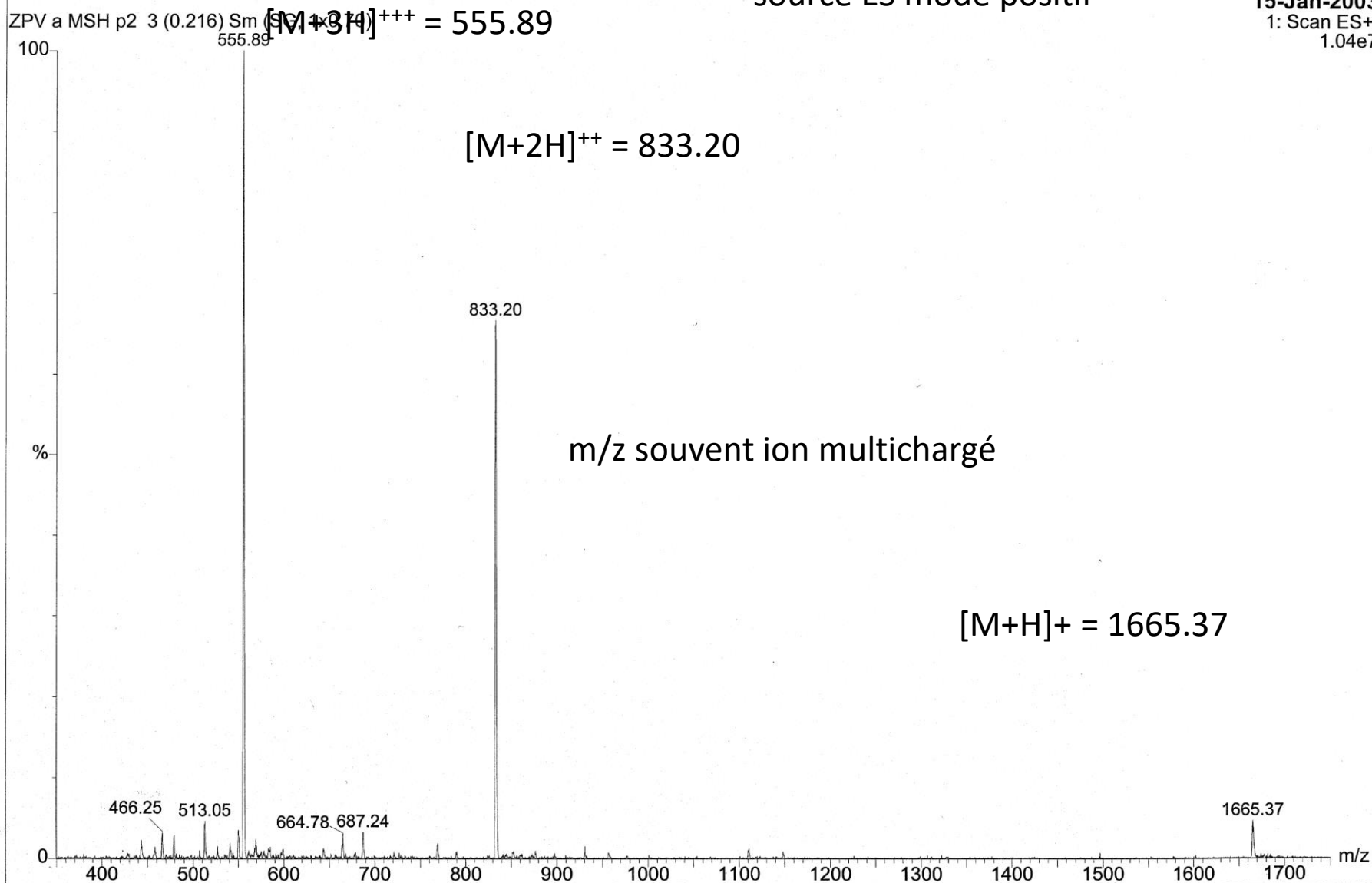
A: eau1/1000 TFA
B: ACN 1/1000 TFA
C18



Diagnostic du clivage: Analyse LC-MS

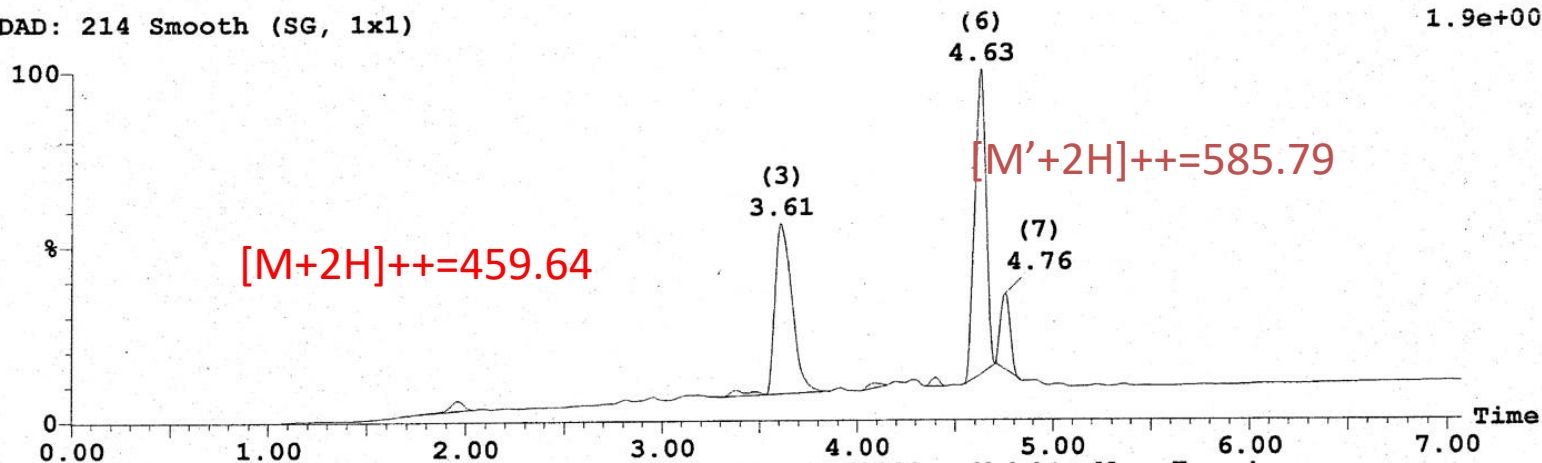
Analyseur quadrupole
source ES mode positif

14:20:32
15-Jan-2003
1: Scan ES+
1.04e7

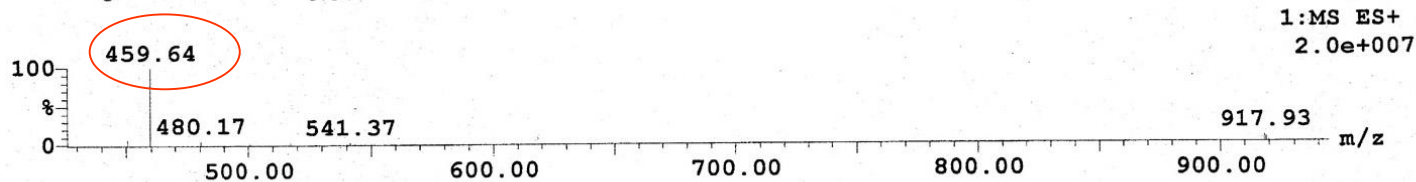


DAD: 214 Smooth (SG, 1x1)

1.9e+006



Peak ID	Compound	Time	Mass Found
3		3.61	



1:MS ES+
2.0e+007

Différence=126.2 -> 252 sur l'ion monochargé

Peak ID	Compound	Time	Mass Found
6		4.63	



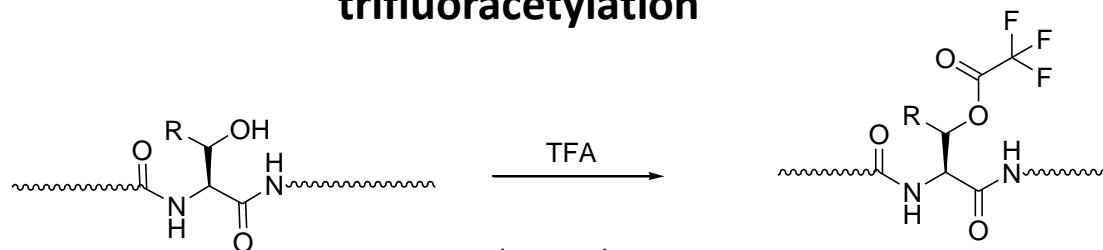
1:MS ES+
5.9e+006

Déprotection insuffisante de l'Arg(pbf)

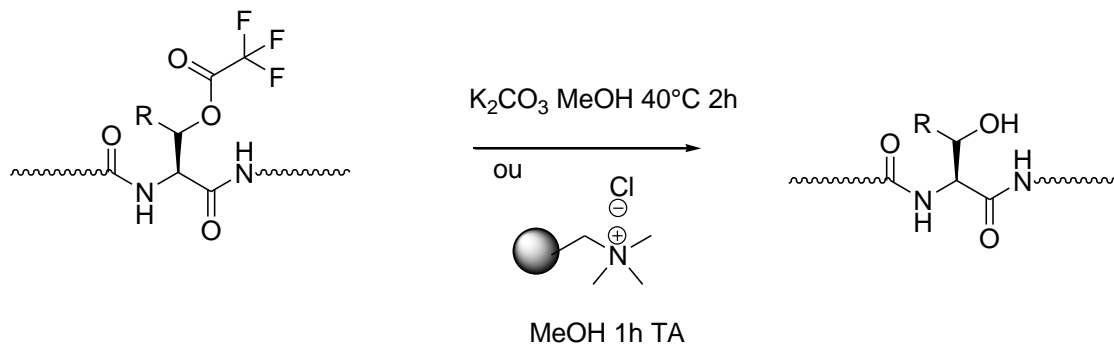
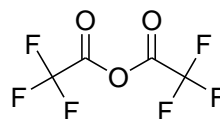
Peak ID	Compound	Time	Mass Found
7		4.75	

Réactions secondaires pendant le clivage au TFA

trifluoracétylation



normalement obtenu avec



Réaction sequence dépendante, pouvant être obtenue avec le TFA non activé sur certains alcools. Le TFA s'emploie aussi comme protection baso labile des amine (trifluoroacetamide) ou des alcools

FmocAlaOH (A)	311,34
FmocAsp(OtBu)OH (D)	411,45
FmocGlu(OtBu)OH (E)	425,49
FmocPheOH (F)	387,44
FmocGlyOH (G)	297,31
FmocHis(Boc)OH (H)	477,5
FmocCys(Acm)OH	414,5
FmocCys(trt)OH	589,7
FmocIleOH (I)	353,42
FmocLys(Boc)OH (K)	468,55
FmocLeuOH (L)	353,42
FmocAsn(trt)OH (N)	596,69
FmocMetOH (M)	371,46
FmocOrn(Boc)OH(O)	454,55
FmocProOH (P)	337,38
FmocGln(Trt)OH (Q)	610,72
FmocArg(Pbf)OH (R)	648,8
FmocSer(tbu)OH (S)	383,84
FmocThr(tbu)OH (T)	397,47
FmocValOH(V)	339,39
FmocTrp(Boc)OH (W)	526,6
FmocTyr(tbu)OH (Y)	459,54

Ala	71
Cys	103
Asp	115
glu	129
Phe	147
Gly	57
His	137
ile	113
Lys	128
Leu	113
Met	131
Asn	114
Pro	97
Gln	128
Arg	156
Ser	87
Thr	101
Val	99
Trp	186
Tyr	163
Fmoc-	223
Z-	135
Boc-	101

+222	+Fmoc
+100	+Boc
+56	+tBu
+16	oxydation Trp, Met
+242	+trt
+252	+Pbf
+266	+Pmc
+44	acide carbamique sur indole du Trp
+22	+Na+
+38	+K+
+42	+Acetyl (Nter)
+45	+ Me ₂ NH sur acide activé
+85	+piperidine sur Asp
+90	+Bzl
+96	+TFA sur O
+98	guanylation N ter
391	phtalates des flacons
	PyroGlu ou desamidation Cter CONH ₂ dans le
-17	spectro
-2 aminoacides du coté Cter	DKP
-18	dehydration, Aspartimide,
-2	formation du pont SS
-32	formation de la lanthionine

Remèdes à l' Agrégation - 1

La formation de **liaisons H** inter chaîne et intra chaîne empêche l'accessibilité du N-terminal et conduit à des peptides de délétion

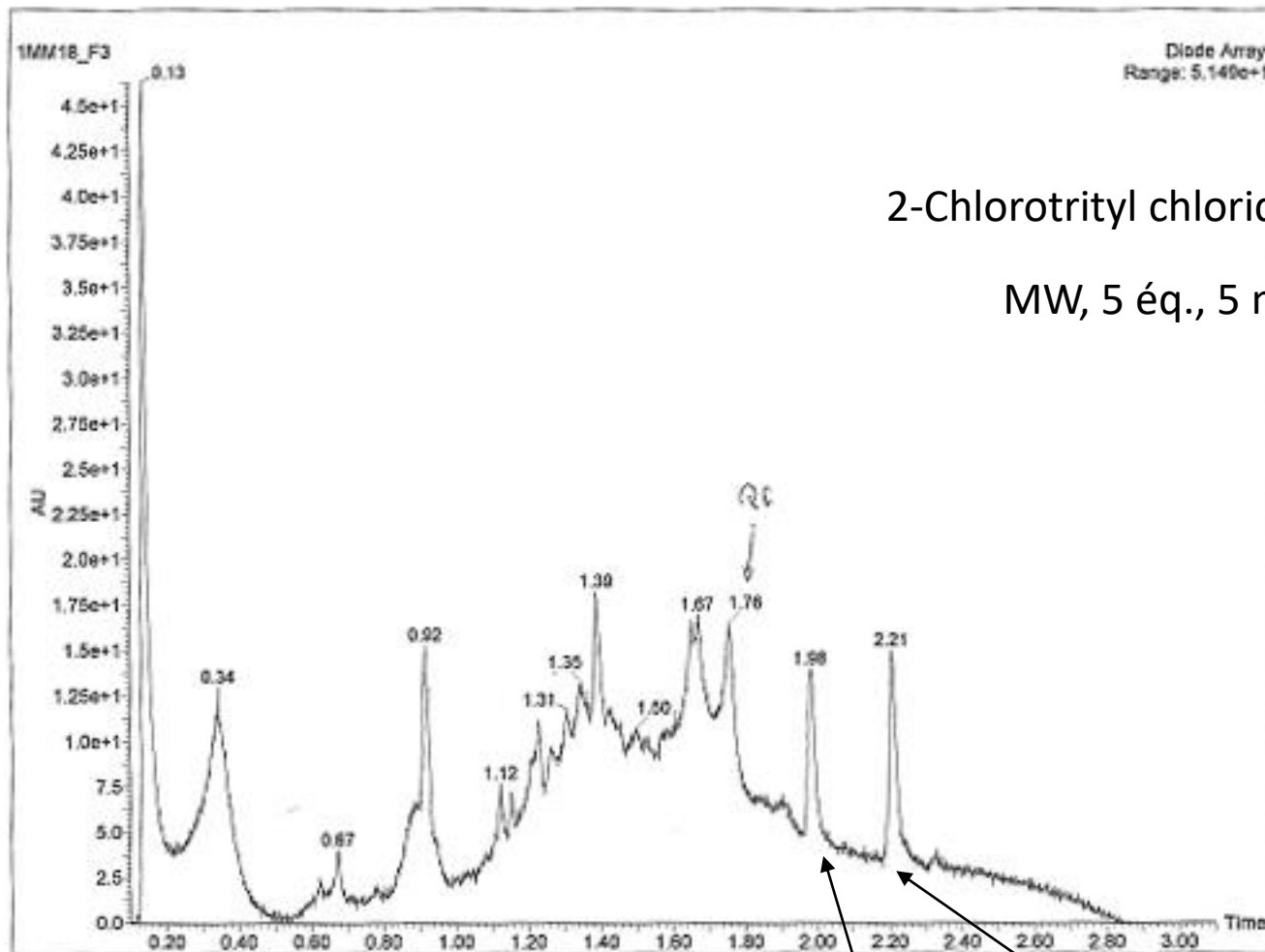
- Nouveaux agents de couplage: peu d'impact sauf sécurité/greenitude
- En recherche: solvants alternatifs (eau, sans solvant), N to C SPPS
- Microonde: peu d'impact sauf vitesse
- Matrices SPPS hydrophiles (type Peg): amélioration importante (e.g. ChemMatrix, Amphisphere)
- AA modifiés avec 'Auxillaires anti agrégation' peut avoir un impact important cas par cas.

Les vieux remèdes:

- Changer de **matrice**: Préférer les matrices non PS
- Changer de **loading** <0.2 mmol/g
- Passer en stratégie Boc!** Alternance de conditions acides/basiques qui change l'état de protonation de la <chaîne peptidique en croissance

LL-37

H-LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES-OH



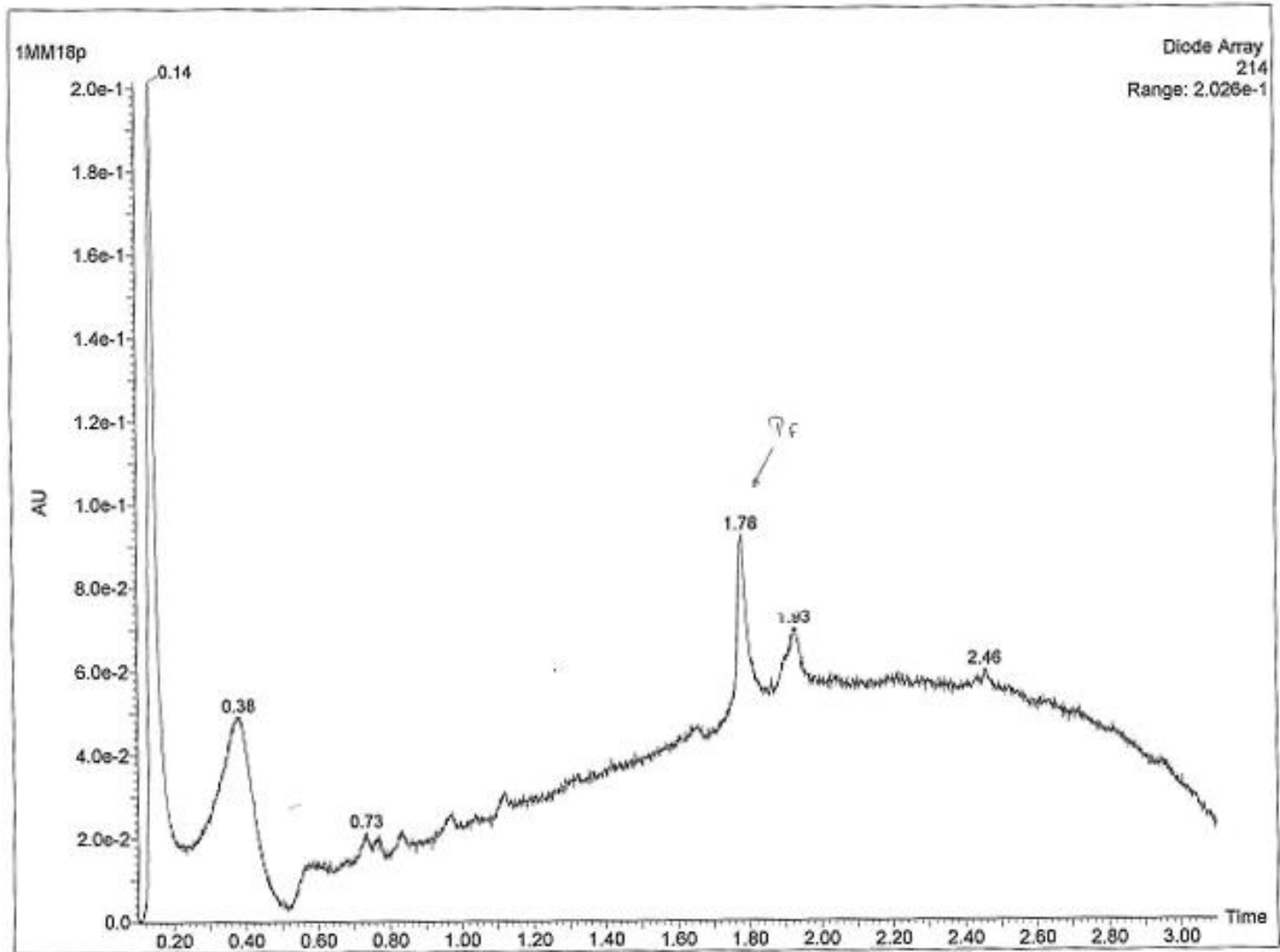
2-Chlorotriyl chloride PS

MW, 5 éq., 5 min

Trt

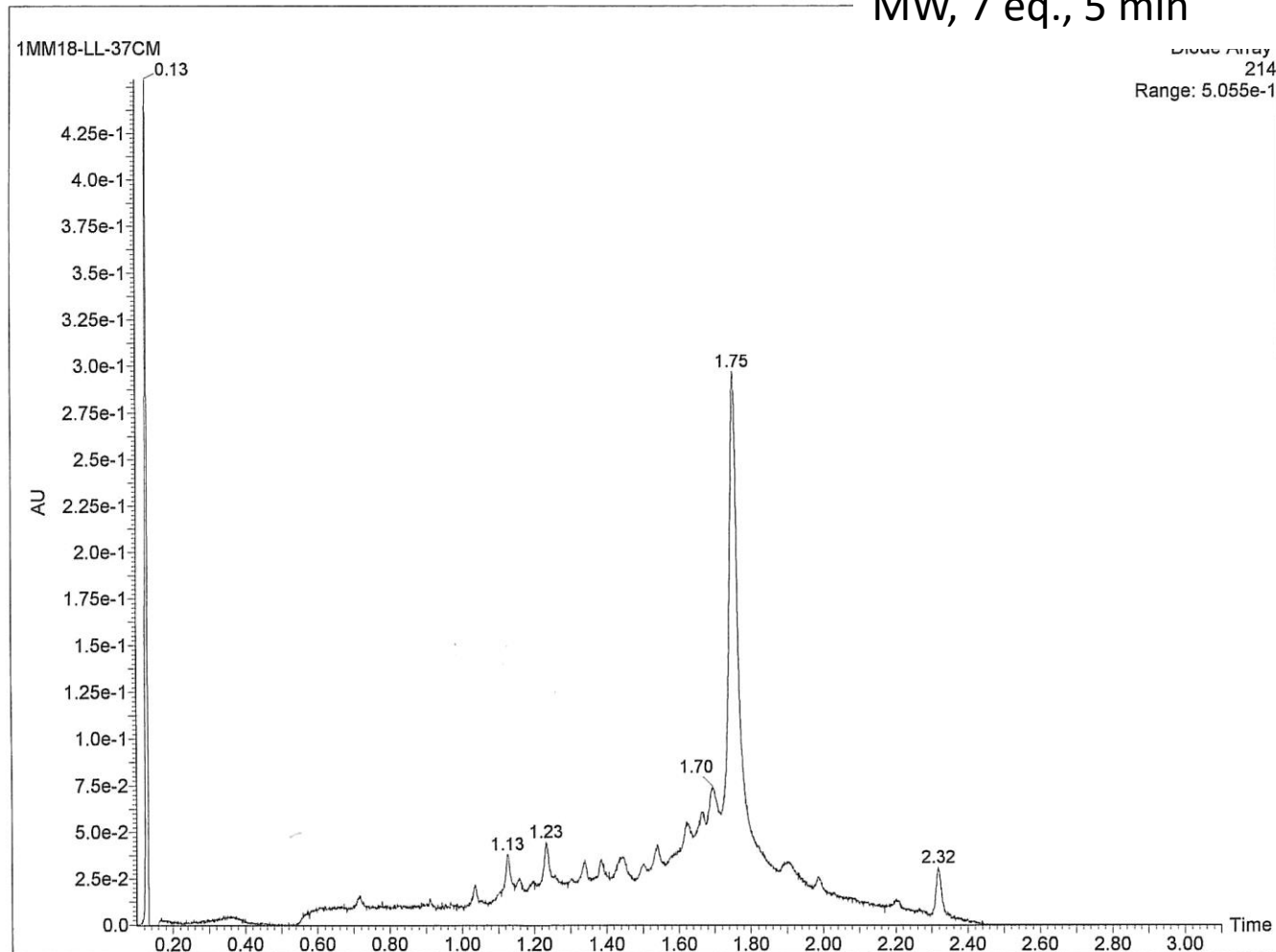
Pbf

Purif Autoprep LC/MS XBridge

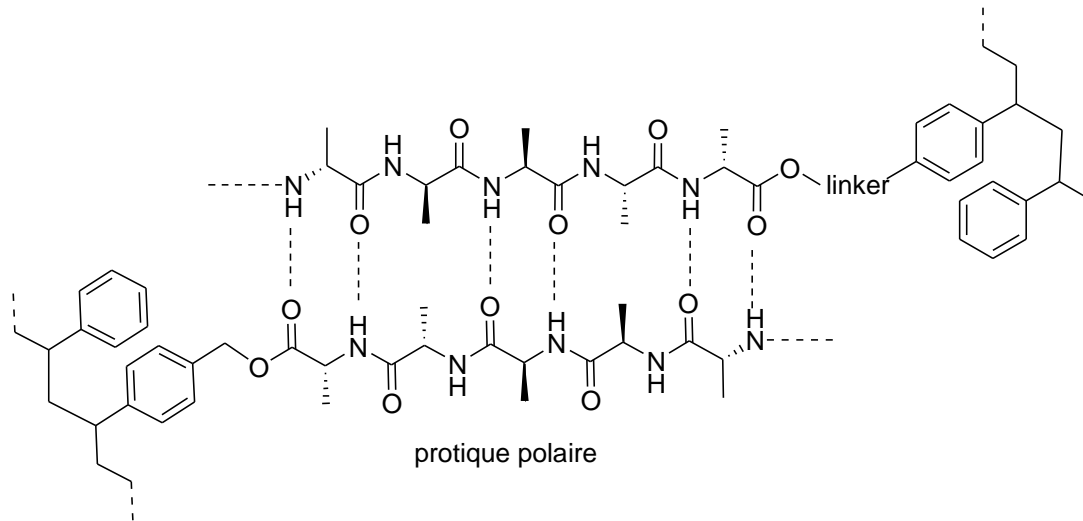


ChemMatrix HMPB

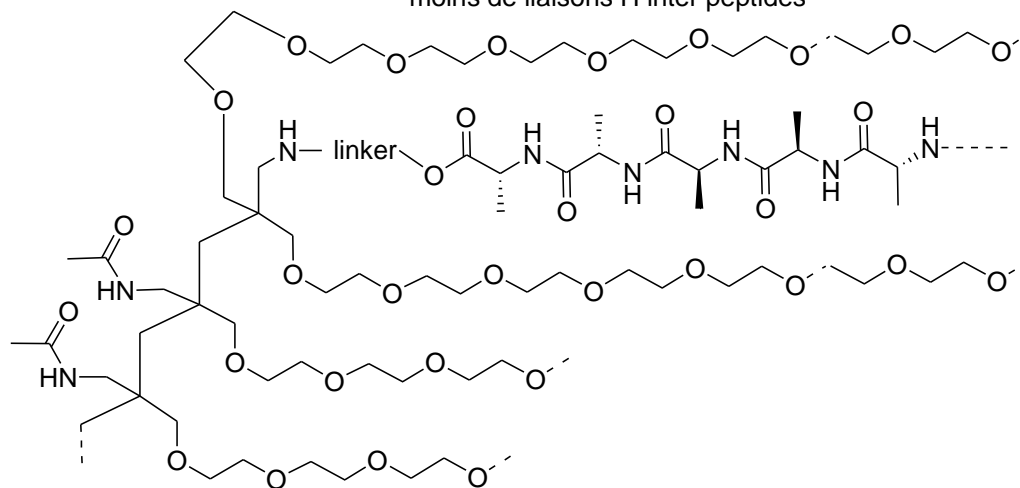
MW, 7 éq., 5 min



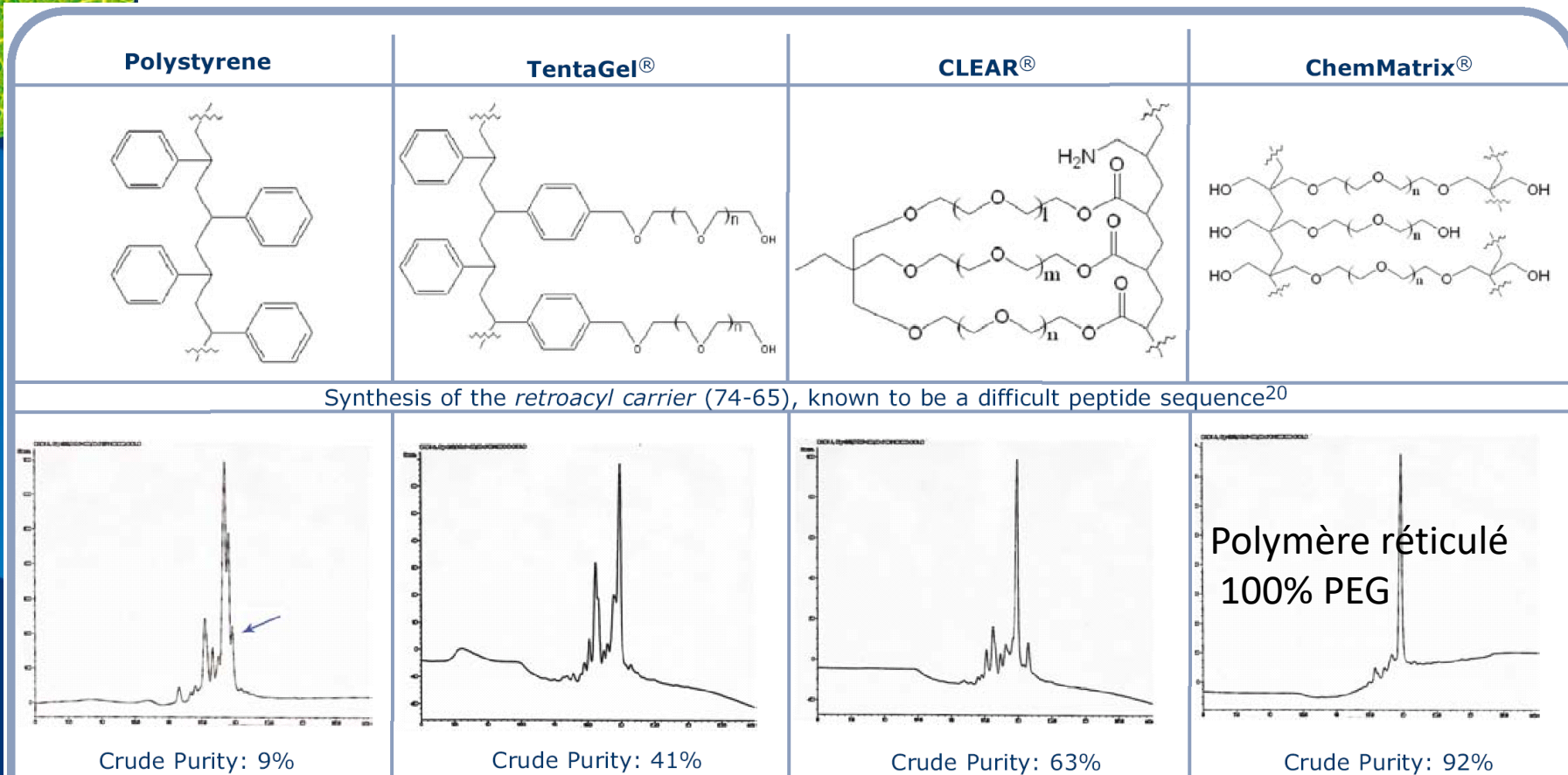
Changer de matrice: Préférer les matrices non PS



bonne solubilité du peptide dans le PEG:
moins de liaisons H inter peptides



Influence de la matrice sur la qualité de SPPS



Séquence modèle: H-Val-Gln-Ala-Ala-Ile-Asp-Tyr-Ile-Asn-Gly-OH

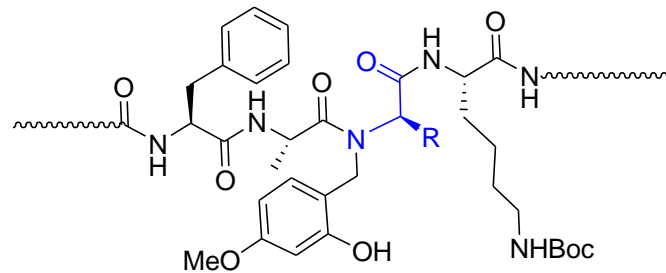
<http://www.boumdesign.qc.ca/matrix/chemmatrix.pdf>

