



**HAL**  
open science

# Ligation chimique sur support solide : vers la préparation d'analogues de la glycoprotéine MUC1

Isidore Decostaire

► **To cite this version:**

Isidore Decostaire. Ligation chimique sur support solide : vers la préparation d'analogues de la glycoprotéine MUC1. Chimie. Université d'Orléans, 2008. Français. NNT : . tel-00348277

**HAL Id: tel-00348277**

**<https://theses.hal.science/tel-00348277>**

Submitted on 18 Dec 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES**  
**LABORATOIRE DU CNRS (CBM/UPR4301)**

## **THÈSE** présentée par : **Isidore DECOSTAIRE**

soutenue le : **12 novembre 2008**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Chimie / Chimie organique et bioorganique

### **Ligation chimique sur support solide : vers la préparation d'analogues de la glycoprotéine MUC1**

**THÈSE dirigée par :**

**Mlle Agnès DELMAS**

Directeur de Recherche, CNRS-Orléans

**RAPPORTEURS :**

**Mr Eric DEFRANCO**

Professeur, Université de Grenoble

**Mr Jean-François HERNANDEZ**

Chargé de Recherche, CNRS-Montpellier

---

**JURY :**

**Mr Luigi AGROFOGLIO**

Professeur, Université d'Orléans    Président du jury

**Mlle Agnès DELMAS**

Directeur de Recherche, CNRS-Orléans

**Mr Eric DEFRANCO**

Professeur, Université de Grenoble

**Mr Jean-François HERNANDEZ**

Chargé de Recherche, CNRS-Montpellier



**THESE PRESENTEE A L'UNIVERSITE D'ORLEANS  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS**

**CHIMIE BIOLOGIQUE**

**PAR**

**Isidore DECOSTAIRE**

**LIGATION CHIMIQUE SUR SUPPORT SOLIDE :  
VERS LA PREPARATION D'ANALOGUES  
DE LA GLYCOPROTEINE MUC1**

*Soutenu publiquement le 12 novembre 2008 devant le jury composé de :*

**Luigi Agrofoglio, Professeur, Université d'Orléans**

**Président du jury**

**Agnès Delmas, Directeur de recherche, CNRS, Orléans**

**Directeur de thèse**

**Eric Defrancq, Professeur, Université de Grenoble**

**Rapporteur**

**Jean-François Hernandez, Chargé de Recherche, CNRS, Montpellier**

**Rapporteur**



***A mes parents,***

***Jillane,***

***Ysée et Eléa.***

## **REMERCIEMENTS**

*Ce mémoire est l'aboutissement de recherches effectuées au Centre de Biophysique Moléculaire (CNRS-Orléans-UPR4301), dirigé par le Professeur Paul Vigny puis par le Directeur de recherche Jean-Claude Beloeil.*

*Je