Remèdes à l' Agrégation - 2

- **Mimer des prolines** : introduction de 'coudes' artificiels
- 2 méthodes en stratégie Fmoc :
 - Hmb
 - Pseudo prolines
- **'O-N Acyl isopeptide'** Methode (« click peptides »)
- **utiliser les microondes**

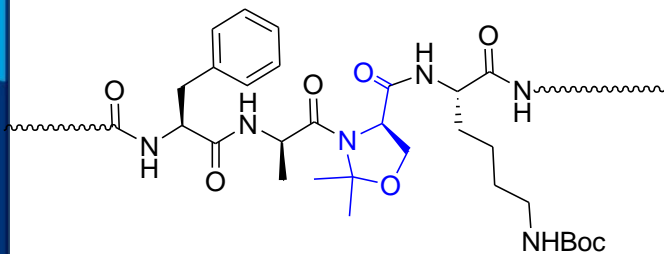
Briseurs d'agrégation en stratégie Fmoc

-Phe-Ala-(hmb)Aaa-Lys(Boc)-



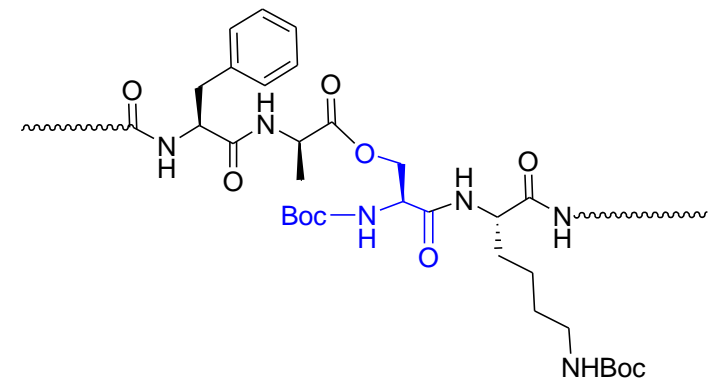
Groupement Hmb (hydroxy methyl benzyl)

-Phe-Ala-Ser ψ (Me,Me)Pro-Lys(Boc)-



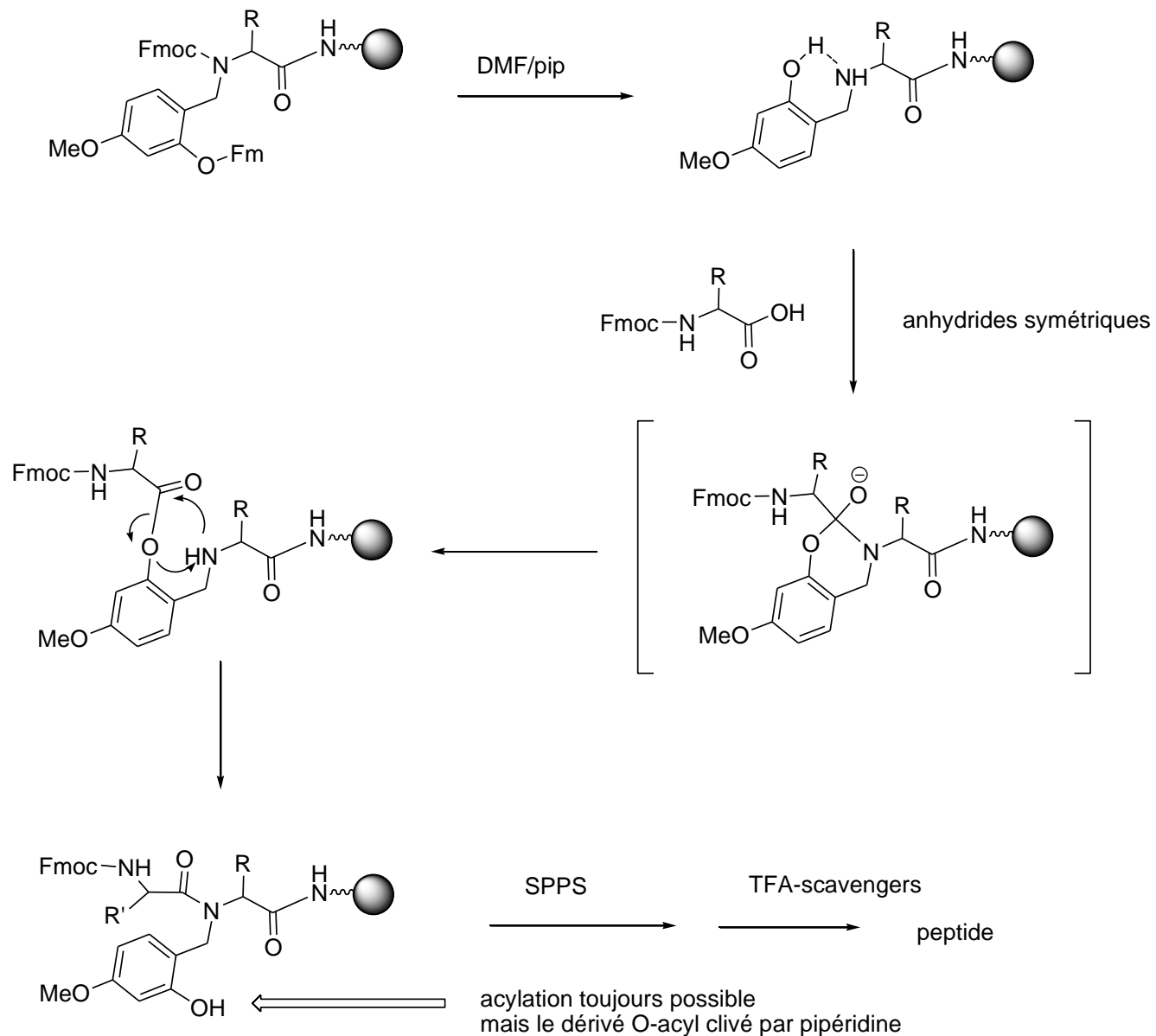
Diméthylloxazolidines
et diméthylthiazolidines : Pseudo prolines

BocSer(....-Phe-Ala-)Lys(Boc)-

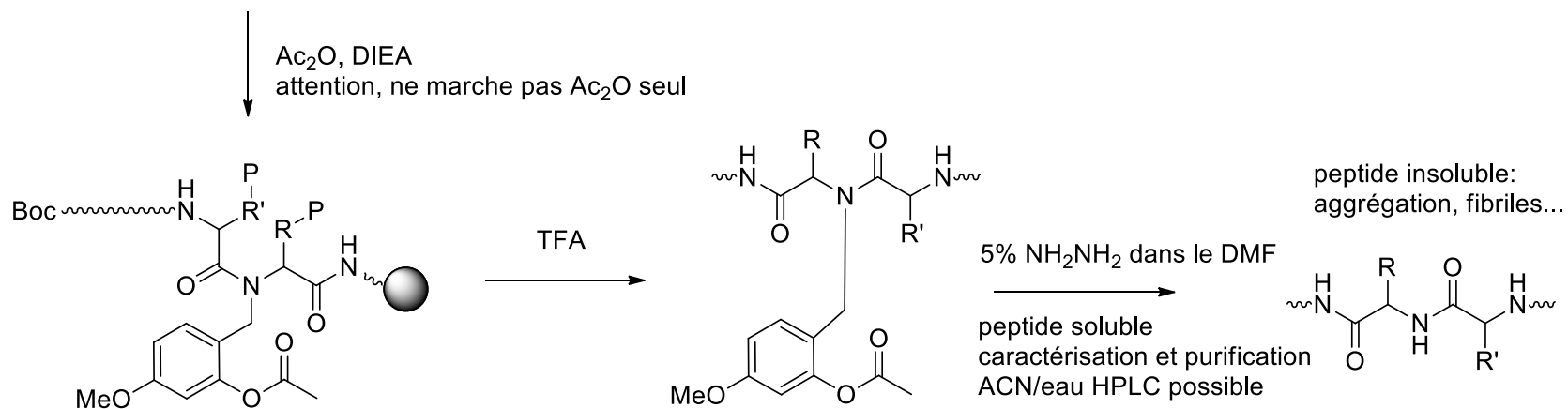
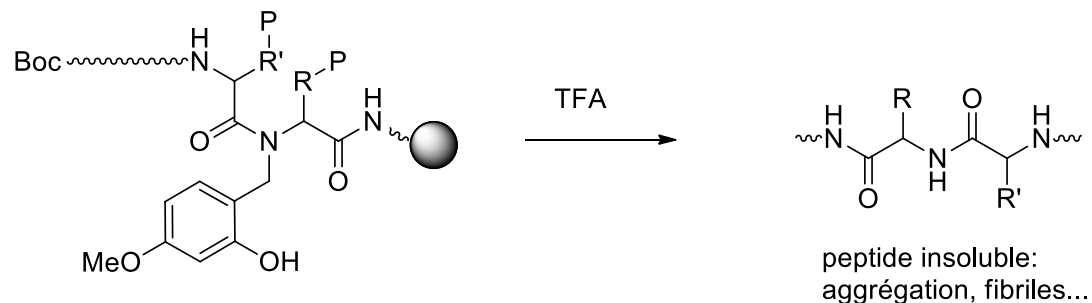


O-acyl isopeptides

Utilisation en synthèse des dérivés Hmb



Utilisation des dérivés Hmb pour augmenter la solubilité



Quibell et al. J. Org. Chem. 1994, 59, 1745-1750

Utilisation de Fmoc-AA-Ser/Thr ψ (^{Me,Me} Pro)-OH

GRTCPKPDDL PFSTVPLKT FYEPGEEITY SCKPGYVSRG GMRKFICPLT
GLWPINTLKCTPRV

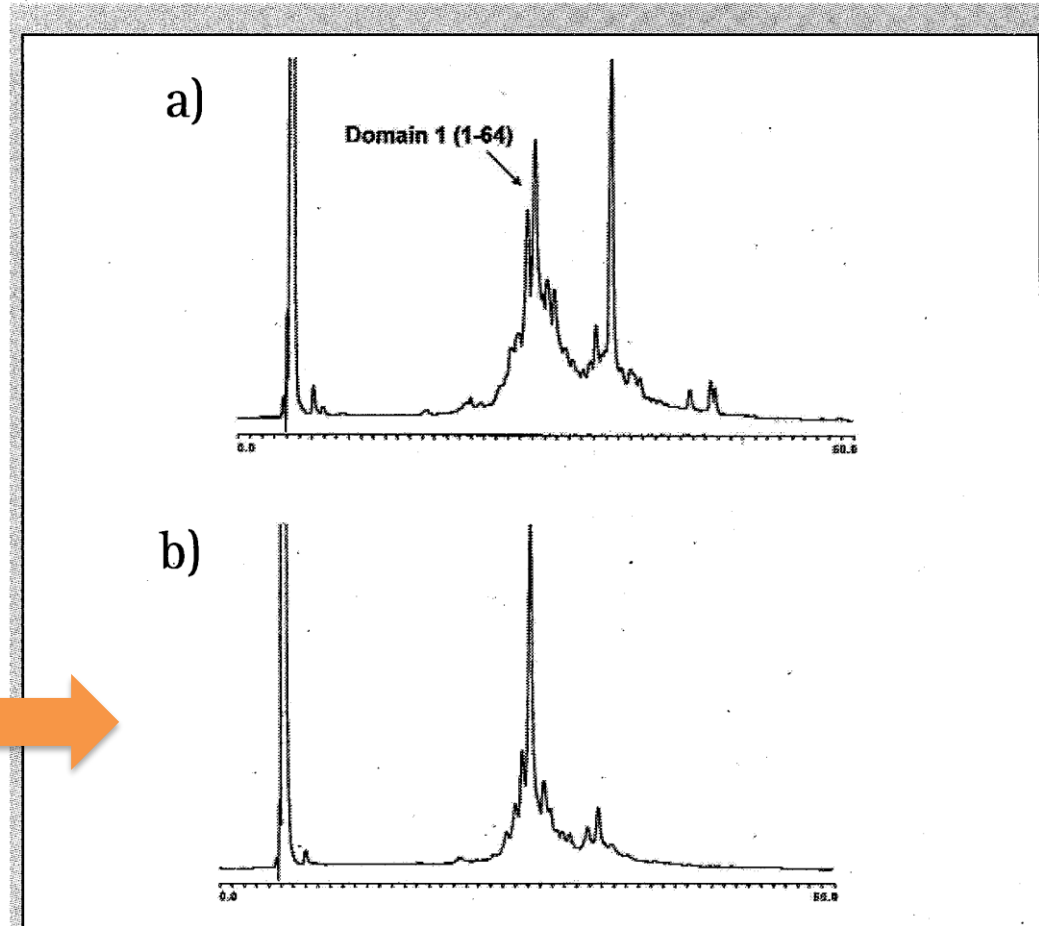
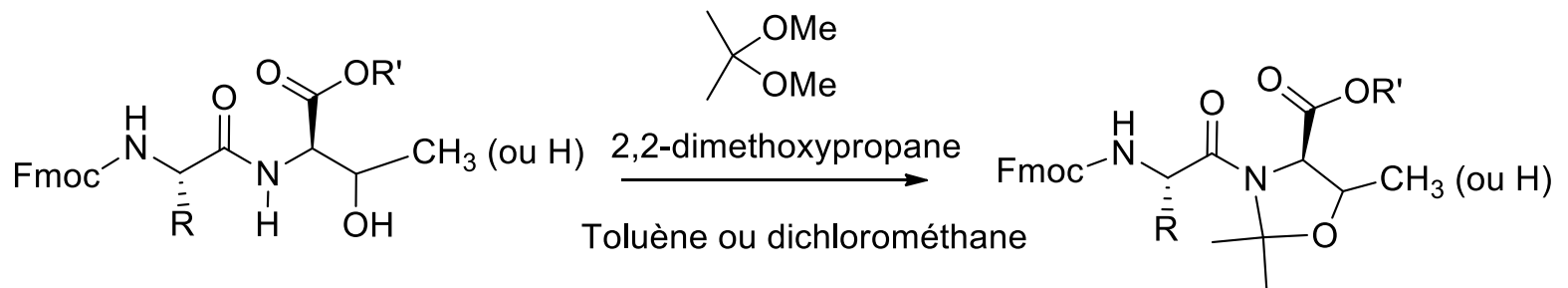


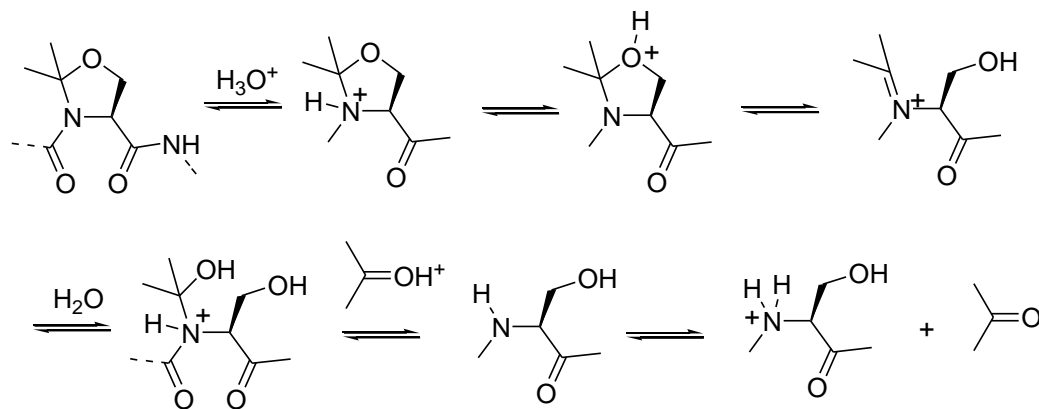
Figure 2: HPLC profiles of a) crude Domain 1 prepared using standard amino acid building blocks; b) crude Domain 1 prepared using a single pseudoproline dipeptide.

Préparation des pseudoprolines

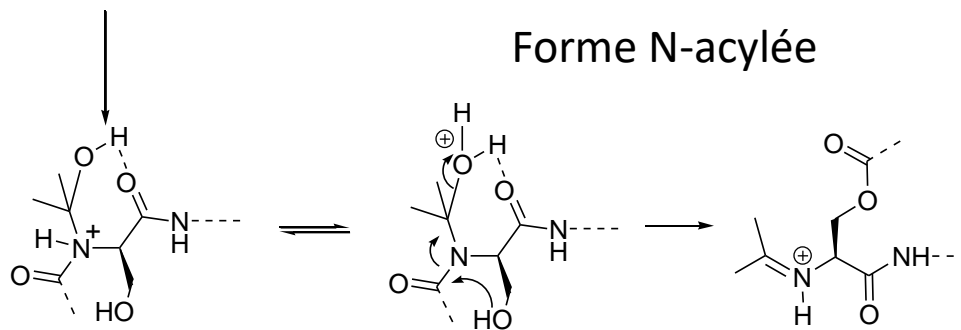


R'=An, All, Me, Su

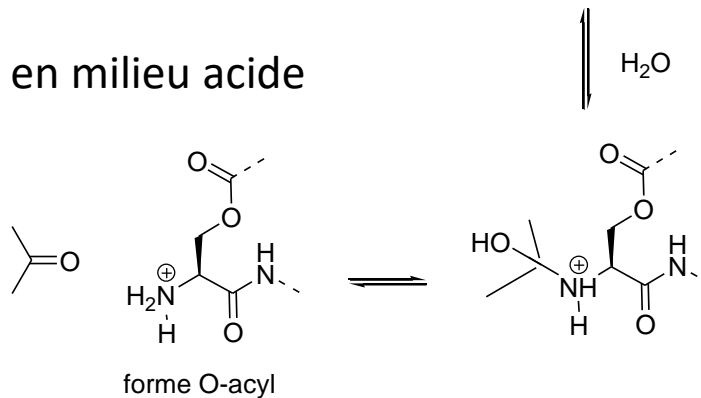
Déprotection des pseudoprolines



Forme N-acylée

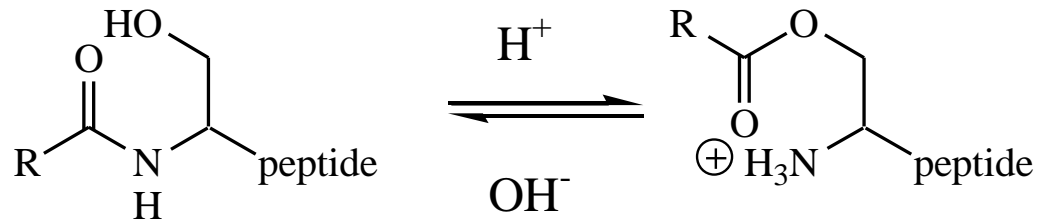


Possibilité de N-O acyl shift en milieu acide

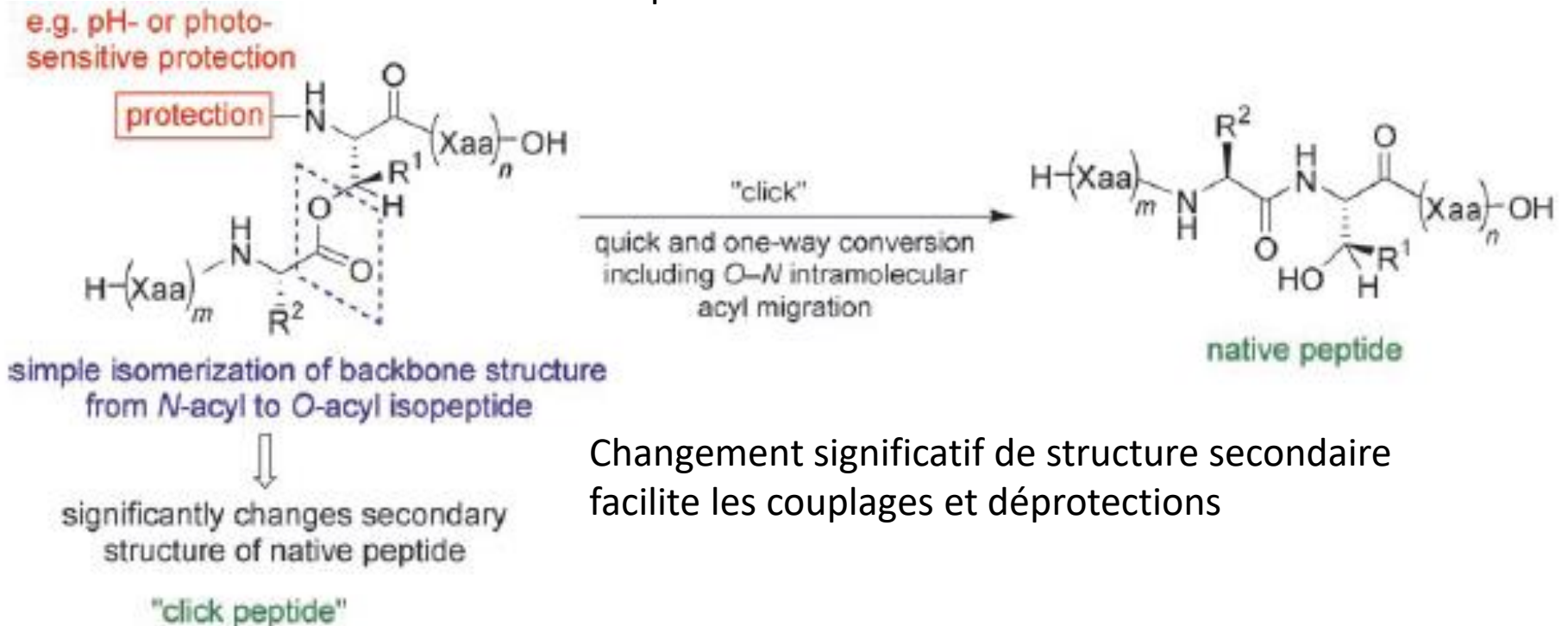


O-N Acyl isopeptide' Methode (« click peptides »)

Basé sur la migration O->N d'acyle, (sérine et thréonine)

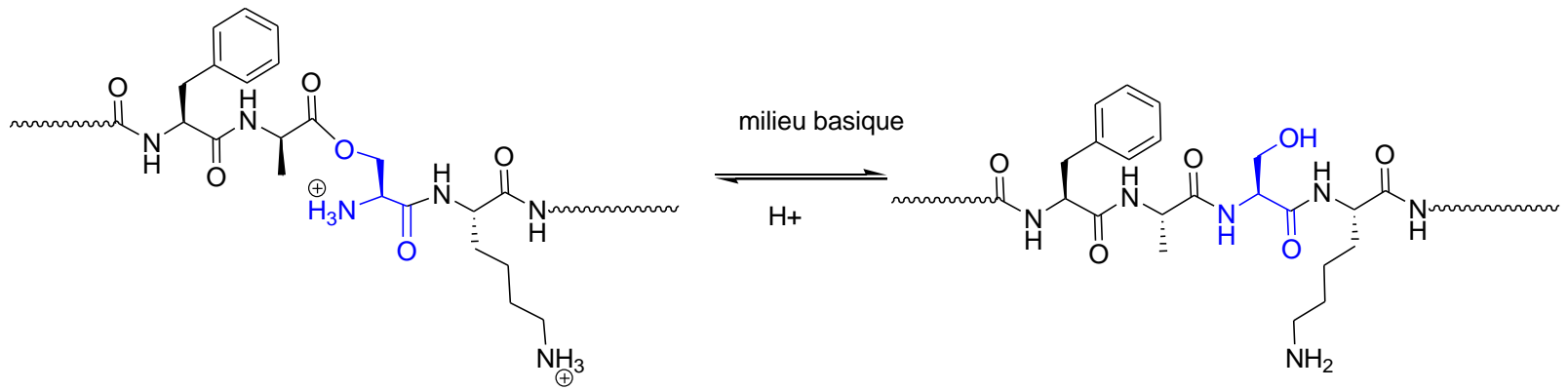


Principe de la méthode

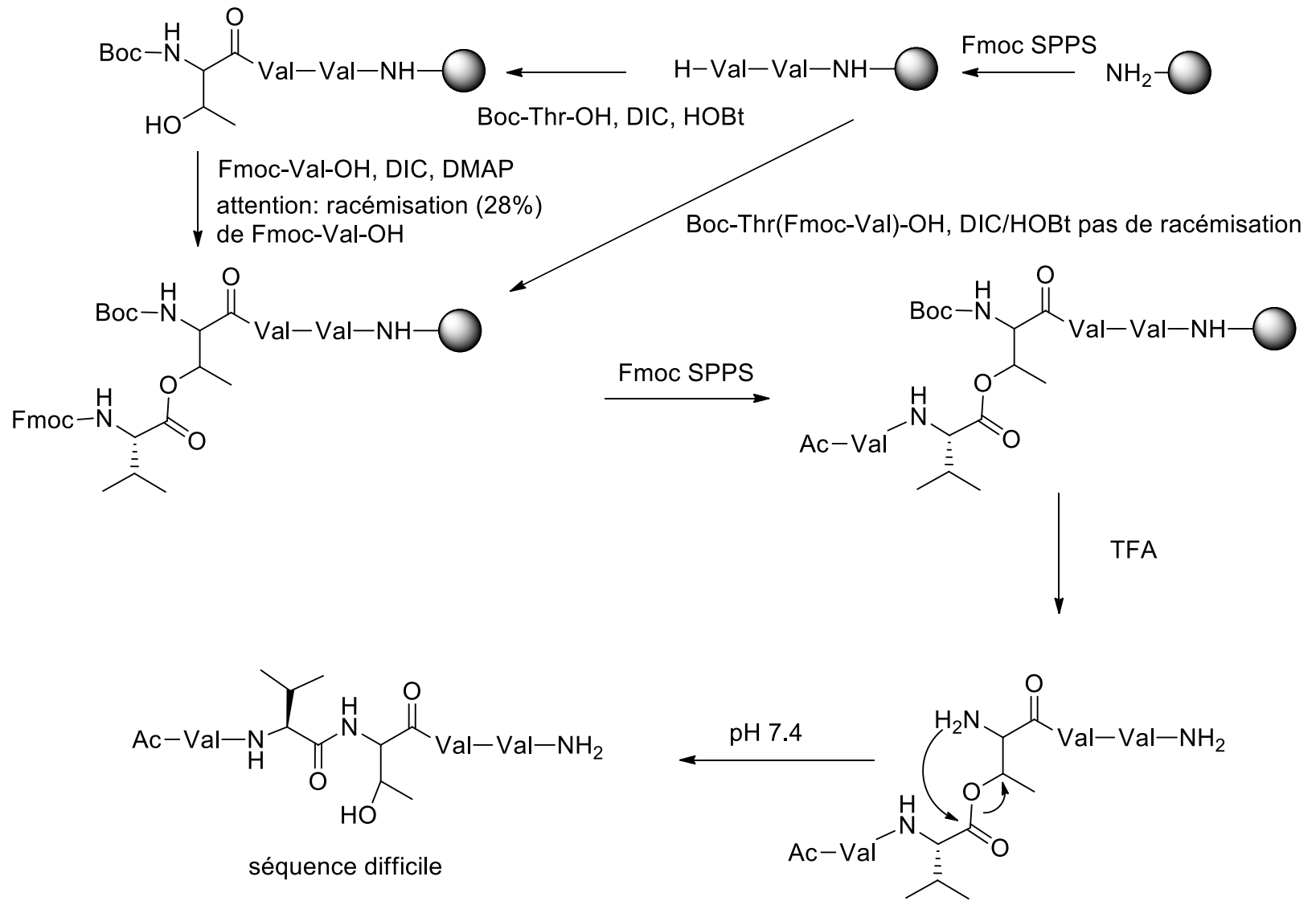


Changement significatif de structure secondaire facilite les couplages et déprotections

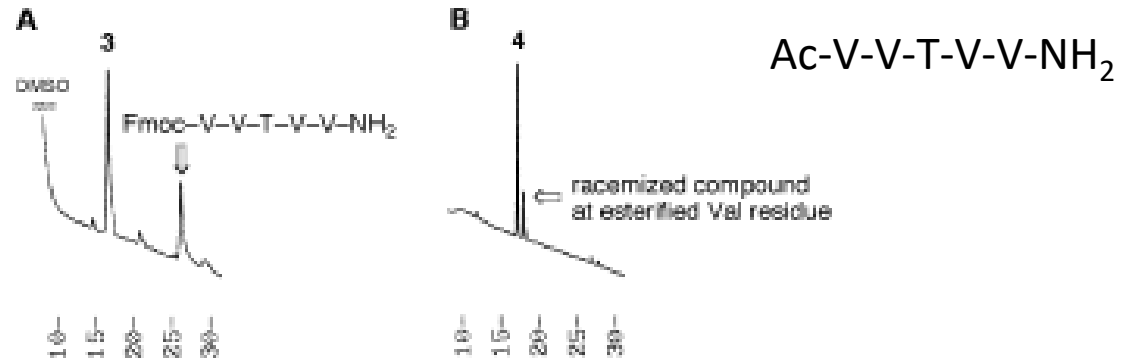
Migration O->N d'acyle,



O-N Acyl isopeptide' Methode (« click peptides »)



O-N Acyl isopeptide' Methode (« click peptides »)



Attention le dipeptide unit n'est pas stable en milieu basique
: le coupler avec DIC/HOBt et pas DIEA, HBTU.

Attention aussi, pas possible de l'accrocher sur trityl sans qu'il s'hydrolyse.

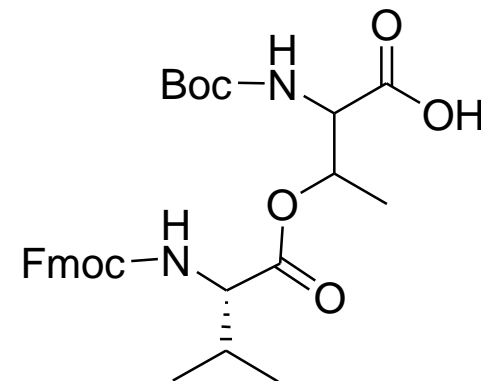
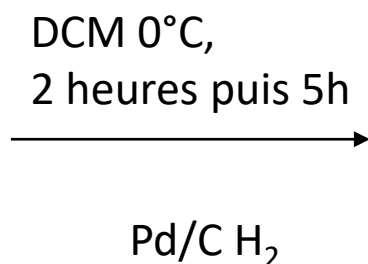
Préparation du 'dipeptide unit'

Fmoc-Val-OH (1,1 eq)

Boc-Thr-OBzl (1eq)

DMAP (0.1 eq)

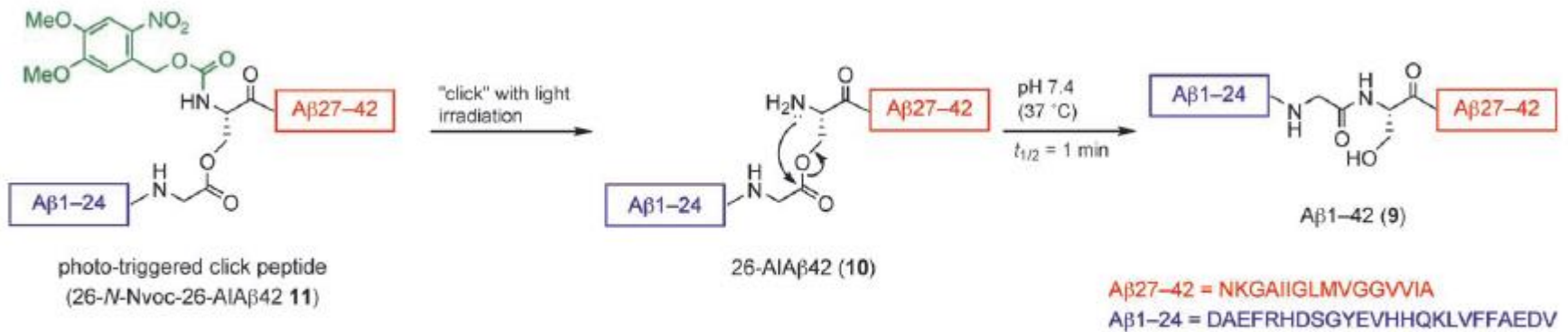
DIC (1 eq)



Pas de racémisation

O-N Acyl isopeptide' Methode (« click peptides »)

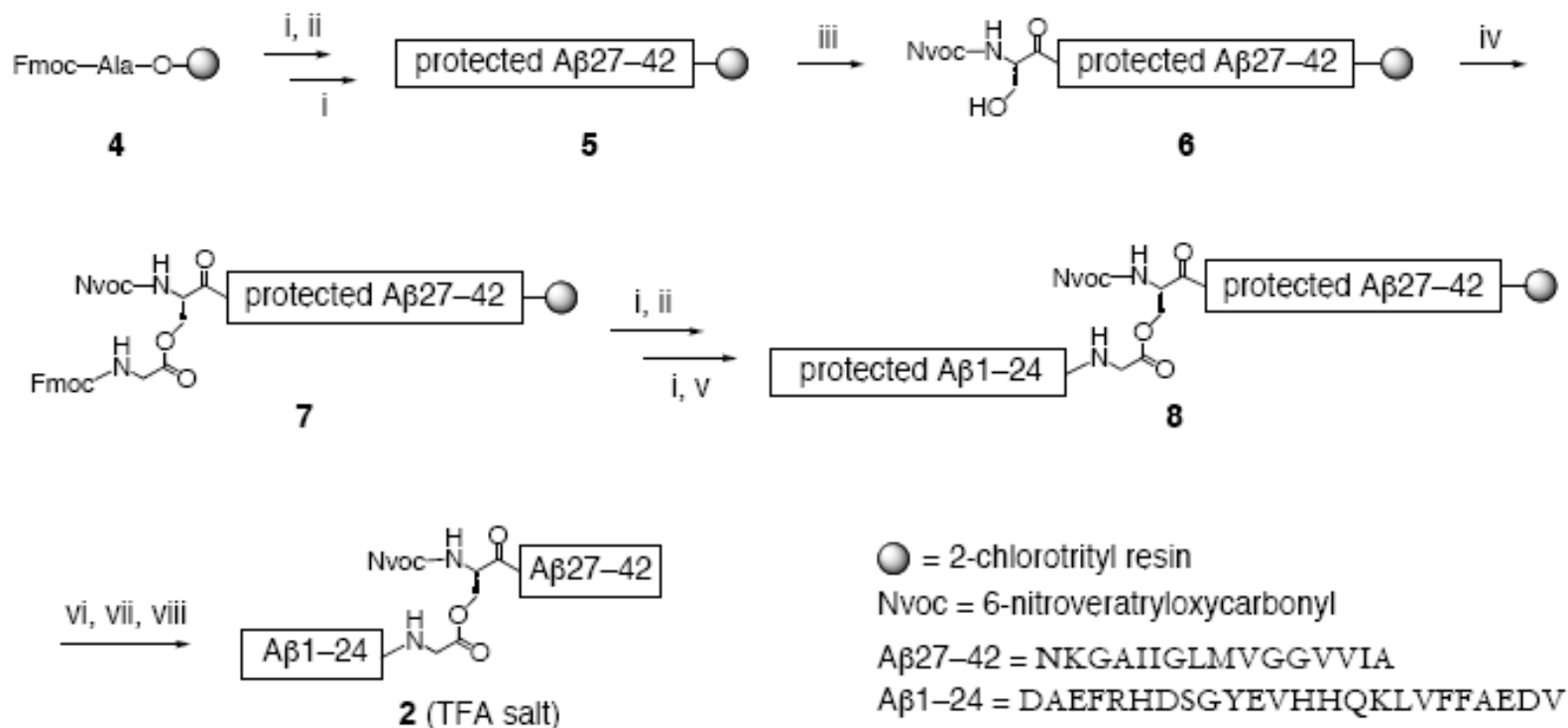
Application au peptide A β 1-42



Scheme 6. Phototriggered click peptide (26-N-Nvoc-26-AIA β 42, 11): the production of A β 1-42 (9) by phototriggered click, followed by the O-N intramolecular acyl migration reaction of 26-AIA β 42 (10).

O-N Acyl isopeptide' Methode (« click peptides »)

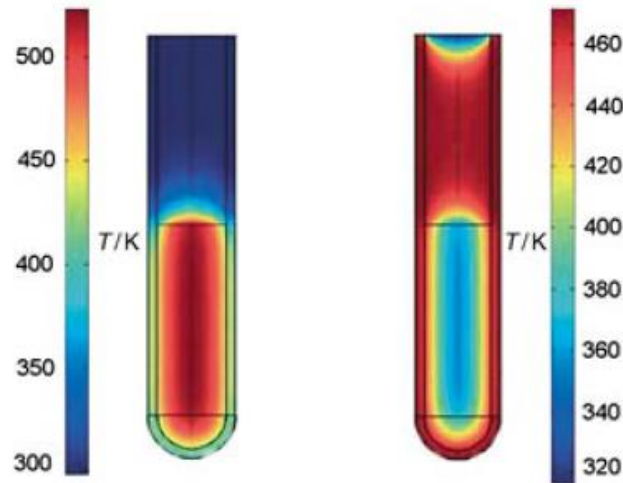
Synthèse du peptide [Nvoc-Ser]²⁶ Aβ1-42



Scheme S1. *Reagents/conditions:* (i) 20% piperidine/DMF, 20 min; (ii) Fmoc-AA-OH (2.5 eq), DIPCDI (2.5 eq), HOBT (2.5 eq), DMF, 2 h; (iii) Nvoc-Ser-OH (2.5 eq), DIPCDI (2.5 eq), HOBT (2.5 eq), DMF, 2 h; (iv) Fmoc-Gly-OH (15 eq), DIPCDI (15 eq), DMAP (0.3 eq), CH₂Cl₂, 4 h \times 2; (v) Boc-Asp(OtBu)-OH (2.5 eq), DIPCDI (2.5 eq), HOBT (2.5 eq), DMF, 2 h; (vi) TFA-*m*-cresol-thioanisole-H₂O (92.5:2.5:2.5:2.5), 90 min; (vii) NH₄I (20 eq), dimethylsulfide (20 eq), TFA:H₂O (2:1), 60 min, 0 °C; (viii) preparative HPLC (the linear gradient of CH₃CN in 0.1% aqueous TFA).

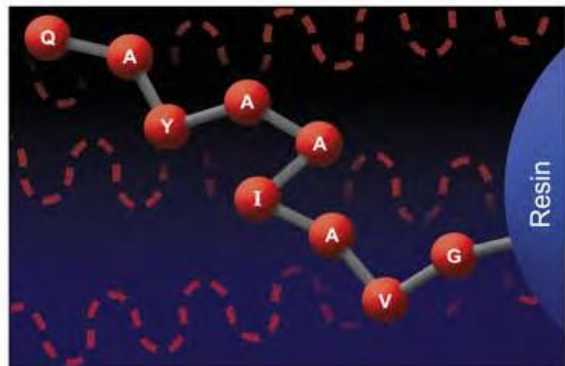
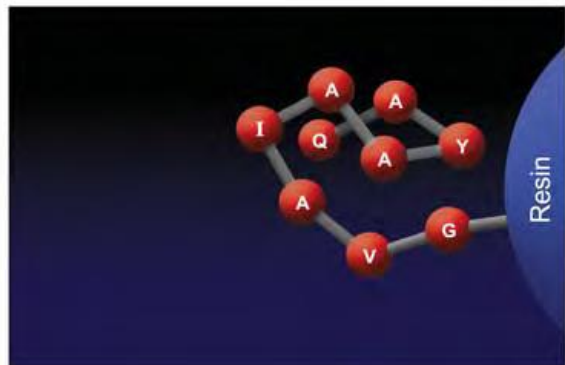
Utilisation des Microondes en SPPS

La température (chauffe conventionnel inclus) accélère les couplages et les déprotections. Les agents de couplage sont généralement stables jusqu'à 110°C. Les polymères réticulés sont stables à 110°C dans les solvants usuels de SPPS. Très utile pour couplage sur aminoacides encombrés et les séquences difficiles. Appliqué à la synthèse d'un peptide de 109 en stratégie pas à pas^[Singer 2010].



Encore en débat mais, **pour la SPPS, l'effet microonde semble exclusivement thermique.** Les différences observées entre chauffage conventionnel et microonde viennent essentiellement des gradients de températures, des phénomènes de surchauffe de catalyseurs ou solvants à haut facteur $\tan\delta$ et apparition de points chauds.

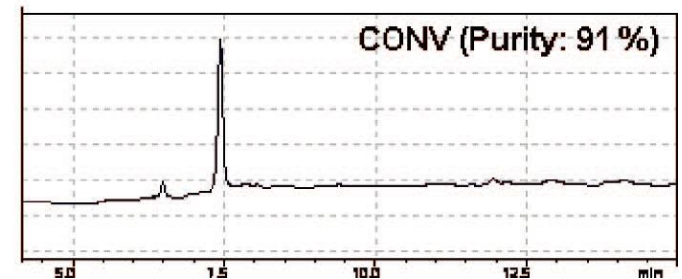
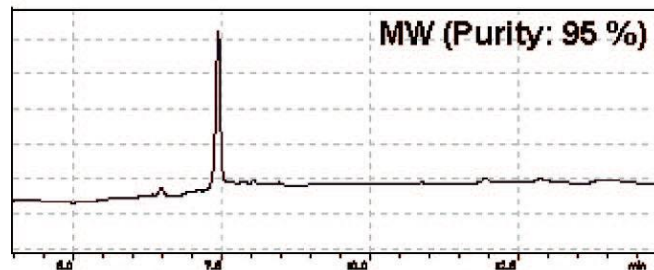
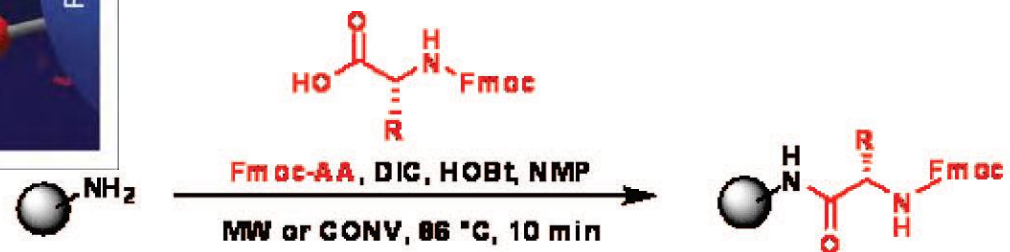
Le chauffage 'direct' de la chaîne peptidique par les microondes joue un rôle?



D'après CEM:

http://www.cem.de/documents/produkte/peptid/Complete_Peptide_Brochure_e.pdf

Débattu mais l'expérience prouve que non



Effet microondes sur le solvant

La capacité des solvants (et réactifs) à absorber les microondes à une fréquence donnée (2.45 Hz) est déterminée par le facteur de perte $\tan\delta = \epsilon''/\epsilon'$ avec ϵ'' perte diélectrique, efficacité avec laquelle la radiation électromagnétique est convertie en chaleur et ϵ' , constante diélectrique, décrivant l'habilité des molécules à se polariser dans le champ électrique.

Tan δ >0.5 : forte absorption des ondes

Tan δ <0.1 faible

Table 1: Loss factors ($\tan\delta$) of different solvents.^[a]

Solvent	$\tan\delta$	Solvent	$\tan\delta$
ethylene glycol	1.350	DMF	0.161
ethanol	0.941	1,2-dichloroethane	0.127
DMSO	0.825	water	0.123
2-propanol	0.799	chlorobenzene	0.101
formic acid	0.722	chloroform	0.091
methanol	0.659	acetonitrile	0.062
nitrobenzene	0.589	ethyl acetate	0.059
1-butanol	0.571	acetone	0.054
2-butanol	0.447	tetrahydrofuran	0.047
1,2-dichlorobenzene	0.280	dichloromethane	0.042
NMP	0.275	toluene	0.040
acetic acid	0.174	hexane	0.020

[a] Data from ref. [15]; 2.45 GHz, 20 °C.

A noter: la capacité d'être chauffés de l'éthylène glycol et toluène à rapprocher de PEG et PS

D'après C. O. Kappe, *Angew Chem Int Ed Engl* 2004, 43, 6250.

Instruments Microondes pour la SPPS

Multimode

Idem microonde de cuisine.

Irradiation inhomogène dans la cavité:

Agitateur requis pour minimiser cet effet

Utilisé pour préparer des librairies

Monomode (single mode)

Guide d'onde qui dirige les microondes dans le réacteur de façon homogène placé à une distance fixe.

Très reproductible

Non adapté à la synthèse parallèle

Synthèse séquentielle.



Réacteur 10-125 ml

Syro wave avec reacteur biotage, agitation vortex
(reacteur 2-10ml)



L. Malik, A. P. Tofteng, S. L. Pedersen, K. K. Sorensen, K. J. Jensen, *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 506.

Danger des Microondes

-formation d'aspartimide et cyclisations intramoléculaires (DKP...)

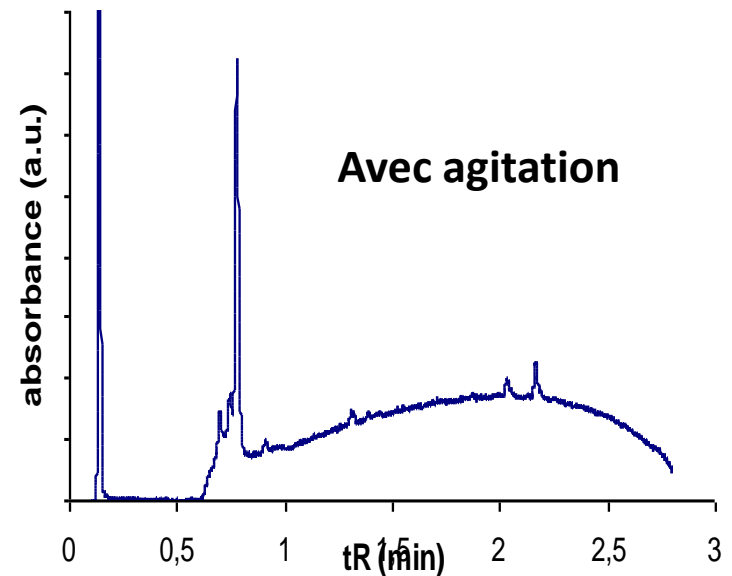
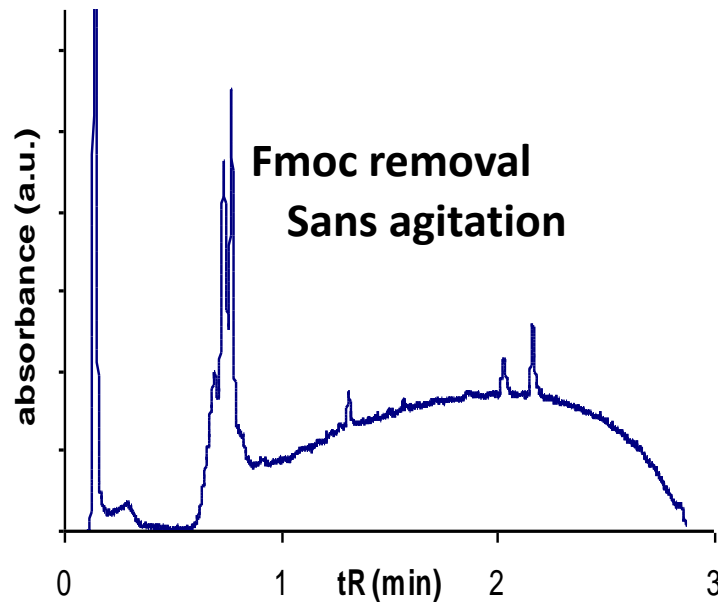
Solution : cocktail de deprotection moins basique: **HOBt** 0.1 M DMF/**piperazine**

-Risque d'Épimérisation: Cys, His Solution:

Solution : baisser la puissance et augmenter le temps

-Mauvaise stabilité de résine trityl (50% degreffage en 2 h à 75°C)

-Attention à la diffusion résine chargées >0.8 mmol/g

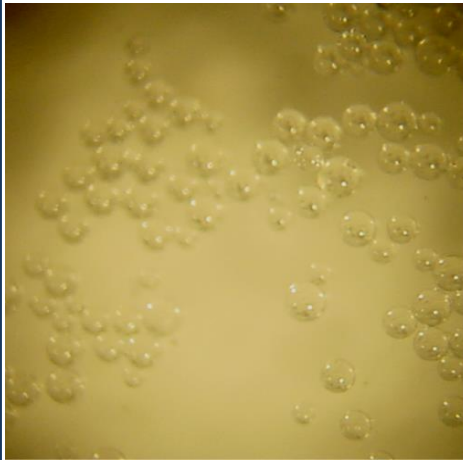


Ex : Ac-Gly-Cys-Asp-Pro-Asp-Arg-His-Cys-Ala-NH₂

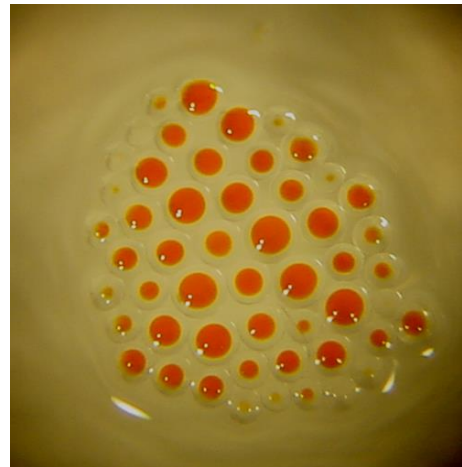
Fmoc Rink Amide AMPS (charge 0.94mmol/g) **4eq**, **0.2M DIC/HOBt**

Utilisation des Microondes

TNBS neg



TNBS pos mais non homogène



TNBS pos



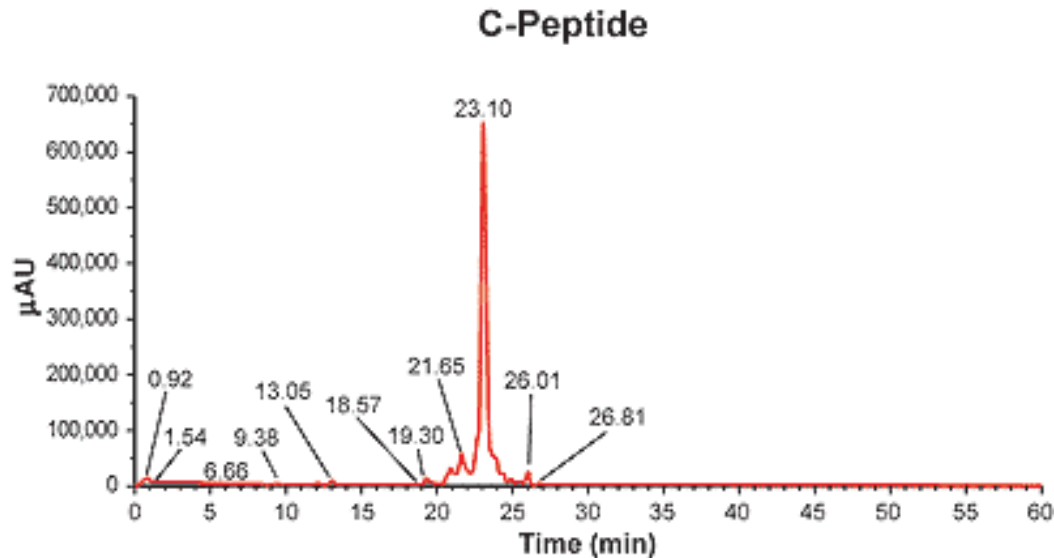
Temps de couplage court, peu d'agitation: les réactifs n'ont pas le temps d'atteindre le fond du réacteur et le couplage s'arrête!



Il faut AGITER

Intérêt majeur: la vitesse

H-EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLG-OH en moins de 4 heures



Scale = 0.25 mmol

Resin = F-moc-Gly-Wang, 0.6 meq/g (Novabiochem)

Deprotection

20% Piperidine / DMF

3 min.

Coupling

PyBOP/DIEA 0.9/2, x6 excess

4 min.

Cleavage

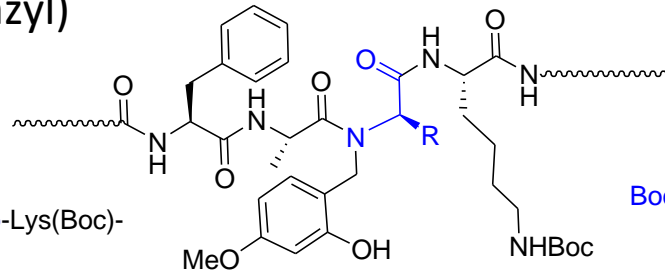
TFA/TIS/H₂O/EDT 94/1/2.5/2.5

18 min

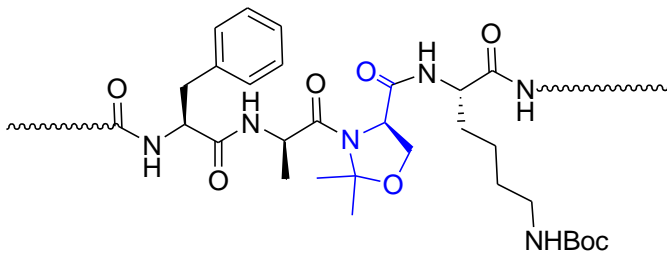
Améliorations et evolutions

Groupement Hmb
(hydroxy methyl benzyl)

-Phe-Ala-(hmb)Aaa-Lys(Boc)-

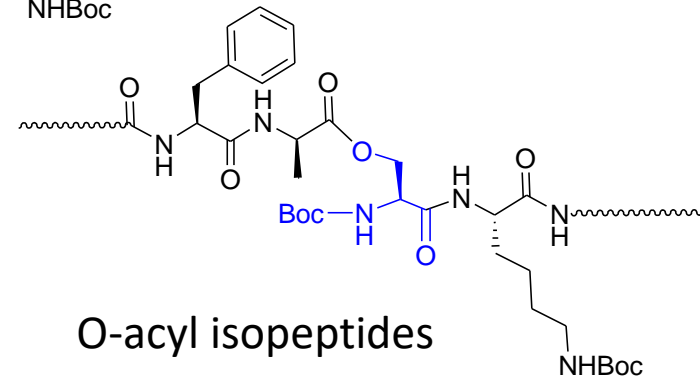


-Phe-Ala-Ser ψ (Me,Me)Pro-Lys(Boc)-



Diméthylthiazolidines
et diméthylloxazolidines : Pseudo prolines

BocSer(....-Phe-Ala-)Lys(Boc)-



O-acyl isopeptides

Améliorations et évolutions

Changement de paradigme important pour les longs peptides:

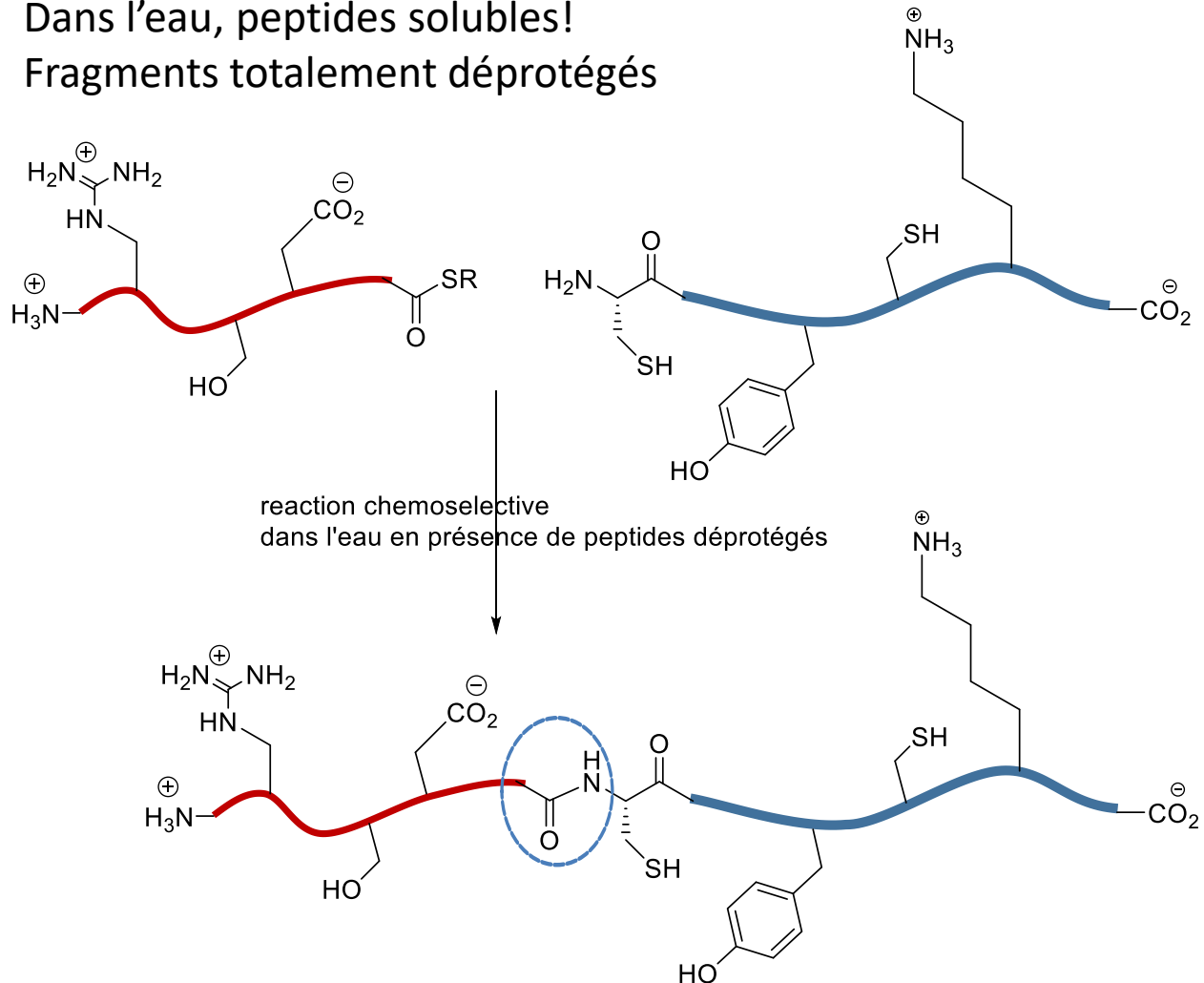
La révolution de la ligation native (Enormément de recherche, pas encore en production, les fabricants ne sont pas encore à l'aise avec)

Ligation native

Reaction chemosélective

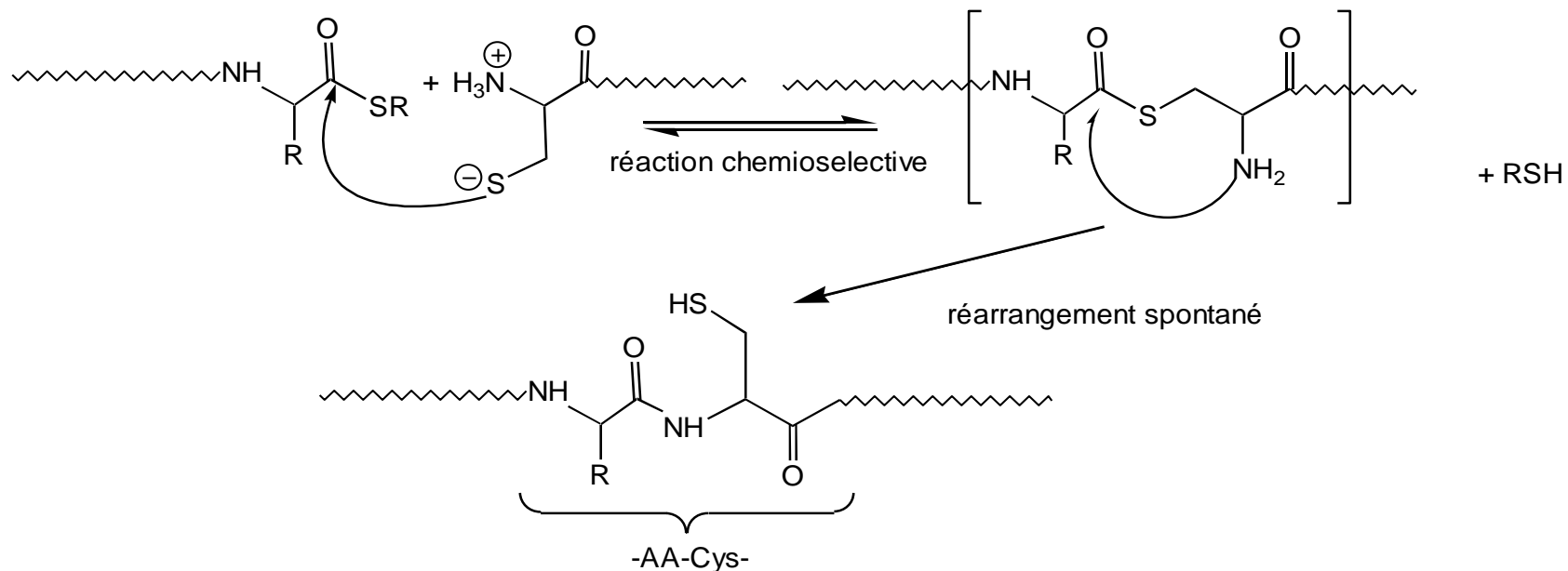
Dans l'eau, peptides solubles!

Fragments totalement déprotégés



Ligation native: si une **liaison amide** est créée

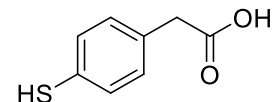
Ligation chimique native: NCL



Fragments peptidiques de 30 AA environ (taille standard pour la Fmoc SPPS)

SR peut être assez mauvais partant (exemple alkylthioester)

Il est très souvent échangé par ajout de thiophénol ou MPAA (mercaptophényl propionique acid) par exemple pour le rendre plus réactif et meilleur partant



Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I., and Kent, S. B. (1994) Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* 266, 776-779.

Ligation native

Les limitations et enjeux

1) Obligation d'une Cystéine N terminale

- > Possibilité de desulfuration (Ala),
- > Aminoacides non naturels (cher et complexes)
- > Auxiliaires

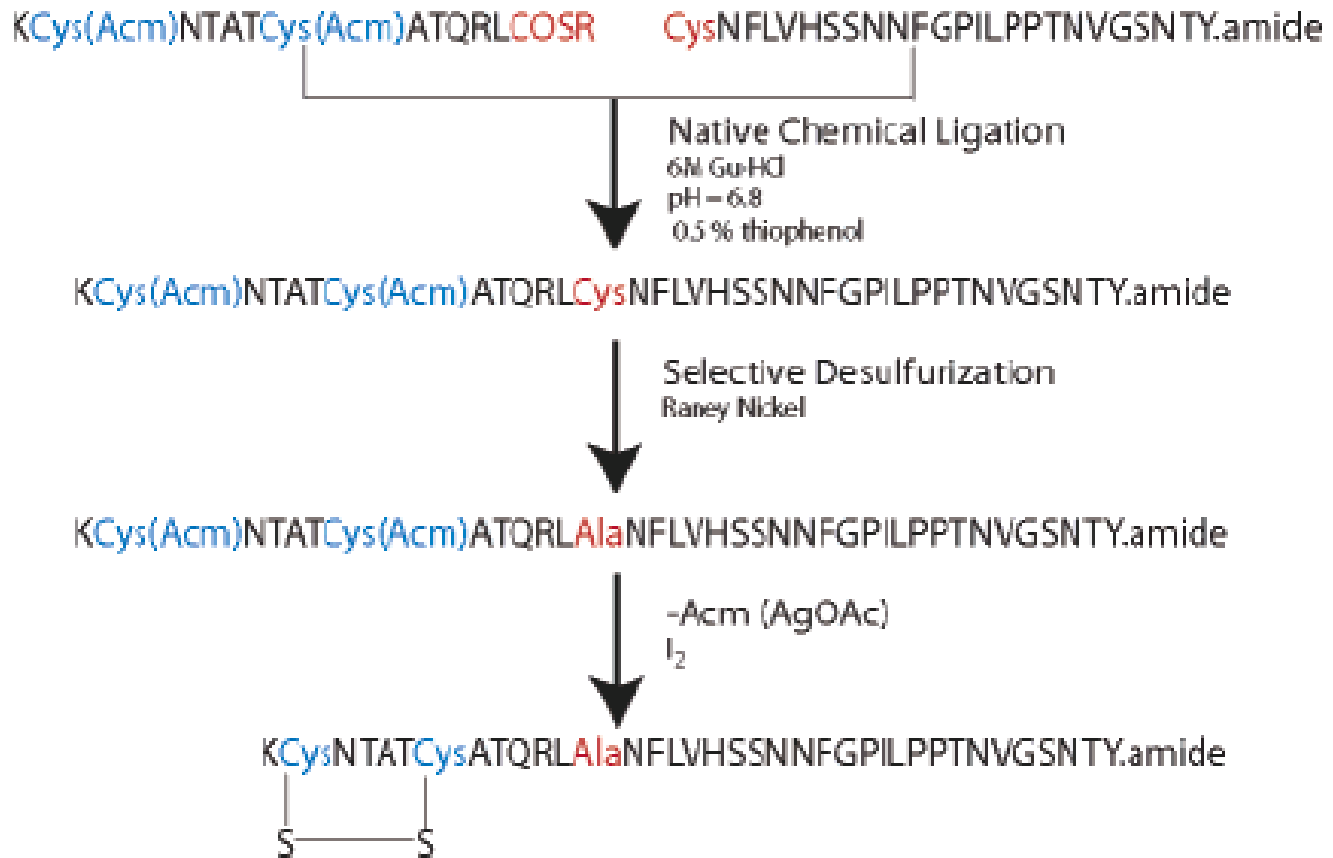
2) Synthèse du thioester C ter

- > Utilisation de crypto thioesters (ex. SEA off/on)

3) Multi étapes: ligations séquentielles C vers N, évite d'avoir une Cys protégée, Autopurification, fragments tonqués ne se lient pas

Ligation native

Il est toutefois possible de désulfurer la cystéine en alanine[1,2]



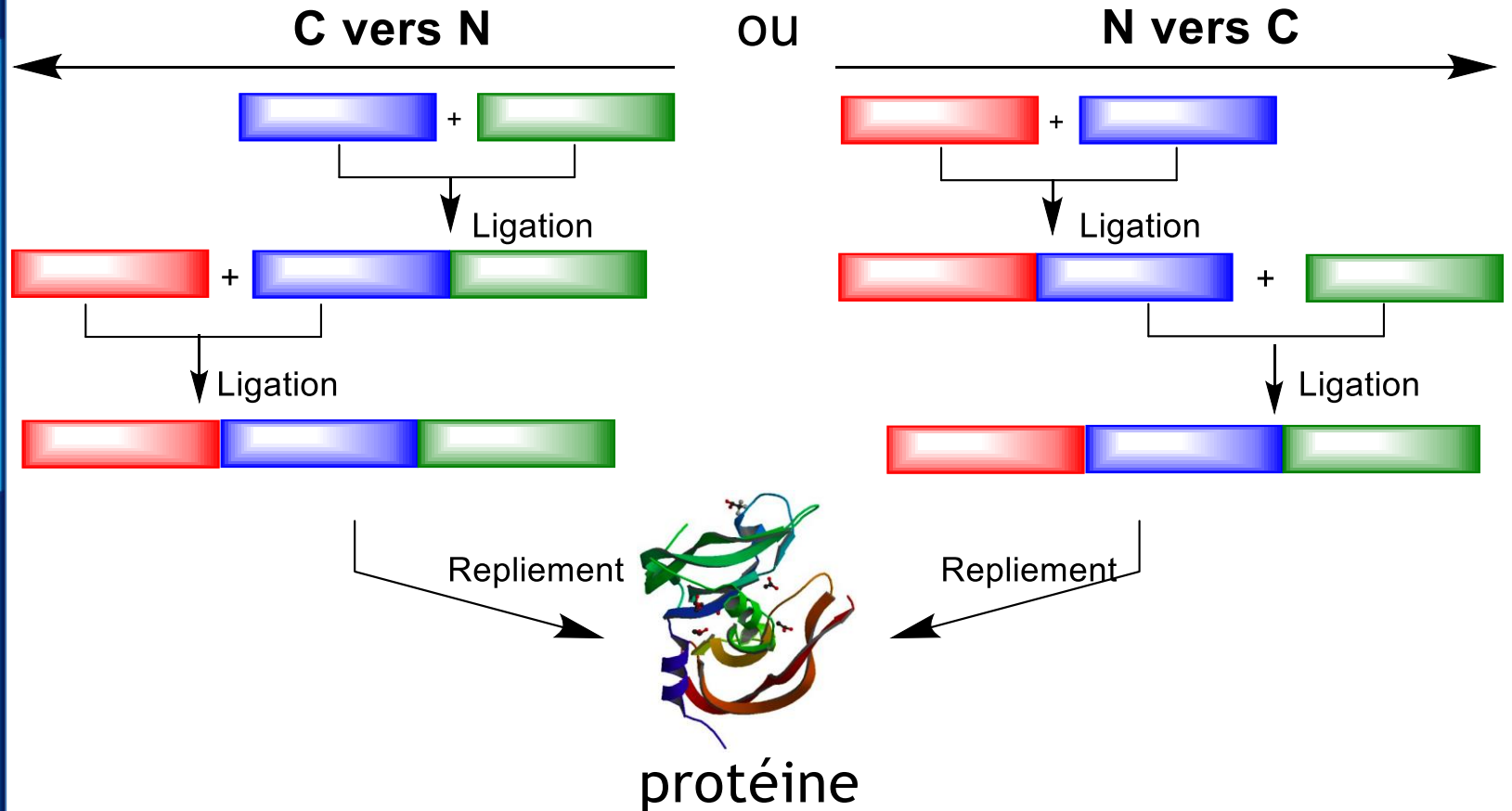
^a COSR = alkylthioester.

[1] L. Z. Yan and P. E. Dawson, *Journal of the American Chemical Society* **123** (4), 526 (2001).

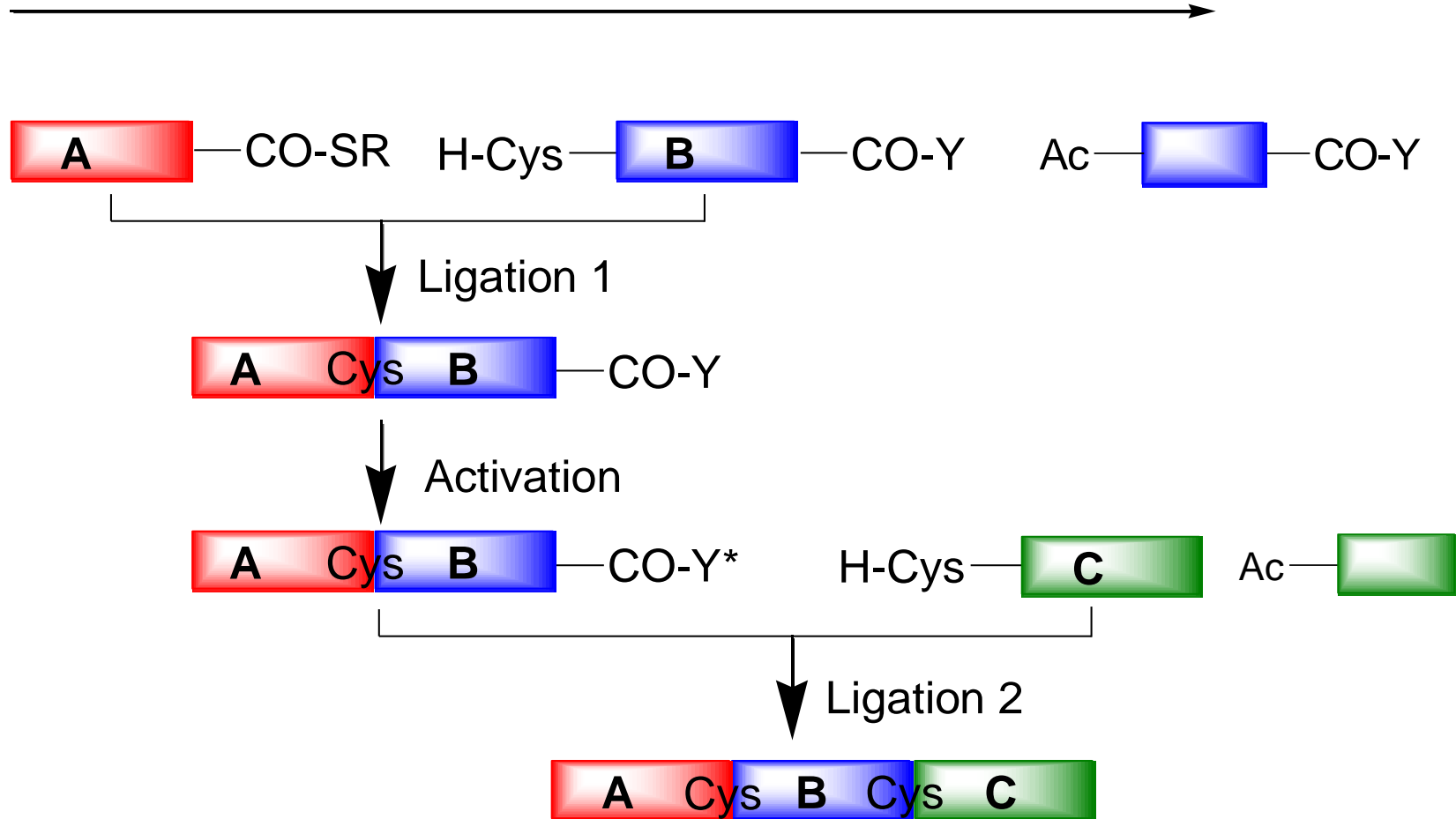
[2] B. L. Pentelute and S. B. H. Kent, *Organic Letters* **9** (4), 687 (2007)

Ligation chimique native

Sens de la ligation



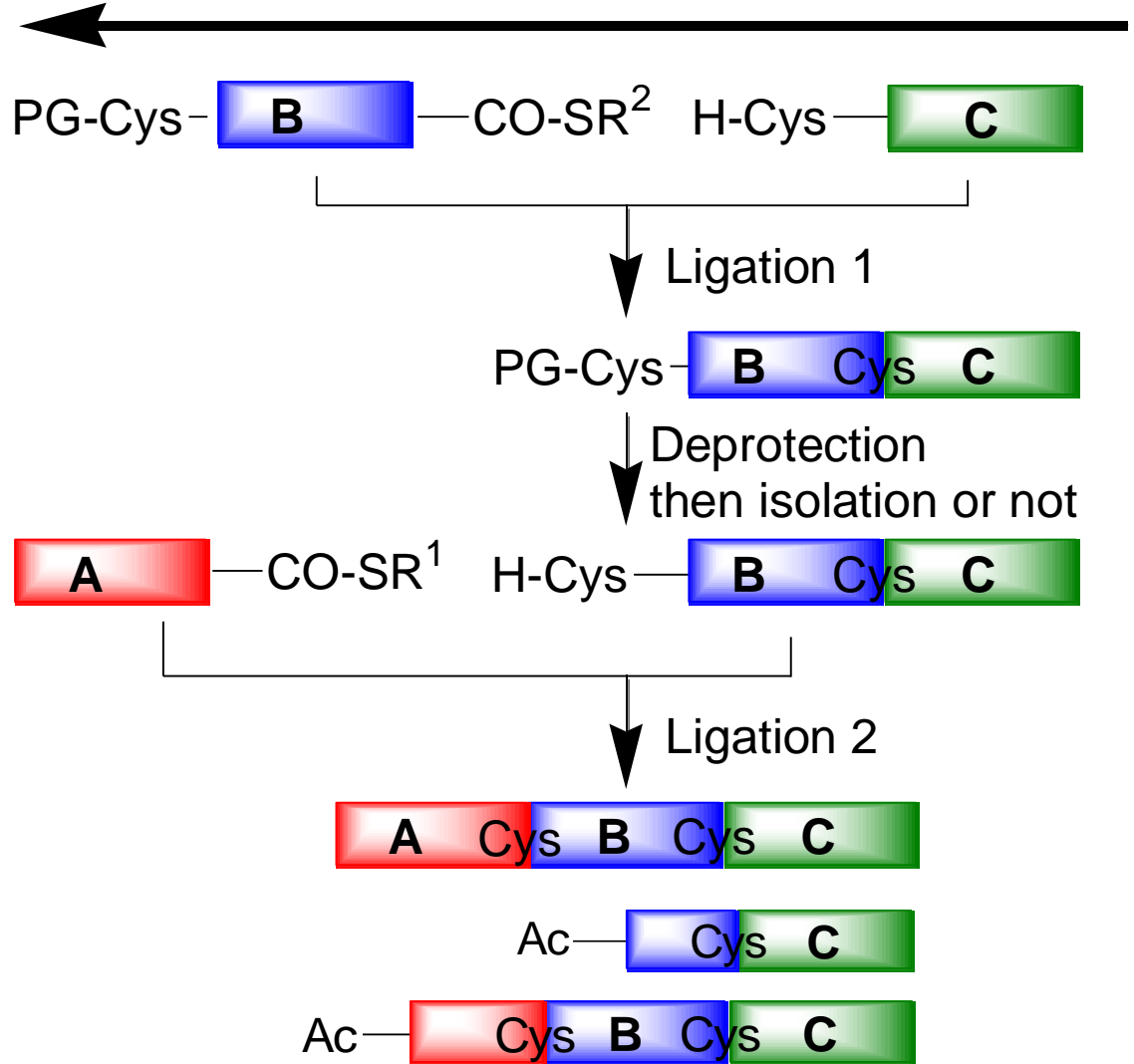
N-to-C assembly



Adapté de Raibaut, L.; Ollivier, N.; Melnyk, O. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 7001-7015



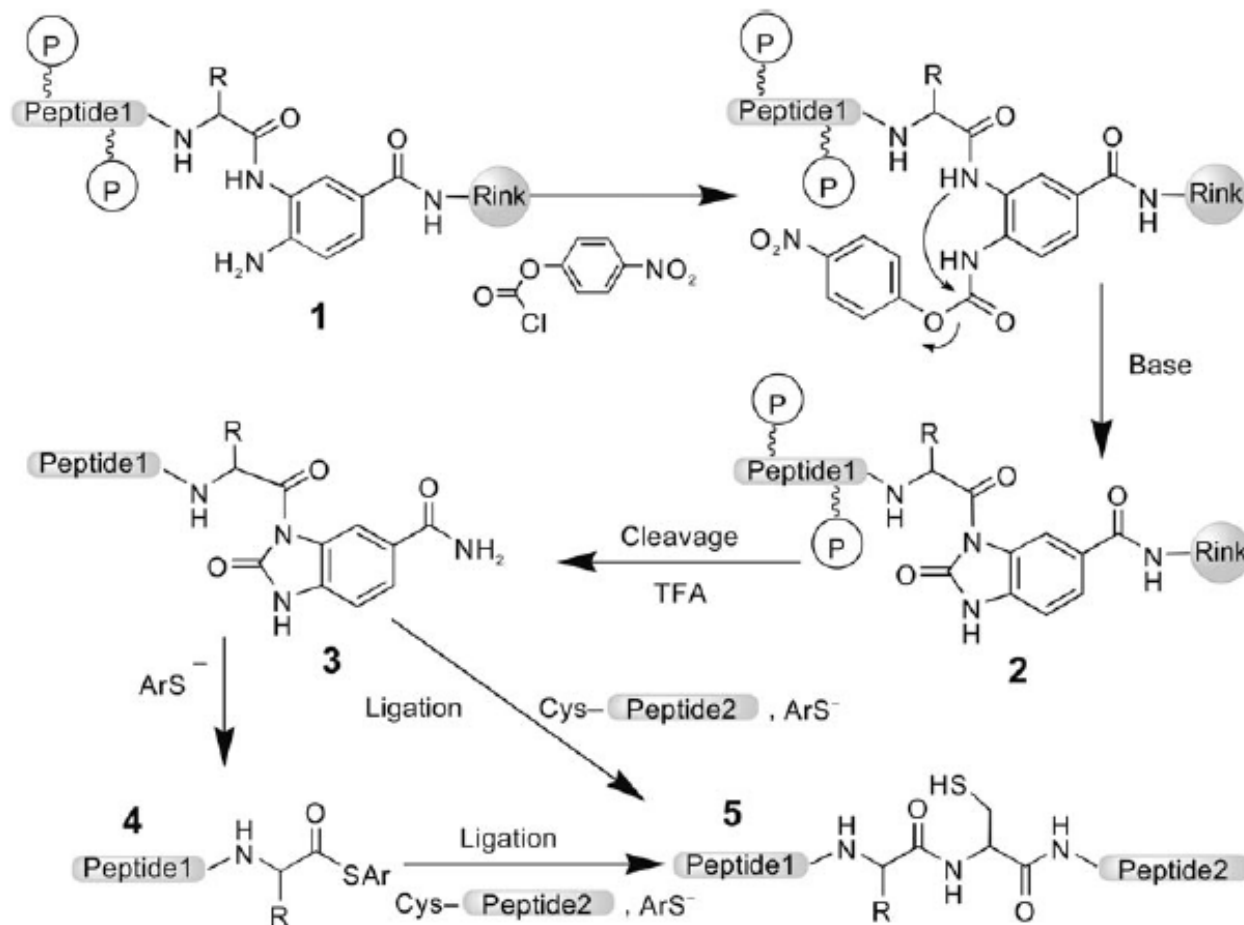
C-to-N assembly



PG = protecting
group

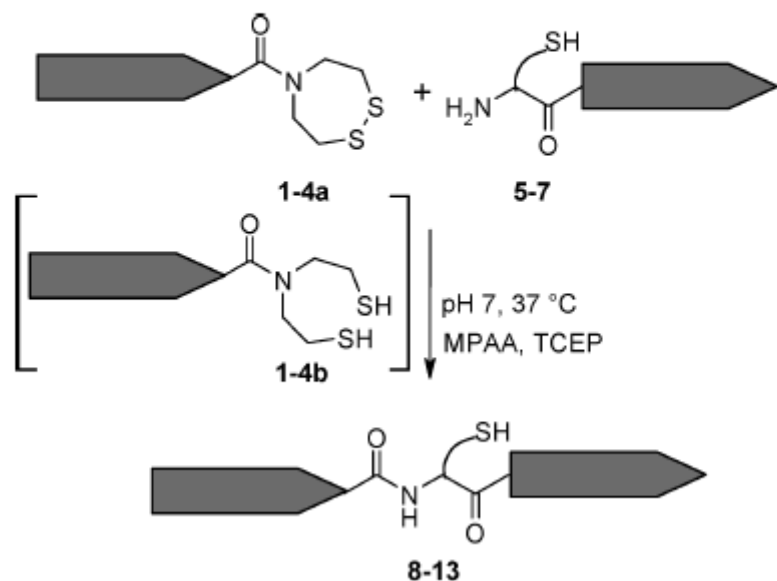
For N-terminal Cys

Formation de N-acylurées (benzimidazolidinone)

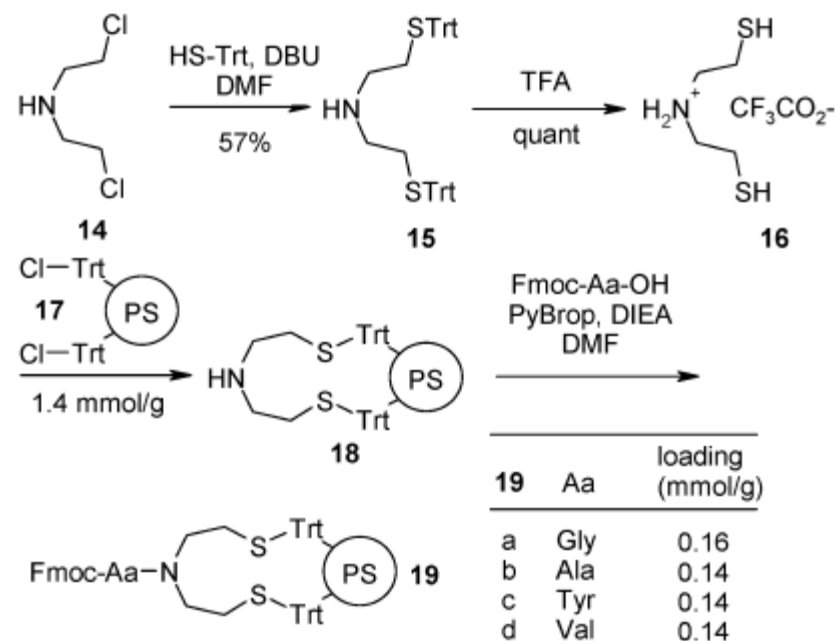


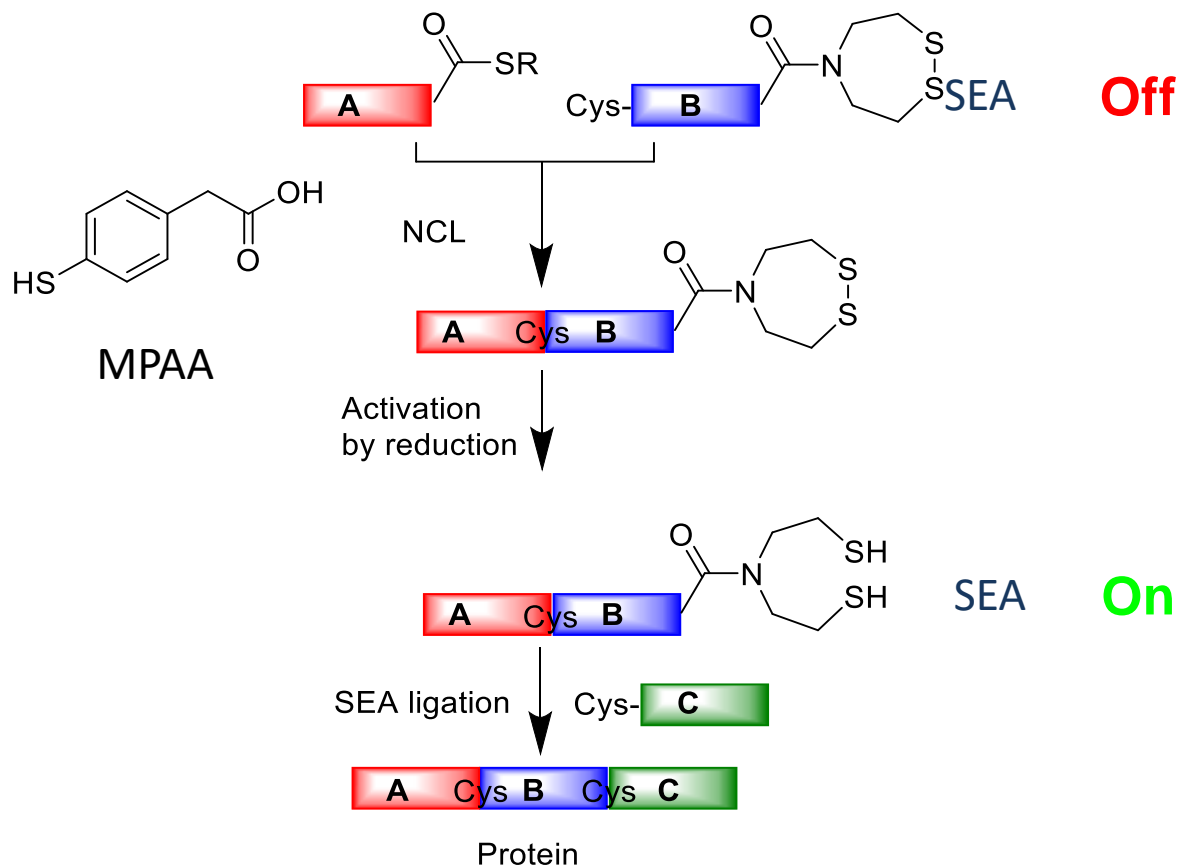
Scheme 1. Synthetic strategy for Fmoc-SPPS of thioester peptides. Following SPPS, aminoanilide **1** undergoes specific acylation and cyclization to yield the resin-bound acylurea peptide **2**. Following cleavage and deprotection, peptide-Nbz **3** can undergo thiolysis to yield peptide thioester **4**, or direct ligation to yield the native peptide **5**.

Scheme 1. SEA Ligation between a Bis(2-sulfanylethyl)amino Peptide 1–4b and a Cysteinyll or Homocysteinyl Peptide Leading to the Chemoselective and Regioselective Formation of a Native Peptide Bond^a



Scheme 2. Synthesis of Solid Support 19





Ollivier, N. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 209.

Raubaut, L. et al. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 7001.

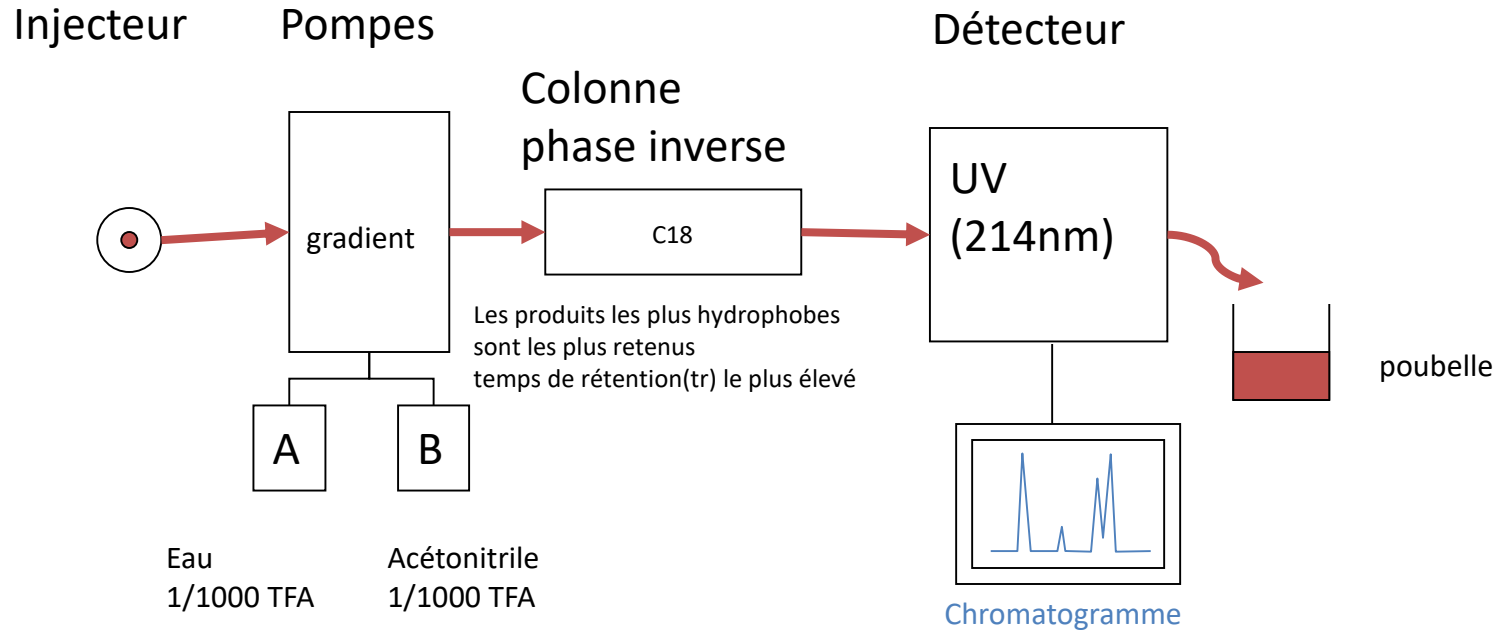
VI- Techniques de base d'analyse des peptides

Analyses

Pour caractériser les peptides:

- HPLC: high performance liquid chromatography
- Spectrométrie de Masse Electrospray (Mode +): ES+
- Couplage LC/MS: Liquid chromatography/mass spectrometry

HPLC





Méthodes typiques:

A: eau 1/1000 TFA

B: acétonitrile 1/1000 TFA

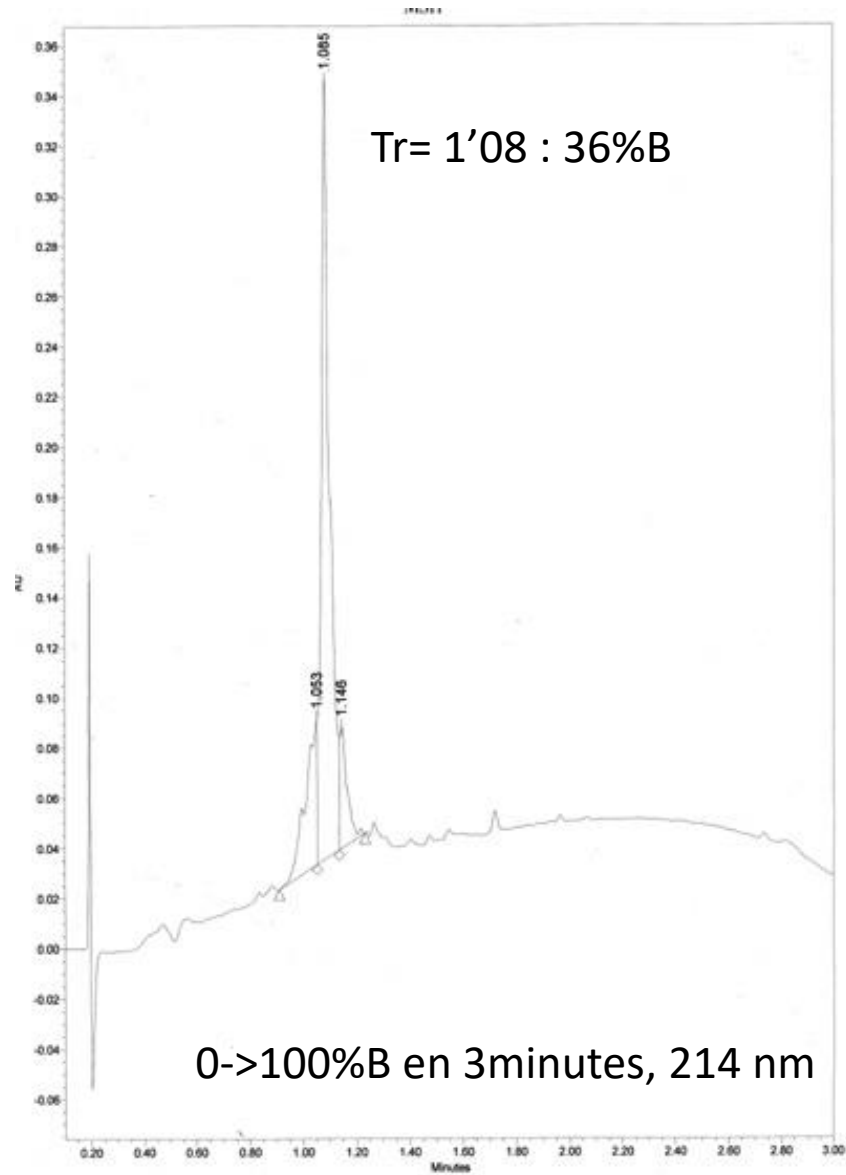
100%A->100%B en 3 minutes 5ml/min Merck chromolith 4.6x50 mm

100%A->100%B en 3 minutes 0.6 ml/min symetry 2.1x30 mm

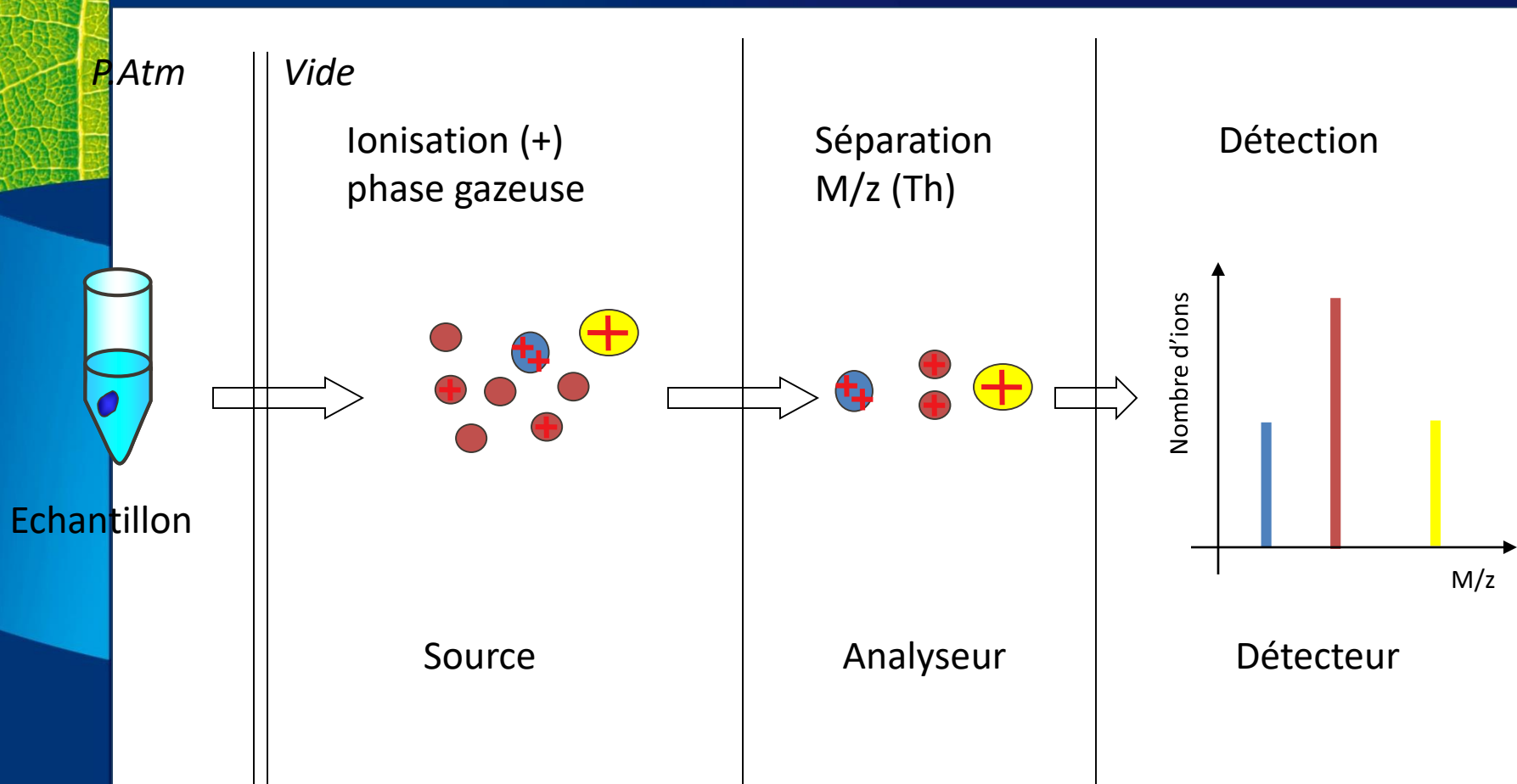
100%A->100%B en 15 minutes 1ml/min symetry Waters 4.6x50 mm

100%A->100%B en 50 minutes 1ml/min deltapack Waters 4.6x200 mm





Principe de la Spectrométrie de Masse

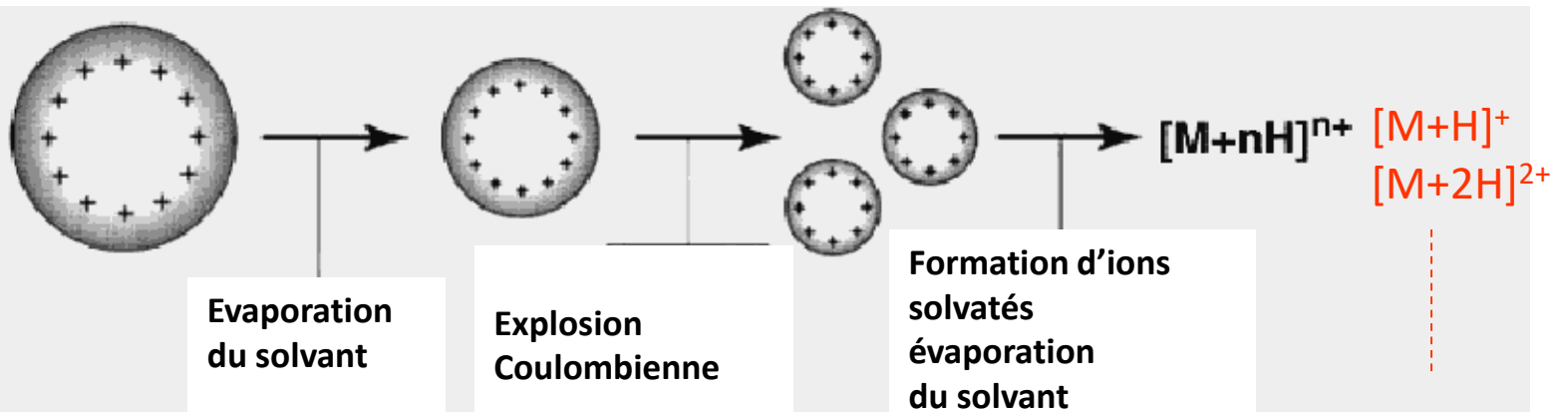
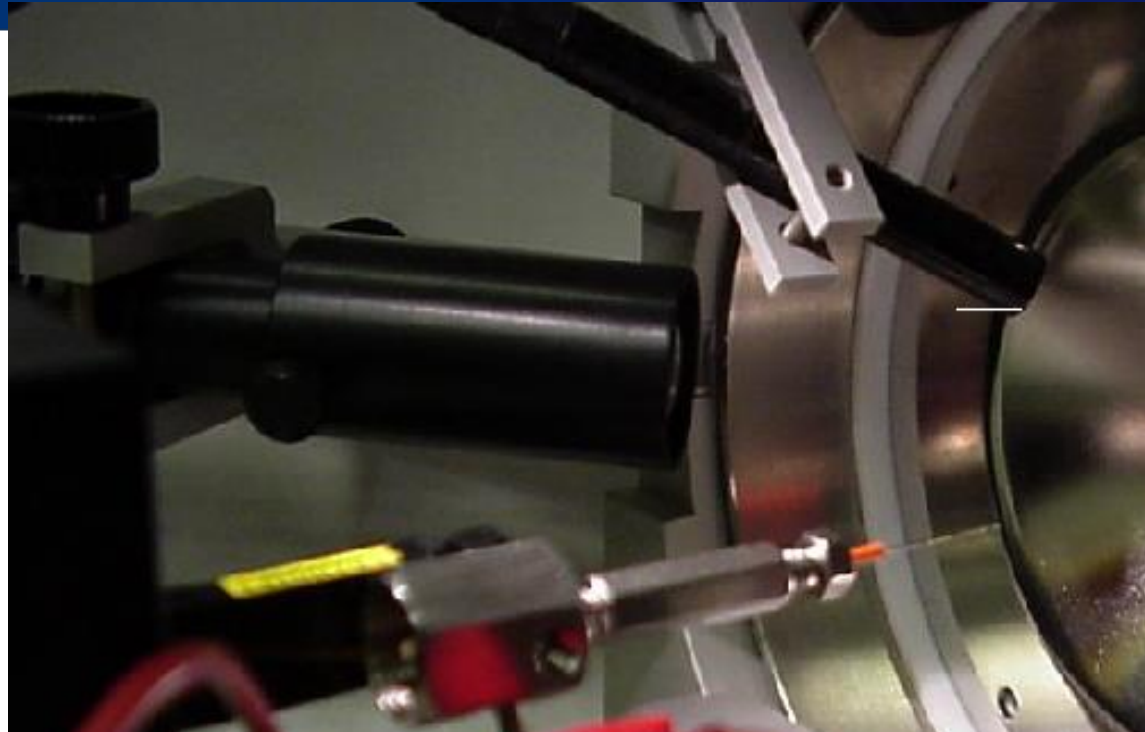


- MALDI^a
- ESI^b

- **Quadripole**
- ToF (time of flight)
- Ion Trap
- Tandems (Q-ToF, ToF-tof...)

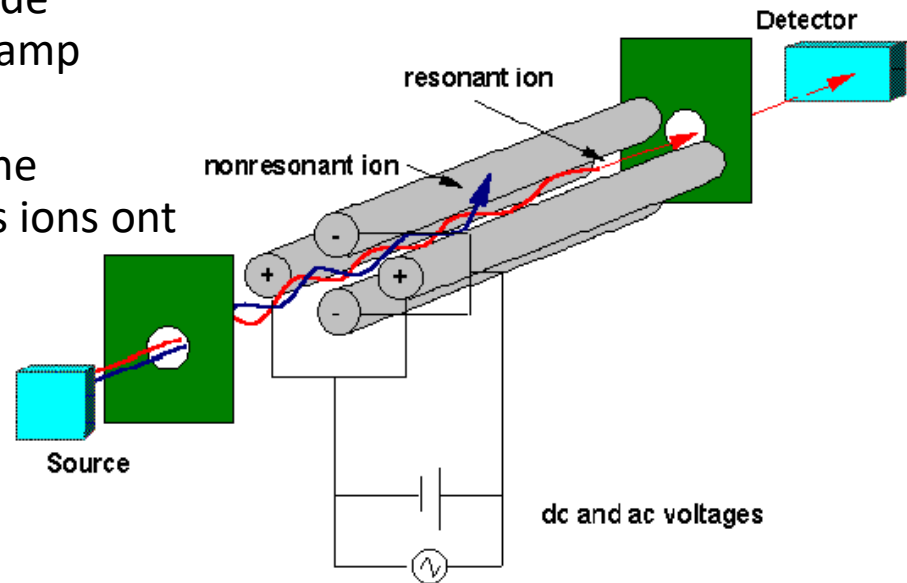
• *a Matrix assisted laser desorption ionisation*
• *b Electrospray ionisation*

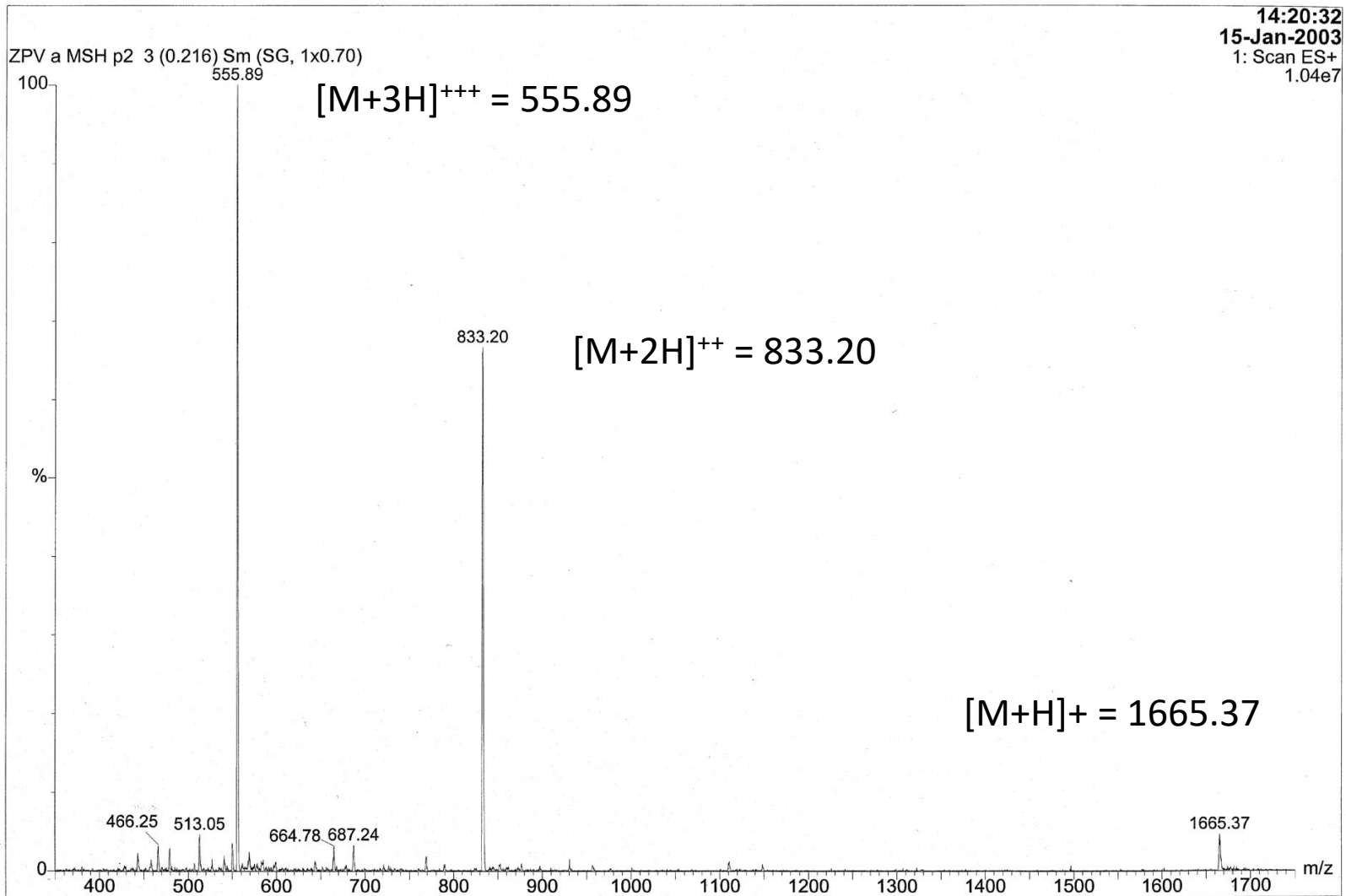
Source ESI

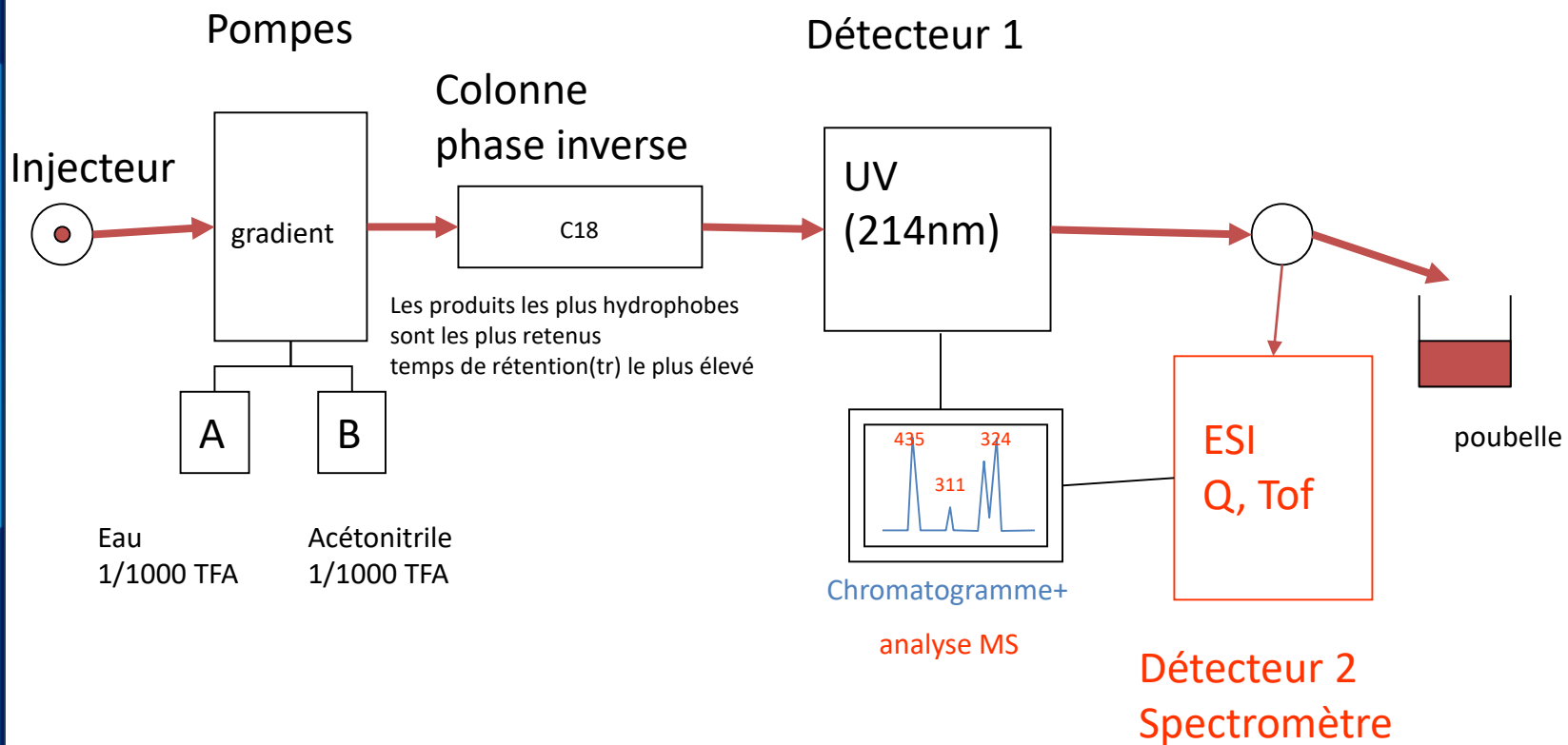


Analyseur Quadrupolaire

- **séparation M/z** sur des critères de stabilité de trajectoire dans le champ quadripolaire.
- Pour un **M/z fixé**, les ions ont une trajectoire **stable**, tous les autres ions ont une trajectoire instable.
- Flux d'ions continu
- 1 Scan = 1 M/z
(vitesse de balayage importante)

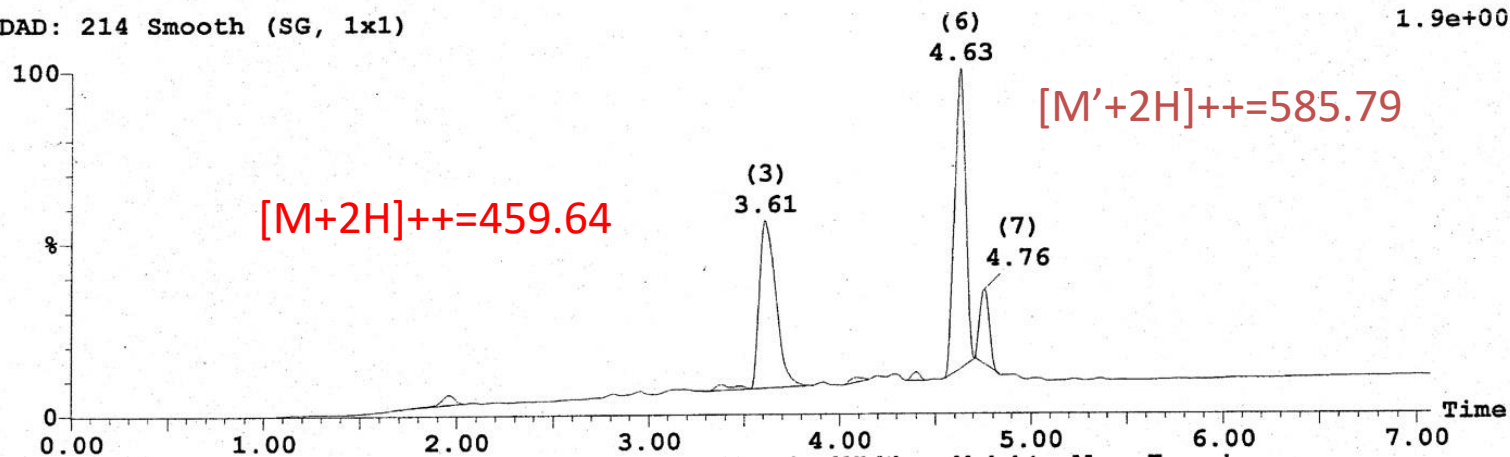






DAD: 214 Smooth (SG, 1x1)

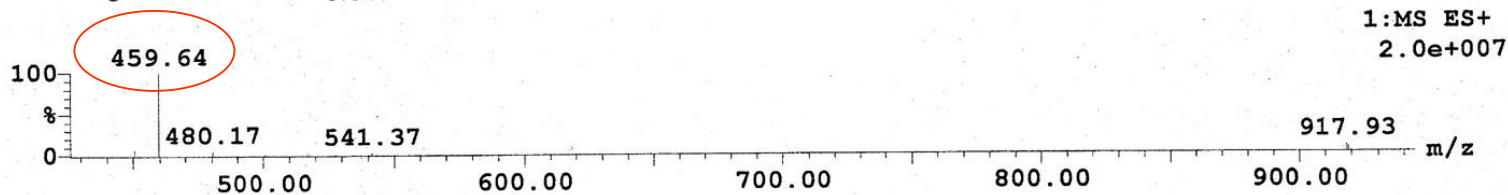
1.9e+006



$[M+2H]^{++}=459.64$

$[M'+2H]^{++}=585.79$

Peak ID	Compound	Time	Mass Found
3		3.61	



1:MS ES+
2.0e+007

Différence=126.2 -> 252 sur l'ion monochargé

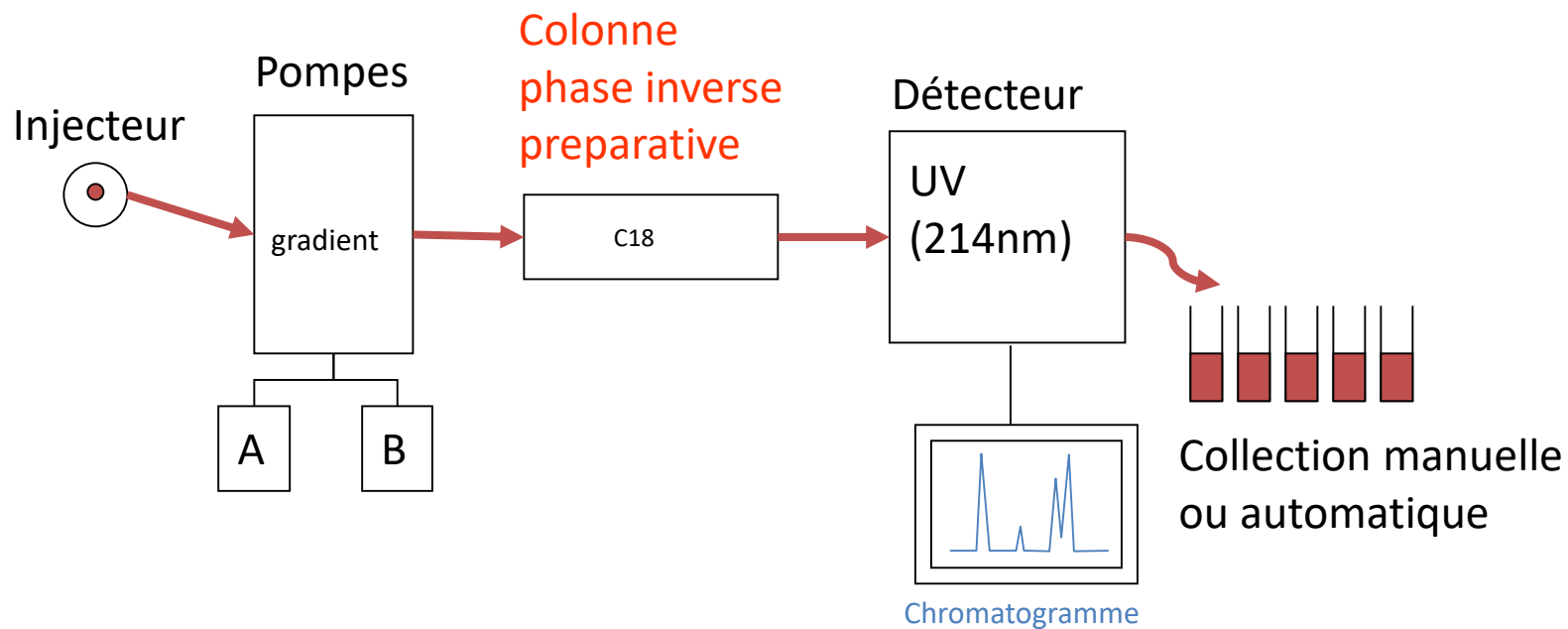
Peak ID	Compound	Time	Mass Found
6		4.63	



1:MS ES+
5.9e+006

Déprotection insuffisante de l'Arg(pbf)

Peak ID	Compound	Time	Mass Found
7		4.75	



Règles de base de la HPLC prep

- solution à injecter limpide
- pH compris entre 2 et 8
- solution miscible avec la phase mobile
- il est possible de dissoudre un produit dans un minimum de DMSO ou DMF (surtout ne pas diluer ensuite avec de l'eau ou de l'acétonitrile) et d'injecter directement cette solution
- pente de gradient de 1% par minute (ou moins) dans la zone du produit



conditions HPLC Prep

A : H₂O (0.1% TFA); B : CH₃CN (0.1% TFA)

colonne analytique : chromolith 4.6x50 mm débit 3mL, gradient linéaire en 5 min de 100%A vers 100%B, injection 5 à 10 µg de produit, pression dans la pompe inférieure à 2 Kpsi

colonne prep : Waters deltaPak, compression radiale, 15 micromètres 40x100 mm, débit 50 ml, gradient non linéaire de 100%A vers x%B, injection de produit 2 à 150 mg en routine (mais peut être 1-5 g selon la pureté)

colonne industrielle : Novasep, compression axiale, 15 micromètres (ou 10 micromètres) 50x250 mm, débit 120 ml, gradient non linéaire de 100%A vers x%B

l'analyse donne une bonne idée du contenu du brut et du temps de rétention du produit

exemple 1 : si le produit sort à 1 minute 30 secondes, cela correspond à 30% ACN (on ne tient pas compte du volume mort)

donc en préparative le produit sortira à environ 15% d'ACN de moins, soit 15%ACN.

on fera un gradient 0%---2 min---5%---20min---25%

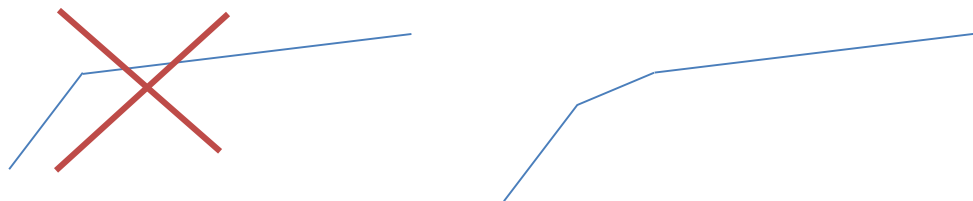
la pente de gradient doit être de 1% (ou moins) par minute dans la zone où le produit sort


exemple 2 : le produit sort en analytique à 3 minutes 30 secondes, cela correspond à 70% ACN (on ne tient pas compte du volume mort)

donc en préparative le produit sortira à environ 15% d'ACN de moins, soit 55%ACN.

on fera un gradient 0%---5 min---35%---5min---45%---20 min---65%


il est préférable de faire des pentes de gradients rapide, moins rapide puis 1% par minute que rapide puis 1% par minute





HPLC analysis. For analyzing intermediates, aliquots of 5 mg were cleaved by TFA according to the protocol described above. Samples were prepared in an acetonitrile/water (50/50 v/v) mixture containing 0.1% TFA. Samples not soluble in this mixture were prepared in DMSO. The HPLC system consisted of a Waters Alliance 2690 HPLC. All the analyses were carried out using a RP C18 monolithic Onyx Phenomenex 25 x 4.6 mm column. A flow rate of 3 mL/min and a gradient of (0–100)% B over 3 min were used. Eluent A: water/0.1% formic acid; eluent B: acetonitrile/0.1% formic acid. The detection was performed at 214 nm.

Compound purification. The crude oligomers **10a-c**, **11a-c** and **12a-c** were purified by preparative HPLC (Waters 4000 apparatus) carried out on a C18 reversed-phase column (C18 Deltapak column, 100 mm x 40 mm, 15 μ m, 100Å) at a flow rate of 50 mL/min of a H₂O + 0.1% TFA and CH₃CN + 0.1% TFA mixture in gradient mode with UV detection at 214 nm. The fractions containing the chromatographically pure product were collected and lyophilized.

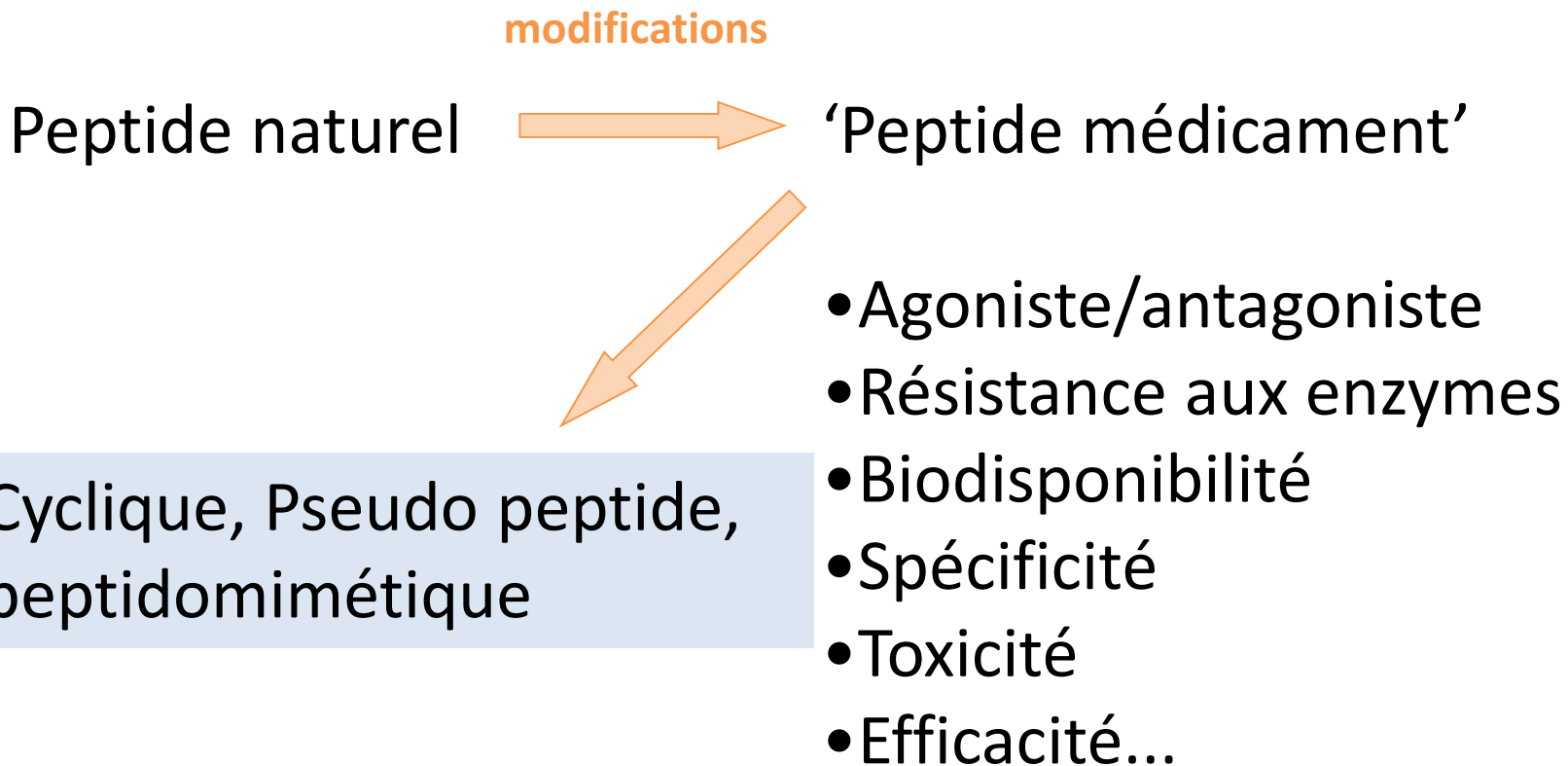


Compound purification. The crude oligomers **10a-c**, **11a-c** and **12a-c** were purified by preparative HPLC (Waters 4000 apparatus) carried out on a C18 reversed-phase column (C18 Deltapak column, 100 mm x 40 mm, 15 μm , 100Å) at a flow rate of 50 mL/min of a H_2O + 0.1% TFA and CH_3CN + 0.1% TFA mixture in gradient mode with UV detection at 214 nm. The fractions containing the chromatographically pure product were collected and lyophilized.

VII- Modifications des peptides

Peptides « druggable »?

Concevoir des médicaments



Modifications des peptides

Peptides « druggable »?



Peptides souffrent d'un manque de biodisponibilité
(dégradation, élimination, mauvaise délivrance ...)
Ne conservent pas les structures secondaires des protéines
(clés de certaines informations)



Stratégies pour



- **Améliorer la biodisponibilité**: stabilité du peptide, prolonger sa demi-vie, sa solubilité, son passage au travers de la membrane cellulaire, de la barrière hémato-encéphalique....
- **Augmenter la sélectivité** vis-à-vis du cible
- **Moduler l'activité** :
 - un inhibiteur d'enzyme
 - un agoniste plus puissant ou un antagoniste (système hormone-récepteur)...
- **Stabiliser/Mimer les structures secondaires des protéines**

Modifications des peptides et conception rationnelle de peptidomimétiques

Modification du peptide:

- ✓ Troncature et modifications des parties N- et C-terminales
- ✓ Ala scan
- ✓ Changement de chiralité (**D-AA**)
- ✓ Aminoacides non protéinogéniques

Modification du peptide:

- Contraintes conformationnelles :
- ✓ Globale: Cyclisation
 - ✓ Locale: aminoacides contraints

Pseudopeptides:

- ✓ Modifications liaisons peptidiques (**liaisons pseudopeptidiques**)
- ✓ Transfert de la chaîne latérale sur l'amine- α (**Peptoïdes**)
- ✓ $\text{C}\alpha$ -substitutions
- ✓ Extensions squelette

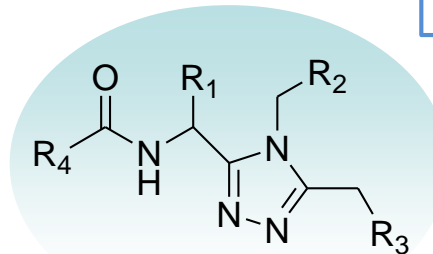
**Peptide
biologiquement actif**

Peptidomimétiques

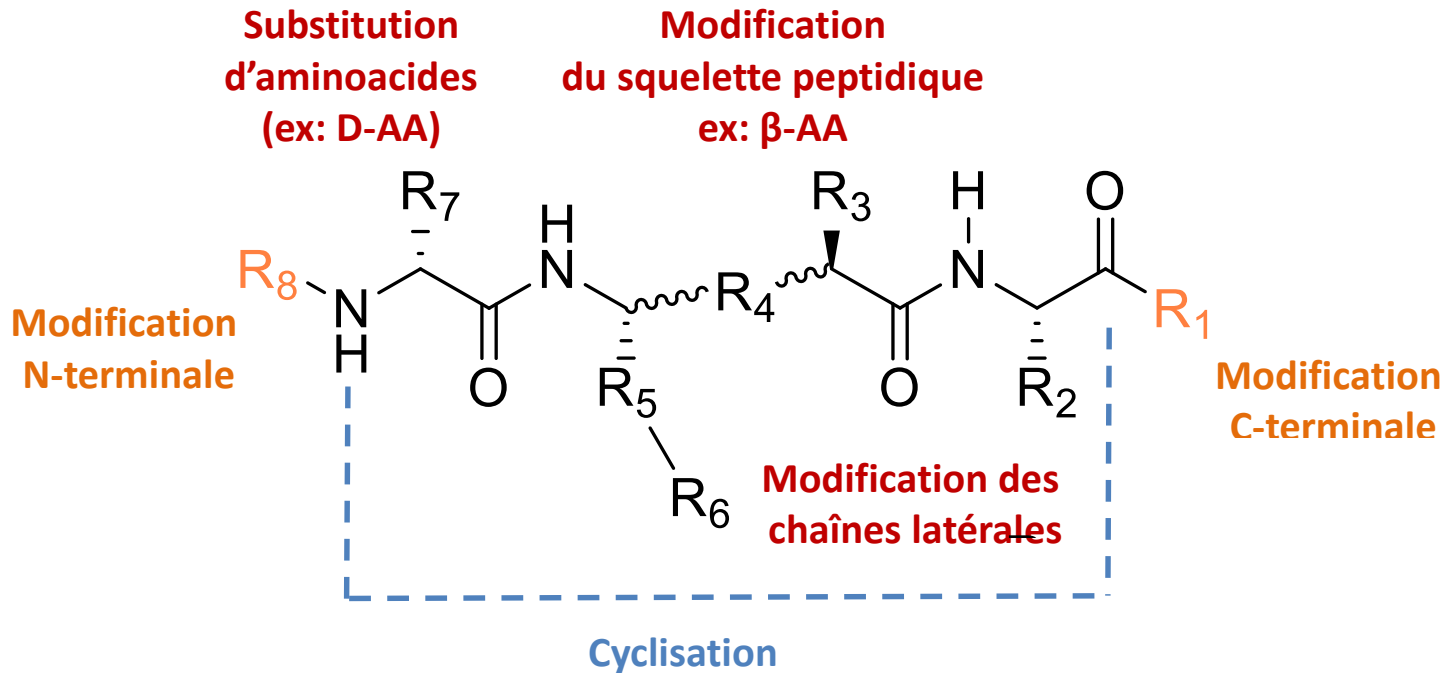
3D Modèle Pharmacophore

(*topologie du mode d'interaction du peptide avec sa cible biologique*).

Distribution des pharmacophores essentiels sur une plateforme



Principales modifications des peptides



Principales modifications: Objectifs

Pseudopeptides pour améliorer la biodisponibilité, sélectivité, activité

Premières modifications chimiques restreintes à:

- ✓ **Modification des parties N- et C-terminales (acétylation, méthylation, amidation)**
- ✓ **Utilisation de D-Aminoacides**
- ✓ **Remplacement d'acides aminés codés par des non codés naturels ou exotiques**
- ✓ **Cyclisation**

Besoin de posséder des molécules non hydrolysables mais portant la stéréochimie du peptide parent a conduit à **remplacer le lien amide CO-NH initial par des systèmes d'atomes différents**

- ✓ **Pseudo-peptides (contiennent une ou plusieurs liaisons modifiées)**
- ✓ **Peptoïdes (déplacement des chaînes latérales des carbones C α vers les azotes d'amide)**

Principales modifications: Objectifs

Pseudopeptides pour stabiliser/mimer les structures secondaires des protéines

Structures secondaires de protéines (coudes, hélice α , brin β):

- ✓ Etablissement des structures des protéines
- ✓ Cruciales pour certaines fonctions biologiques (ex: interactions protéine/protéine),

Mimes de structures secondaires (coudes, hélice α , brin β) permettent de s'affranchir des problèmes de fragilité métabolique ou de flexibilité du squelette des peptides naturels

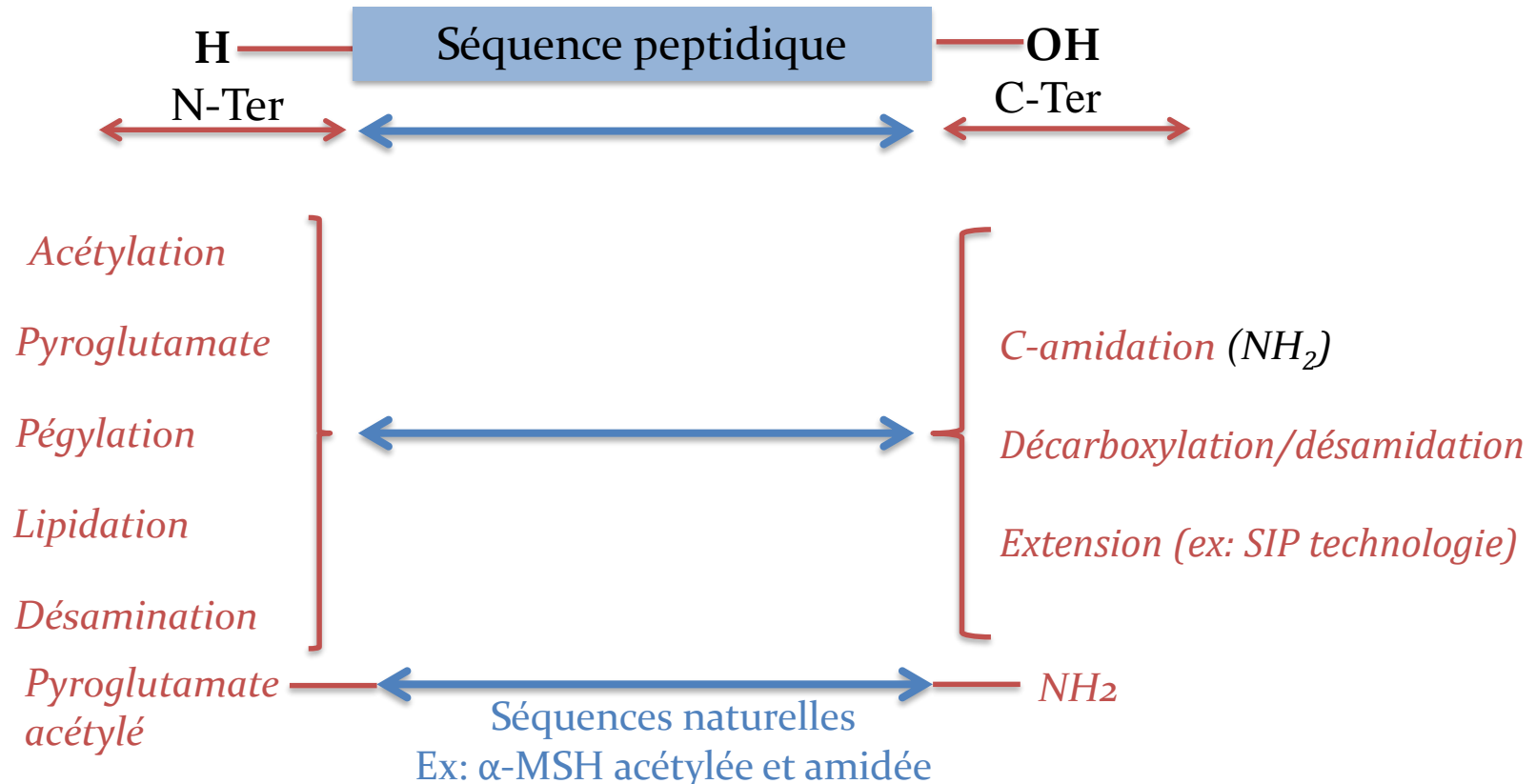
- ✓ Mimes de coudes
- ✓ Peptides agrafés (stapled peptides)
- ✓ Foldamères (β -peptides,.....)

Modifications N- and C-terminales

Un certain nombre d'enzymes protéolytiques sont des exopeptidases, aminopeptidases et des carboxypeptidases qui dégradent les peptides de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale



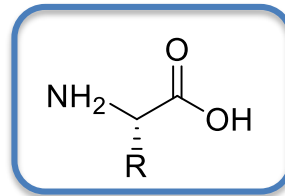
Modifications des extrémités N- et C-terminales augmentent la stabilité enzymatique



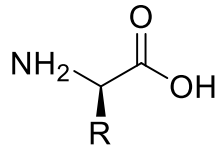
Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂

Aminoacides non protéinogéniques

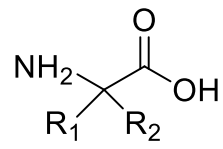
Quelques exemples



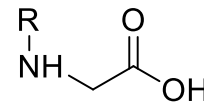
α -aminoacide L



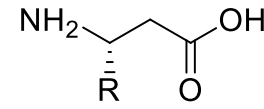
D-AA



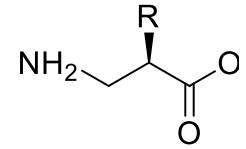
AA C α -Substitué



N-alkyl Gly



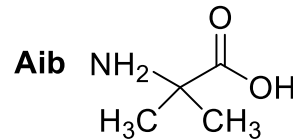
β^3 -aminoacide



β^2 -aminoacide

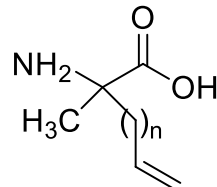
↓
Peptoïdes

↓
 β^3 -peptides



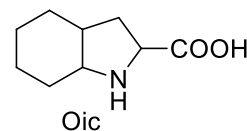
Aib

inducteur d'hélice, **peptaibols**

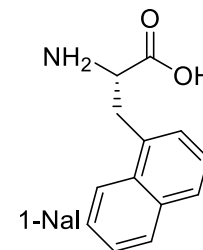


cyclisation métathèse
peptides agrafés

AA encombré

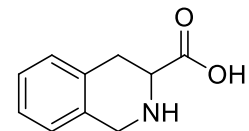


Oic



1-Nal

Phe



Tic

Cyclisation

Cyclisation:

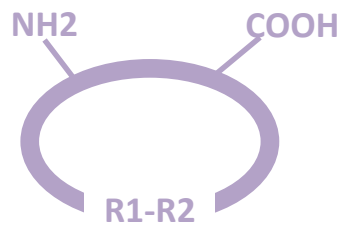
- ✓ introduit des contraintes conformationnelles
- ✓ réduit la flexibilité des peptides,
- ✓ augmente la résistance aux dégradations enzymatiques
- ✓ Augmente la perméabilité et augmente la chance d'obtenir un composé biodisponible par voie orale
- ✓ Augmente la sélectivité pour la cible

Plusieurs types de cyclisation:

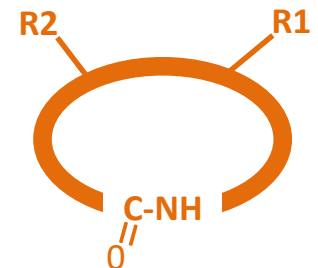
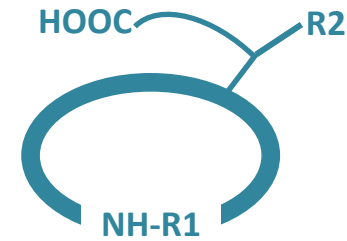
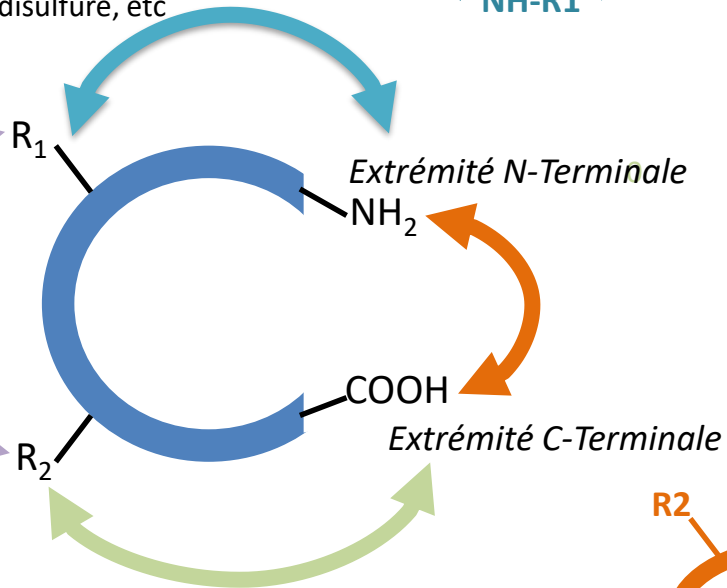
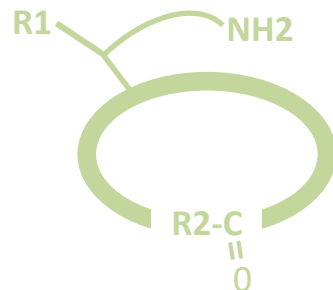
- ✓ tête-à-queue
- ✓ tête à chaîne latérale
- ✓ Chaîne latérale à chaîne latérale

Cyclisation effectuée en solution ou SPPS:

lactamisation, lactonisation, formation de pont disulfure, etc

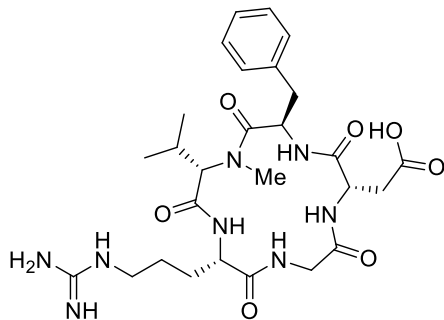


CONH, S-S, C=C,....



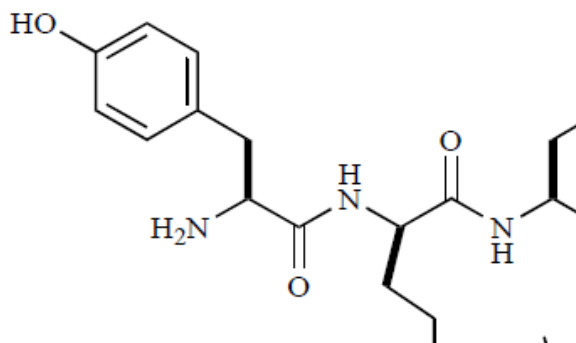
Quelque exemples de peptides cycliques

Récepteurs Intégrine



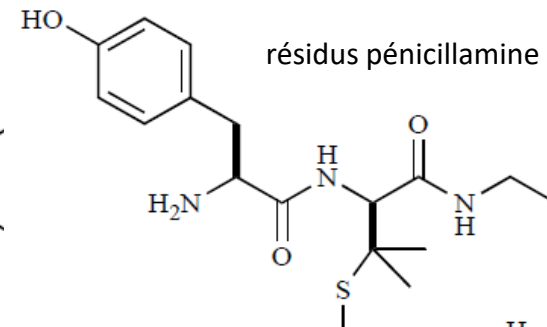
Cyclo-RGD Cilengitide:
cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-NMeVal)

Récepteurs Opioides



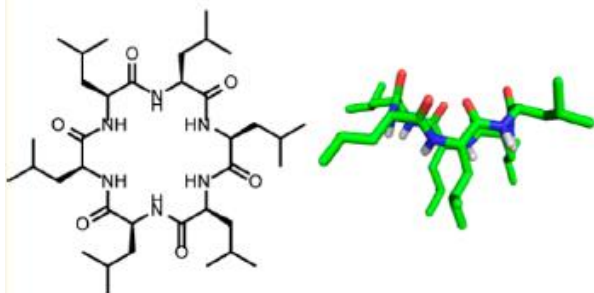
Tyr-c[-D-Orn-2-Nal-D-Pro-NMe-Ala]
agoniste sélectif récepteur μ

Analogue enképhaline



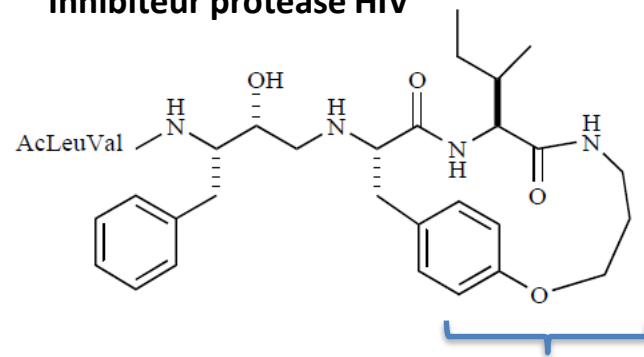
DPDPE, agoniste sélectif récepteur δ^+

Cyclique: étude biodisponibilité



Biodisponible po (rat)

Inhibiteur protéase HIV

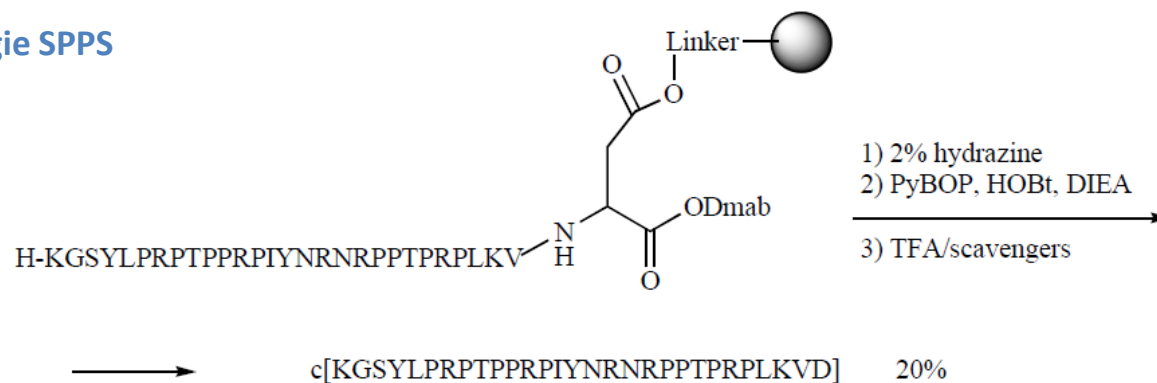


substitution motif Phe-Ile-Val
Contrainte cycle: augmente affinité pour protéase

Exemples de stratégies de cyclisation

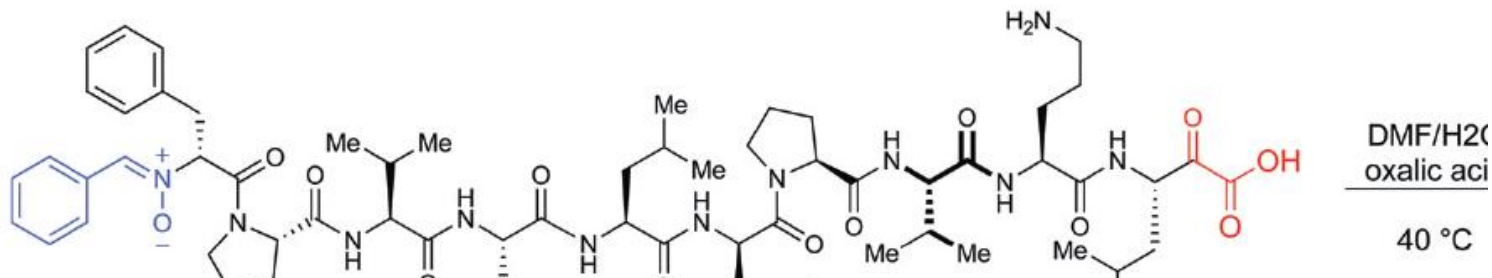
Stratégies de synthèse en solution ou sur support solide

Stratégie SPPS



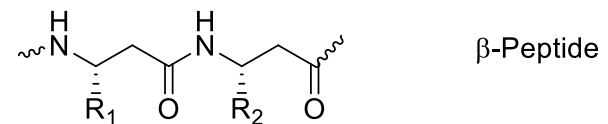
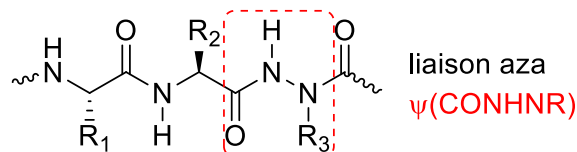
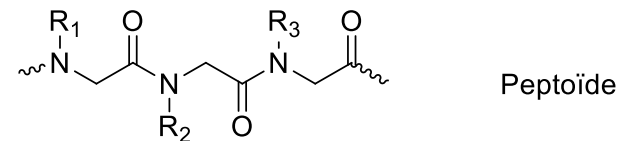
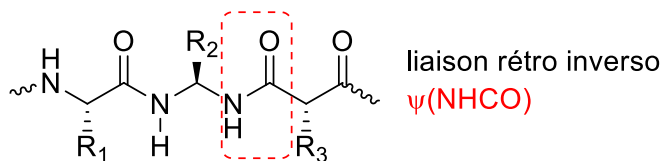
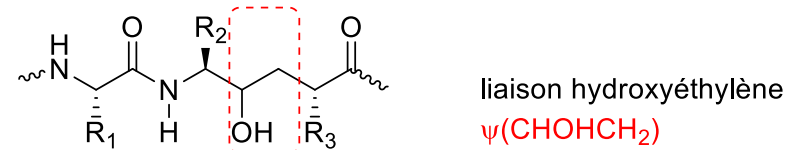
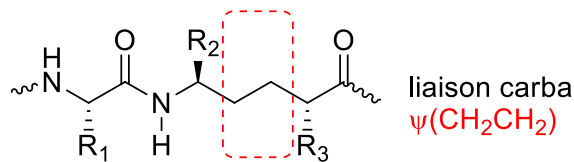
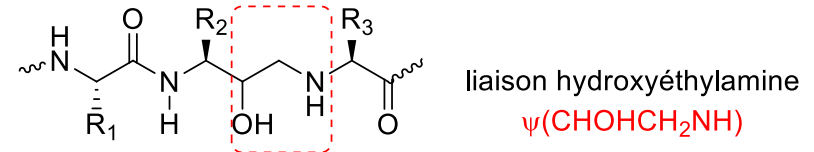
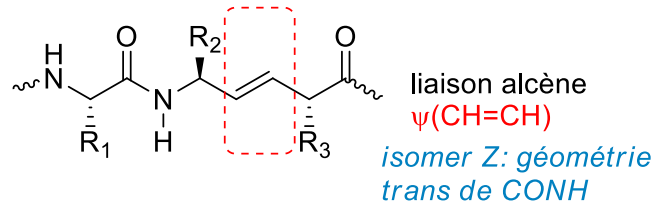
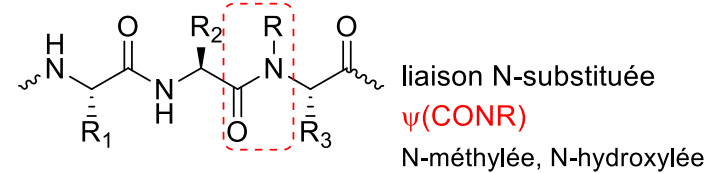
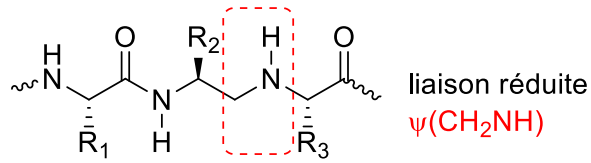
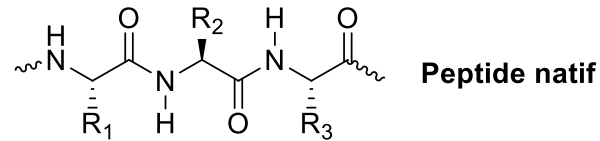
Gentilucci, L Curr. Pharm. Des. 16, 3185–3203 (2010)

Stratégie KAHA (ligation α -ketoacid hydroxylamine amide)



Bode, Org. Biomol. Chem., 2012, 10, 5837

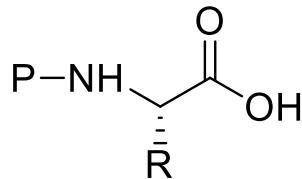
Liaisons pseudopeptidiques: quelques exemples



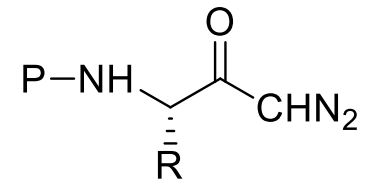
Aminoacides modifiés

Familles chimiques largement utilisées lors de la synthèse de liaisons modifiées

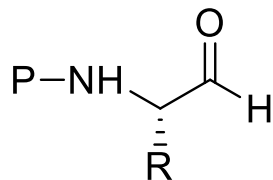
Amino acide



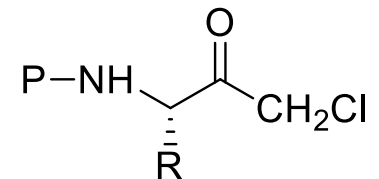
diazométhylcétone



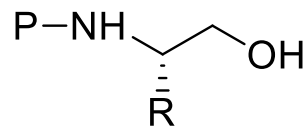
Amino aldéhyde



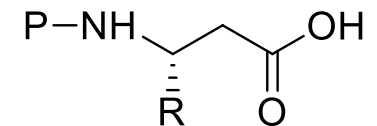
chlorométhylcétone



Amino alcool



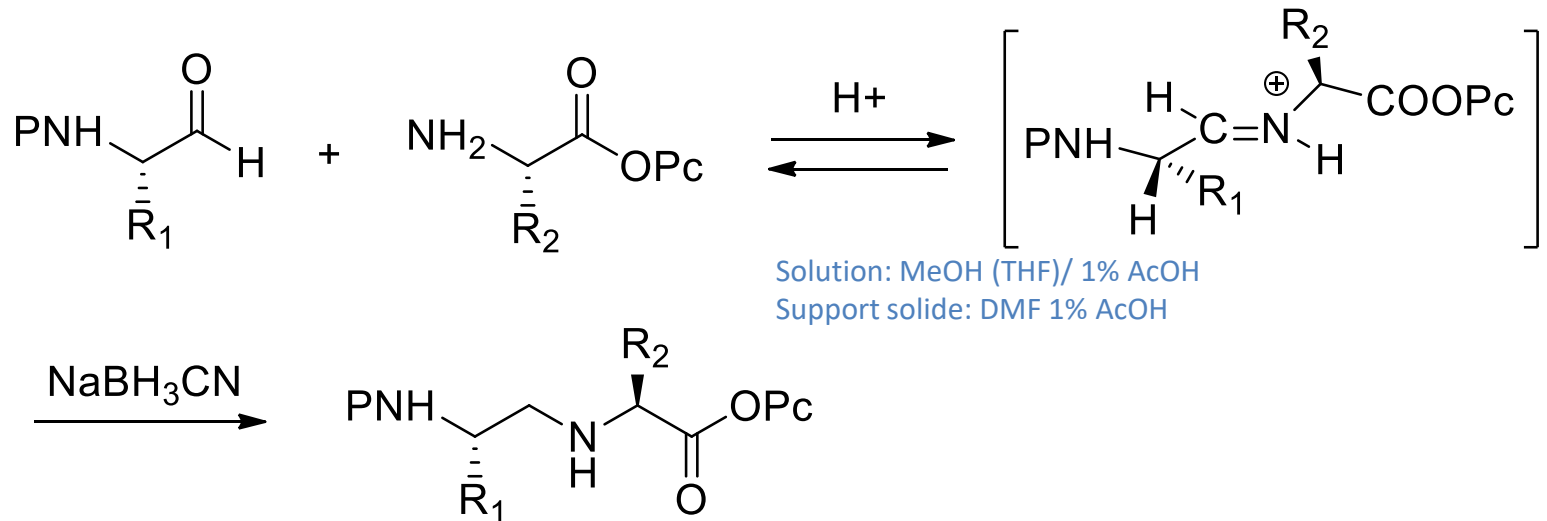
β -Amino acide



Liaison réduite $\Psi(\text{CH}_2\text{NH})$

Méthode générale et utilisable en SPPS.

Condensation réductrice d'un amino aldéhyde (ou peptide aldéhyde) avec un aminoacide (COOH libre, ester, peptide C-protégé ou un peptide attaché à une résine).

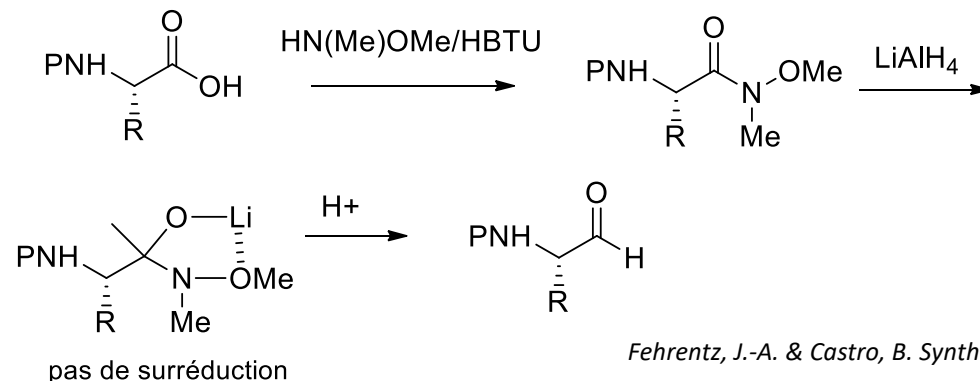


P = Z, Boc, R-CO-, R-CO-NH-CH(R₃)-CO-

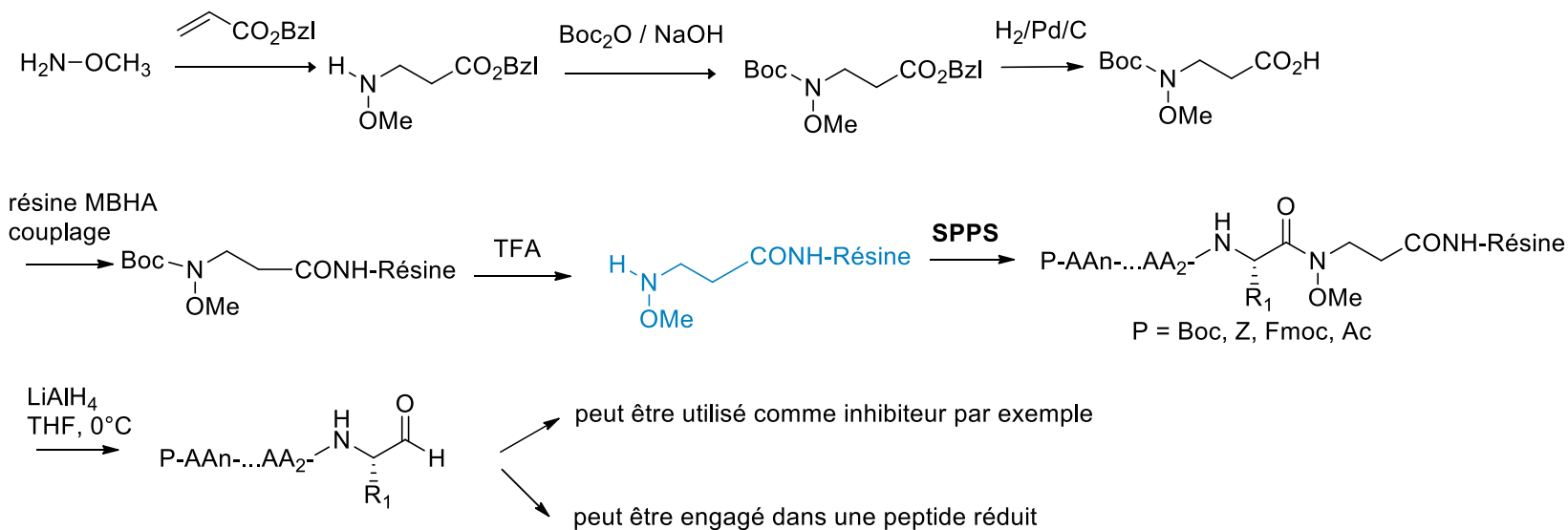
Pc = H, OMe, OEt, OBzl, NH₂, NH-CH(R₄)-COOR'

Préparation des aminoaldéhydes et peptides aldéhydes

Réduction des N,O-diméthyl hydroxamates Méthode de Weinreb



Synthèse de peptides aldéhydes via un bras de type amide de Weinreb supporté

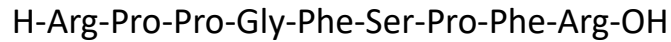


Fehrentz, J. A. et al. J. Org. Chem. 62, 6792–6796 (1997)

Peptides avec liaison réduite



Bradykinine



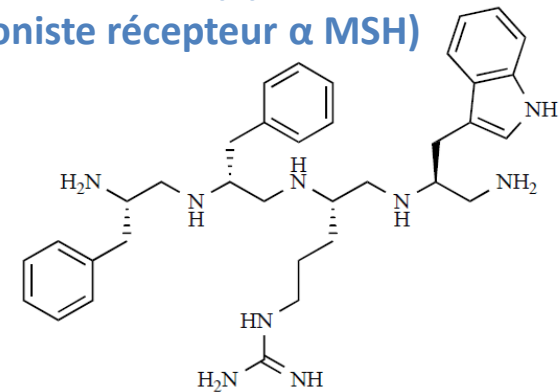
Analogue réduit de la BK (agoniste récepteur BK)



α -MSH/MCR



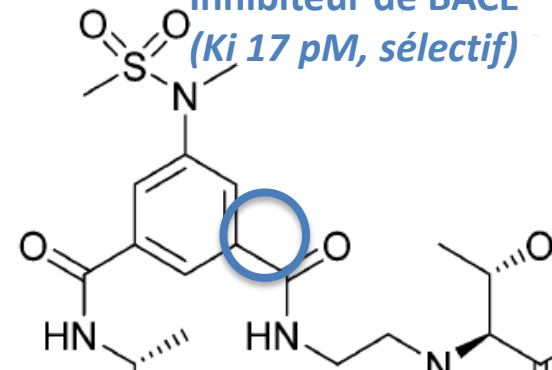
Agoniste mMC1(5)R (agoniste récepteur α MSH)



β -sécrétase (BACE 1) (aspartyl protéase)

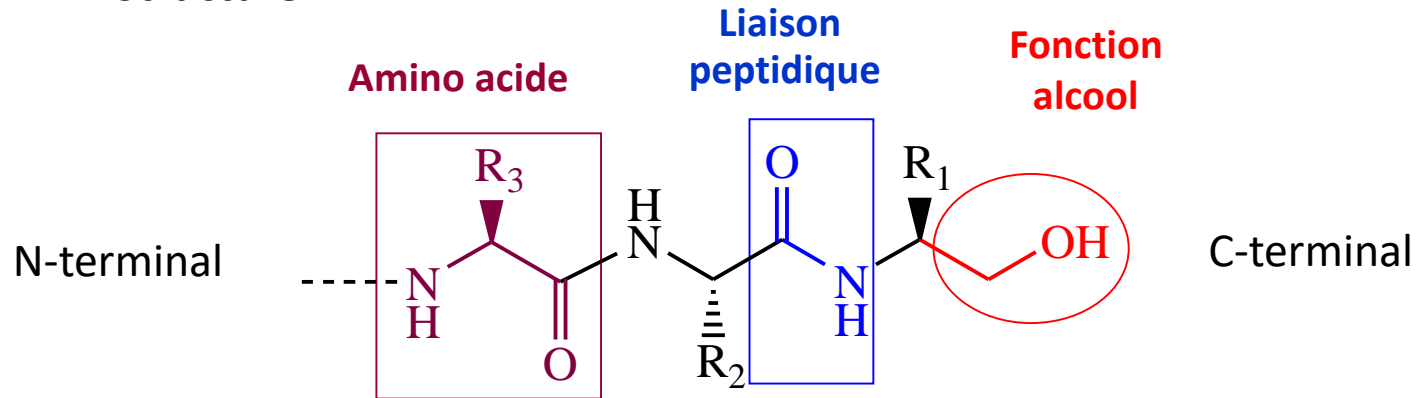
Inhibiteur de BACE

(K_i 17 pM, sélectif)



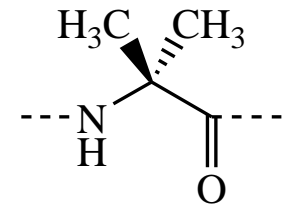
Peptides alcool

Structure



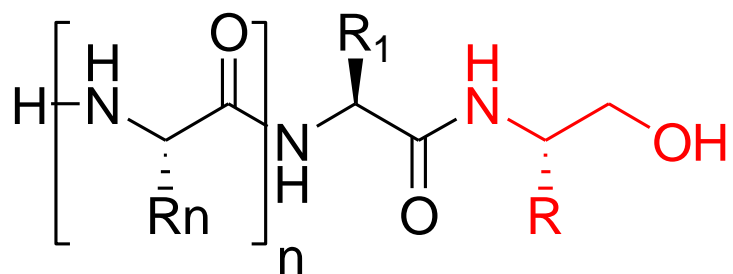
Exemples de peptides alcool biologiquement actifs

- Peptaibols: **Antibiotiques ou antimicrobiens**
- Octreotide: Analogue **Somatostatine (Sandostatin[®])**
- Précurseur de peptides aldéhyde : **Inhibiteurs de protéases**

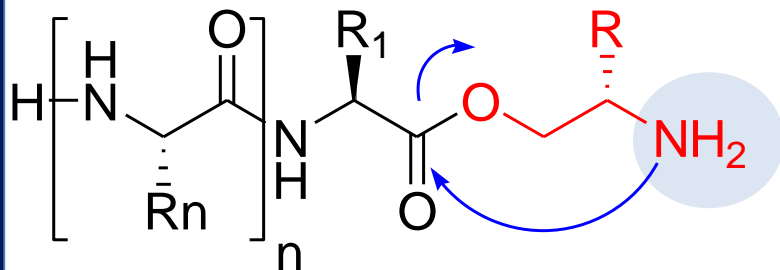


Aib

Synthèse de peptides alcool sur support solide



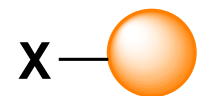
transfert O-N acylique



Ancrage difficile

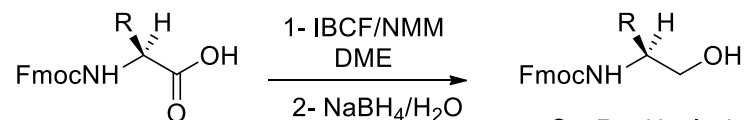
Limitation

Bras spécifique
Résine activée



Support Solide

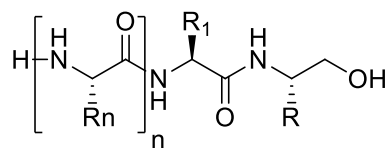
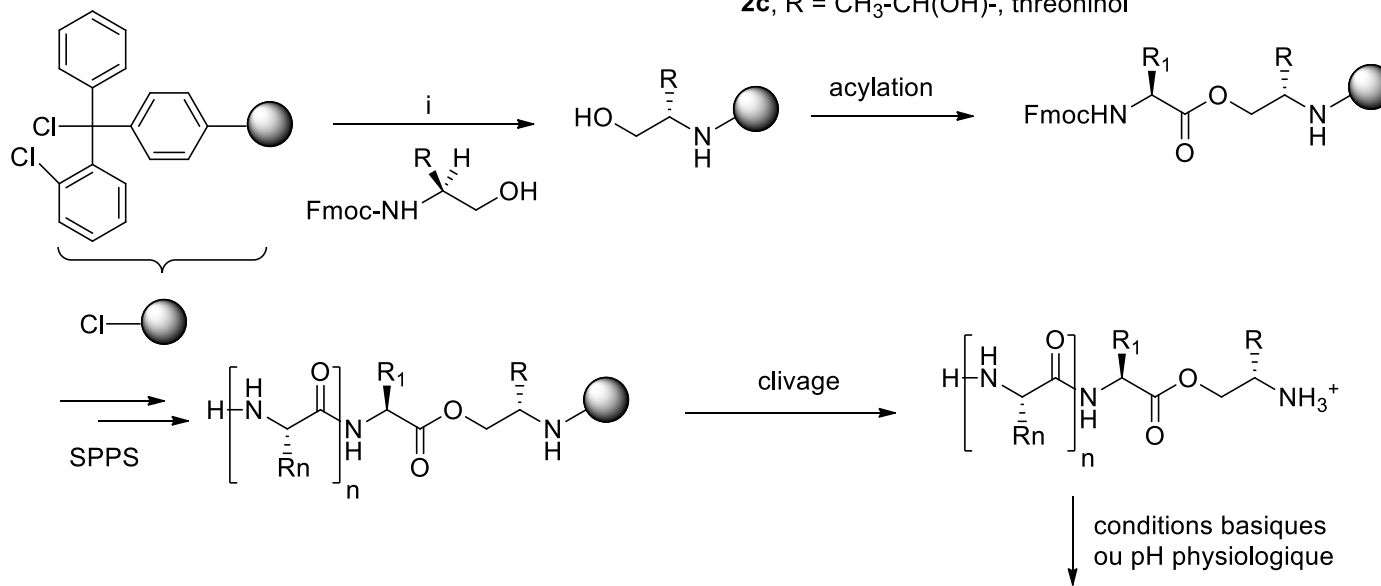
Stratégie de synthèse de peptides alcool sur support solide



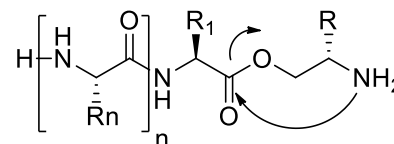
2a, R = H, glycinol

2b, R = (CH₃)₂CH-CH₂, leucinol

2c, R = CH₃-CH(OH)-, threoninol



O-N intramolecular acyl migration



1a, Gramicidin A derivative,

H-Trp-DLeu-Trp-DLeu-Trp-Gly-ol

1b, trichogin GA IV derivative,

H-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Leu-ol

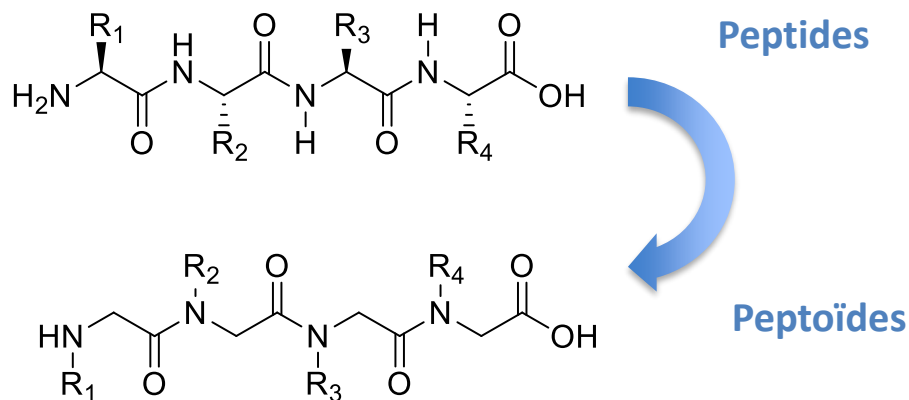
1c, Octreotide,

H-DPhe-Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol

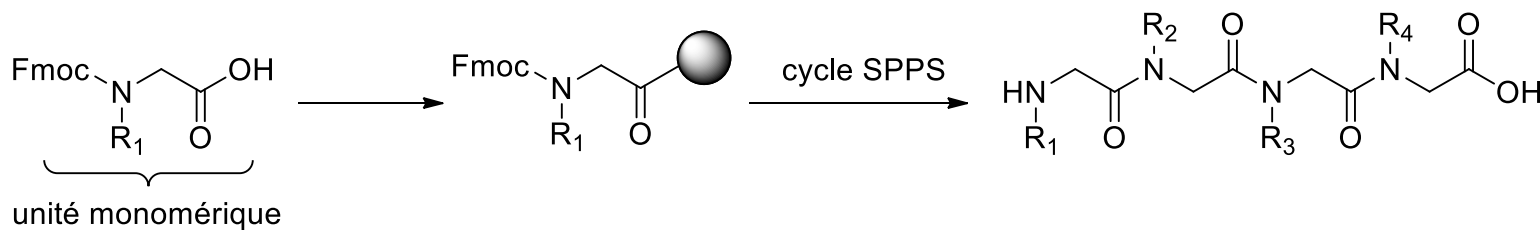
Peptoïdes

Les peptoïdes

- ✓ Isomères des peptides dans lesquels toutes les chaînes latérales sont portées par l'azote α
- ✓ Oligomères de glycine N-substituée → pas de chiralité sur le squelette ni de possibilité de liaisons H
- ✓ Résistants à la dégradation enzymatique
- ✓ Constituent une famille de foldamères

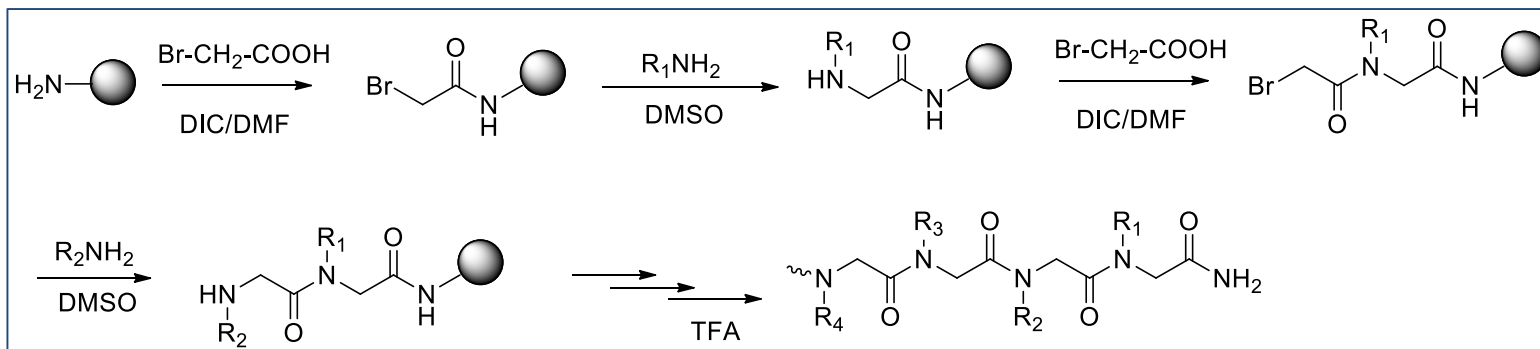


Première stratégie de synthèse : préparation des unités glycines N-substituées puis synthèse des oligomères selon des stratégies de synthèse peptidique



Peptoides

Stratégie de synthèse introduite par R. Zuckermann: répétition de cycle d'acylation par l'acide bromoacétique et de substitution nucléophile par une amine. Cette stratégie évite la préparation des motifs unitaires « glycines N-substituées » protégés.



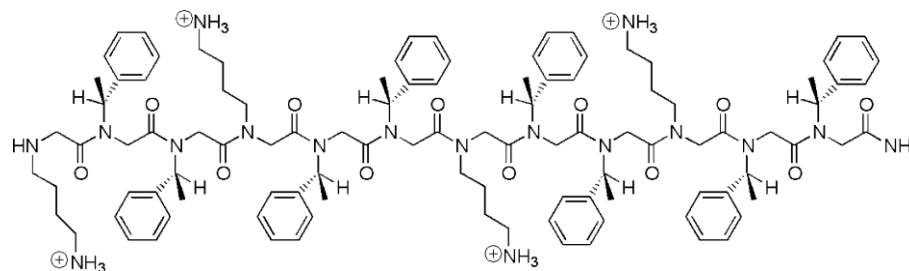
Zuckermann RN, et al. *J Am Chem Soc* 1992; 114: 10646

Applications biologiques:

Antibactériens (ampetoids) :

« Cell-penetrating compounds »

Inhibiteurs PPIs,



J. Am. Chem. Soc., 2003, 125 (40) 12092

Mándity, I. M. & Fülöp, F. *Expert Opin. Drug Discov.* 10, 1163–1177 (2015)

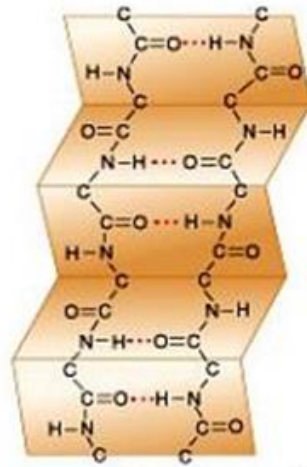
VII- Modifications des peptides

Stabiliser la structure

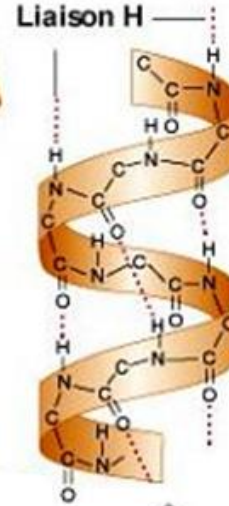
Structures secondaires des protéines

Trois grands types de structures

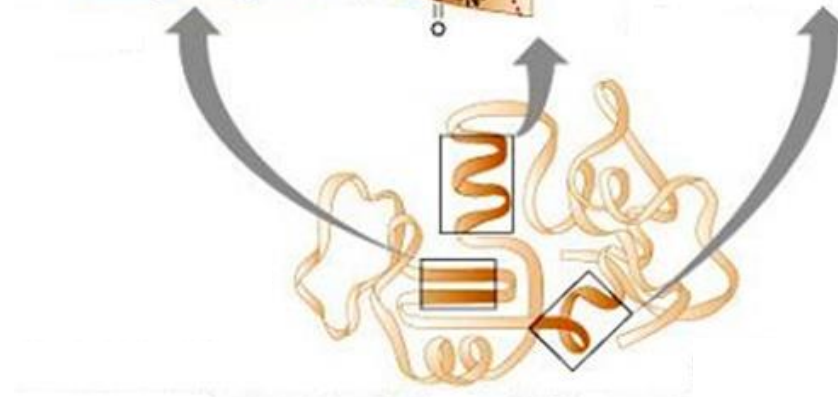
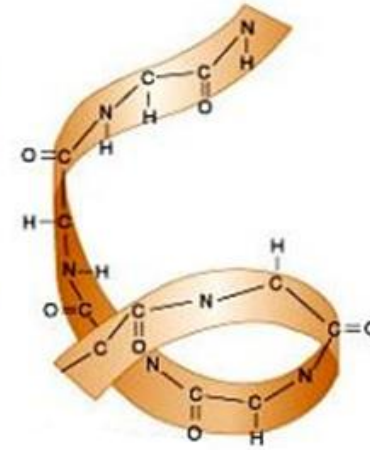
Feuillet



Hélice

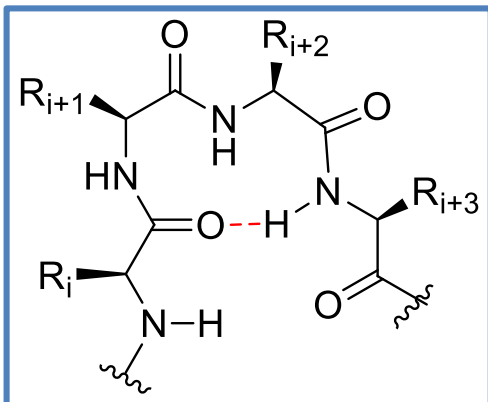


Coude



Implication dans de nombreux processus biologiques via des interactions spécifiques (protéine/protéine; protéine/ADN, protéine/ARN....)

Coûde β et mimes



β -turn: fréquent dans protéines.
Stabilisation par liaison H
(pseudocycle C10, résidus $i/i+3$

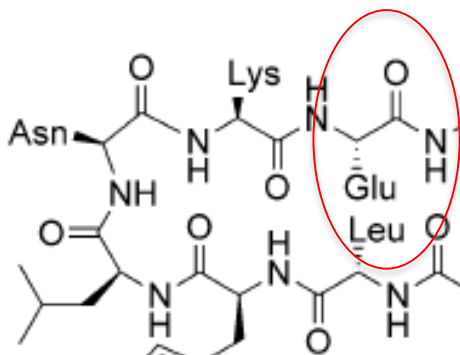
Stabilisation de coûde β :

- ✓ Cyclisation
- ✓ Liaison cis (Pro, Gly, D-aminoacide, N(Me)-aminoacide)
- Ex: D-Pro-L-Pro; D-Trp-Lys (octréotide);
- ✓ Mimes contraints de dipeptides (nécessite la préparation des mimes \rightarrow plus complexe)

Utiliser dans:

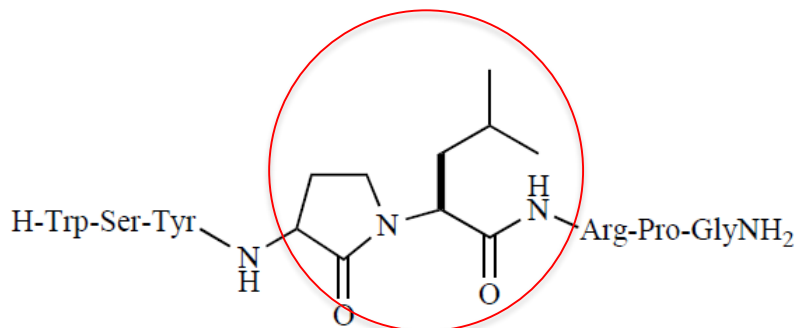
- ✓ Analogues des ligands des GPCRs (mélanocortine, bradykinine, endotheline, enkephaline, GHRP-2, GRH, oxytocine, vasopressin, ...)
- ✓ Stabilisation de " β -hairpin" (épingle à cheveux β): brins β reliés par des coûdes

Mime β -hairpin
mime hélice p53



Agoniste LHRH

Lactame de Freidinger (mime Gly-Leu)

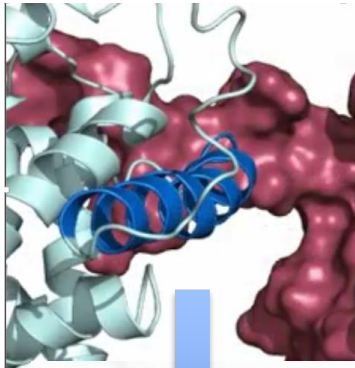


Plus puissant que LHRH (meilleure affinité, plus stable)

Gentilucci, L., et al, *Curr. Pharm. Des.* 16, 3185 (2010)

Hill, T. A., et al, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 13020 (2014)

Hélice α candidats pour la conception de médicaments ?



Peptide structuré dans la protéine :
interaction avec son partenaire



Peptides ne retiennent pas leur structure
hors contexte protéique



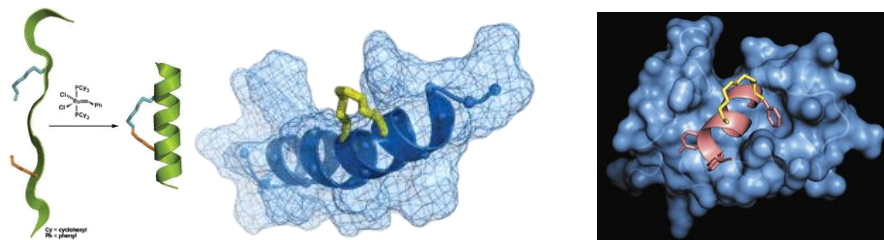
Faible biodisponibilité
Dégradation, élimination,
Faible capacité de pénétration intracellulaire



Mimes de structures secondaires des protéines

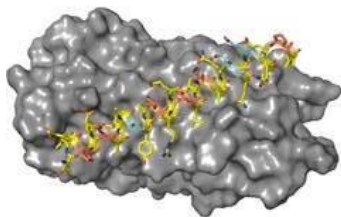
Mimes de structures secondaires des protéines

- ✓ **Peptides agrafés:** stabiliser les hélices α pour cibler des “protéines” considérées undruggable’



et **Aileron therapeutics**

- ✓ **Foldamers :** mimer les structures secondaires des protéines (Longevity Biotech)



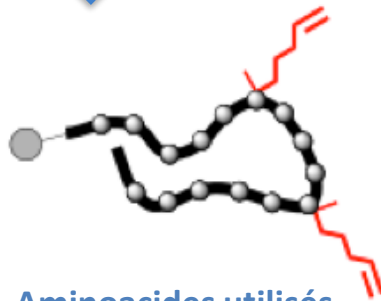
Structure cristalline d'un foldamère avec le domaine CHR de la protéine gp41 du VIH

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **2009**, *106*, 14751–14756.

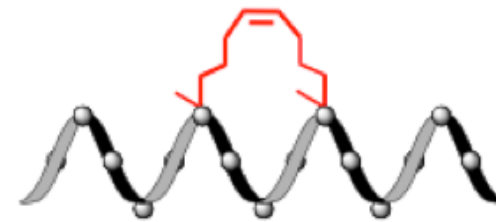
Peptides agrafés



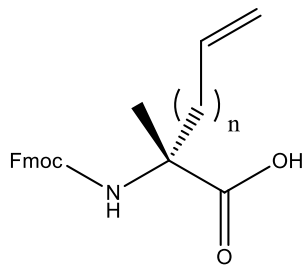
Stabilisation des peptides dans leur conformation α -hélicoïdale bioactive par introduction d'agrafe (bras chimique)



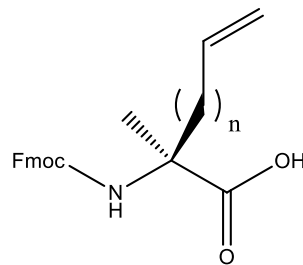
1. RCM (Grubb's catalyst)
2. Cleave from resin



Aminoacides utilisés



Fmoc-R5-OH (n=2)
Fmoc-R8-OH (n=5)



Fmoc-S5-OH (n=2)
Fmoc-S8-OH (n=5)

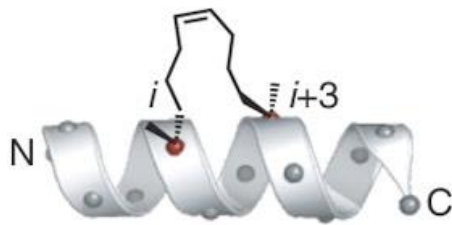
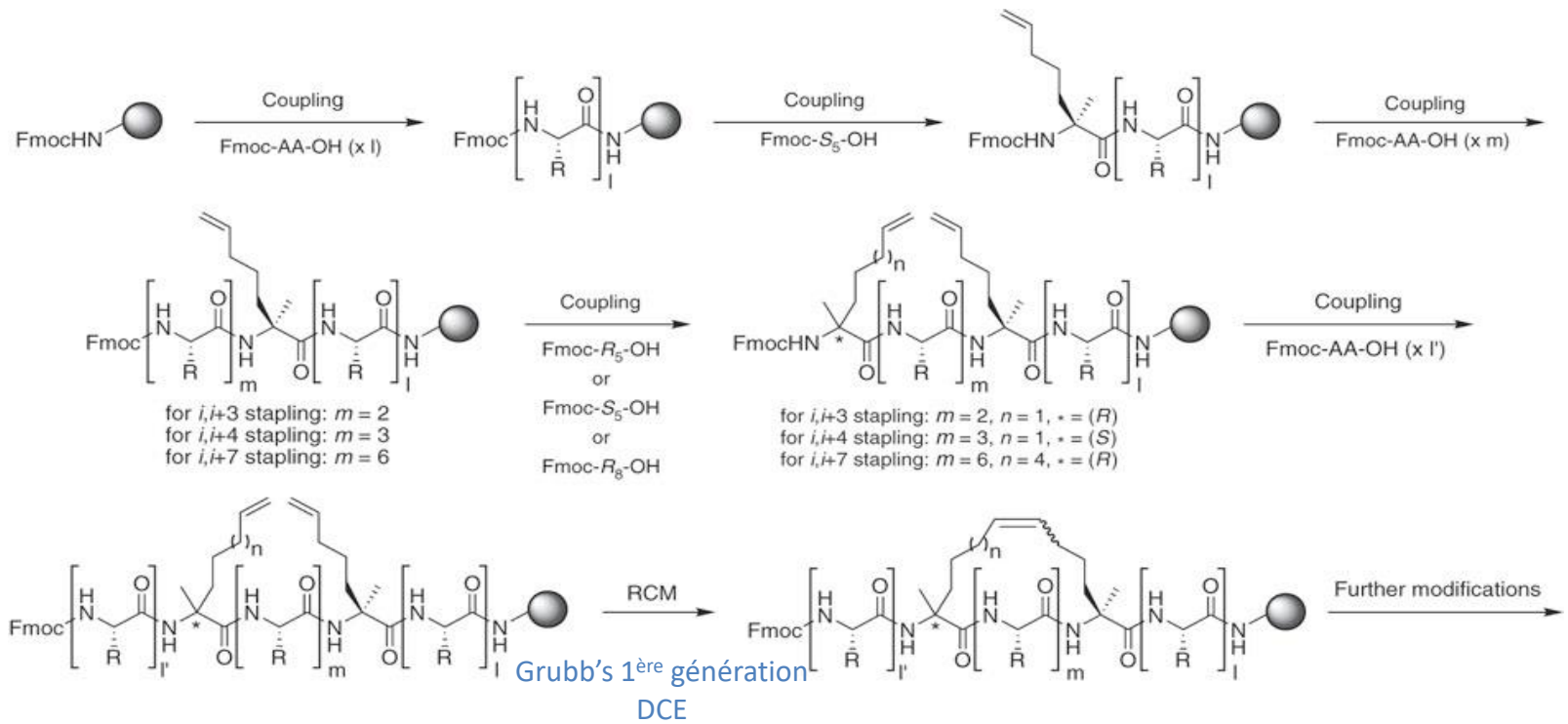
Verdine technology

Nature **2009**, 462, 182

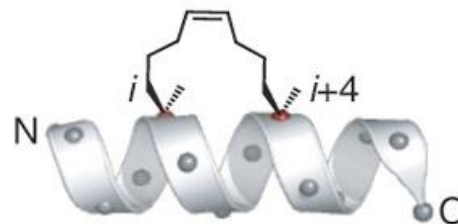
Nat. Med. **2008**, 14, 144.

Science **2004**, 305, 1466

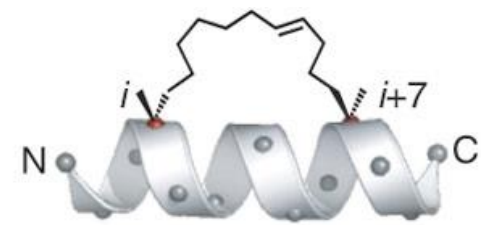
Synthèse de peptides agrafés



$R_{i,i+3}S(8)$ staple

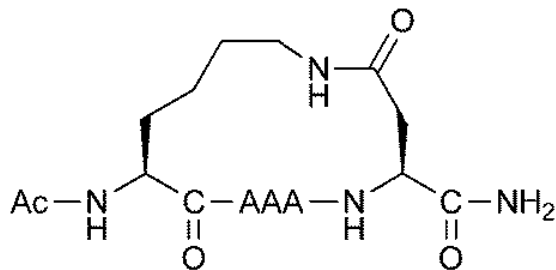


$S_{i,i+4}S(8)$ staple

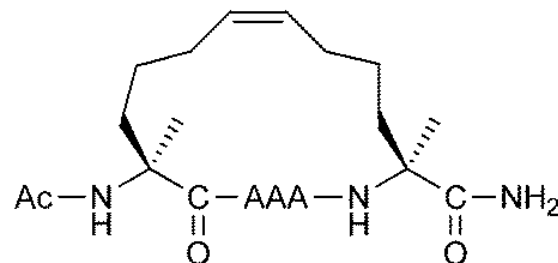


$R_{i,i+7}S(11)$ staple

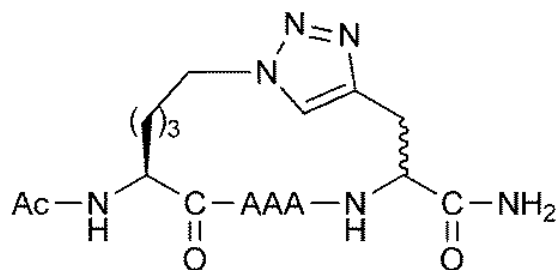
Autres exemples de peptides agrafés



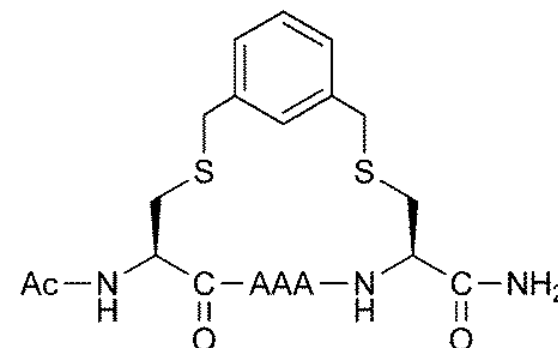
lactam



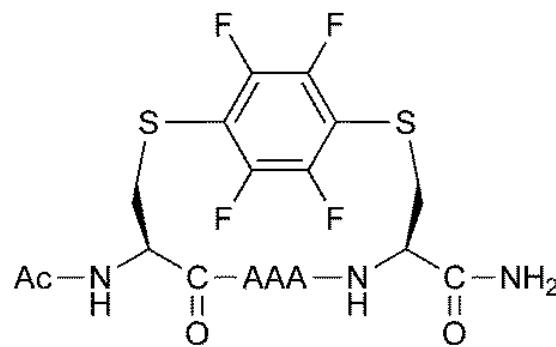
hydrocarbon



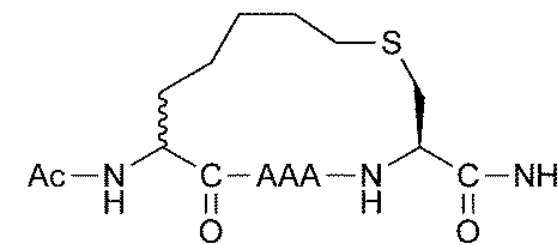
CuAAC



bis-thioether



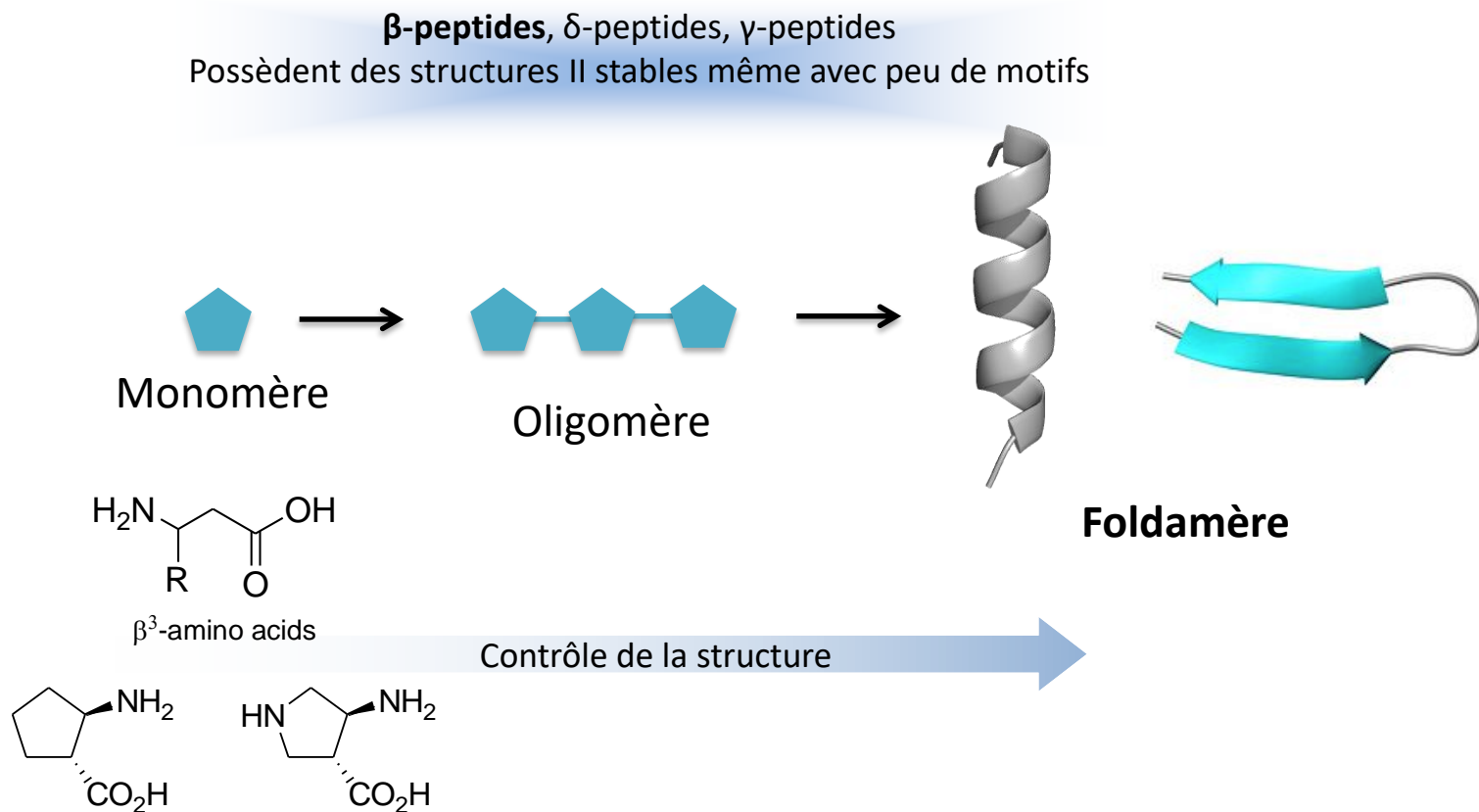
perfluorobenzene



thioether

Foldamères

Oligomères artificiels capables d'adopter une structure stable, prédictible et bien définie (hélices α , rubans, feuilletts), et ayant une grande stabilité protéolytique

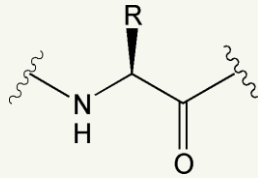


Gellman Acc. Chem. Res. 1998
Moore et al. Chem. Rev. 2001
Seebach et al, Chem Biodivers 2004
Hill, D. J. et coll. Chem. Rev. 2001

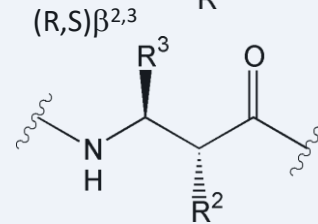
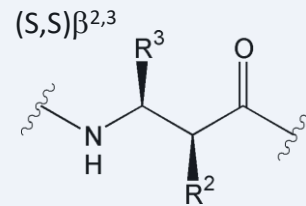
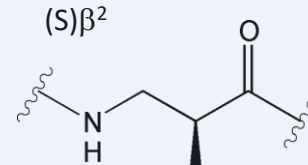
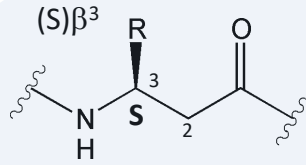
Blocs de synthèse des foldamères



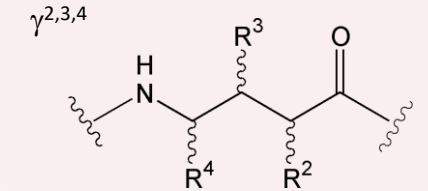
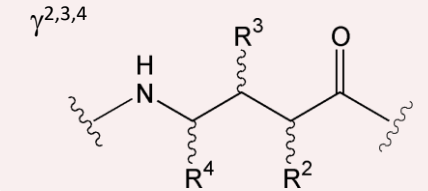
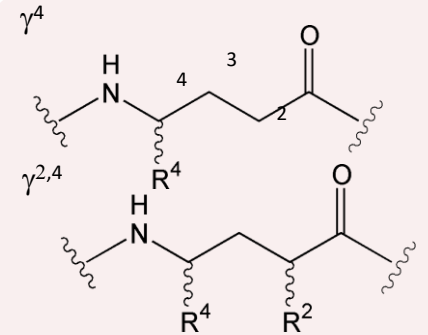
α -amino acids



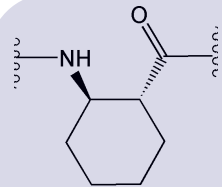
β -amino acids acycliques



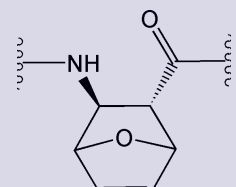
γ -amino acids acycliques



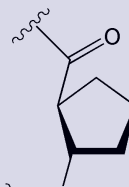
β -amino acids cyclique



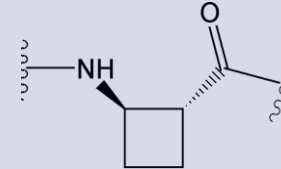
trans-ACHC



trans-oxanorbornène



trans-ACPC



trans-ACBC

and ϵ -amino acids, hydrazino, β -thio-amino acids, α -aminoxydes...

Peptoides

Foldamères

Homo-oligomers
Hétéro-oligomers
Hybrid-oligomers

D. Seebach, Biopolymers, 2006
S. Gellman, Acc. Chem. Res. 2008
P. Balaram, Chem. Rev. 2011,
O. Reiser, Amino Acids 2011,
F. Fulop, Chem. Soc. Rev. 2012

Foldamères et peptides agrafés



Mimes d'hélice

Propriétés

Stabilité structurale
et prédictibilité

Stable vis à vis des la
Dégradation enzymatique

Spécificité pour la cible augmentée

Capacité à traverser
Le membranes cellulaires

Plateformes pour des applications biologiques

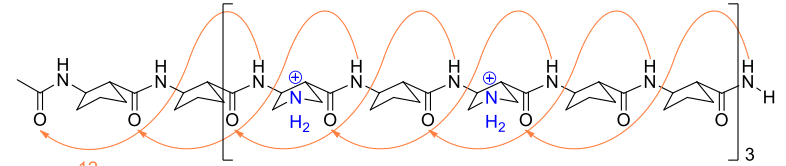
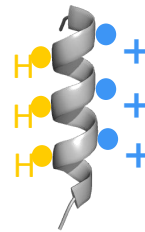
Inhibiteurs d'interaction
protéine/protéine(PPIs)

Antimicrobiens
(hélice amphipatiques)

Vecteurs de pénétration intracellulaire

Foldamères et peptides agrafés: plateformes pour des applications biomédicales

Exemples:

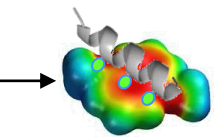
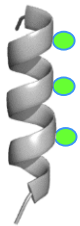


Gellman, S. H. et coll. *Nature* 2000

DeGrado, Gellman, Seebach,
Peptoides

Antimicrobiens

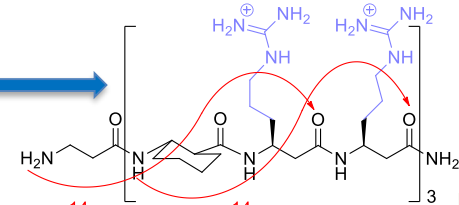
Inhibiteurs PPIs



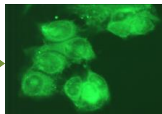
Cible protéique

**Foldamères
Peptides agrafés**

Vectorisation intracellulaire

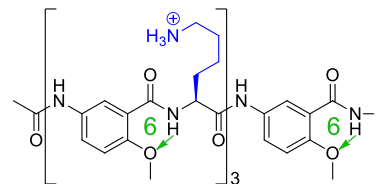


Gellman, S. H. et coll.
J. Am. Chem. Soc. 2005



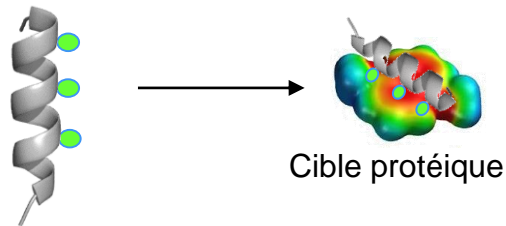
Gellman, Schepartz, Giralt, Hamilton,
Zuckermann (**foldamers**)
Groupe de Verdine (**stapled peptides**)

Inhibiteurs d'interactions protéine-sucre



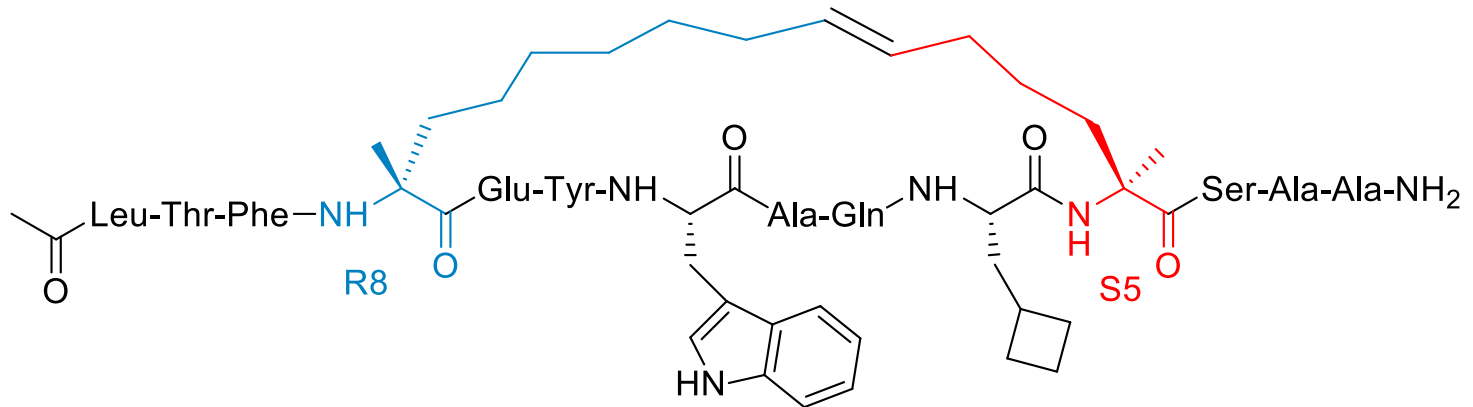
DeGrado, S. H. et coll. *ACS Chem. Biol.* 2014

Exemple d'inhibiteur de PPI: peptides agrafé



ALRN-6924

Inhibiteur de l'interaction p53 avec MDM2 et MDMx
Phase clinique 1 (tumeur solide, lymphome), iv



Chang, Y. S. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E3445 (2013)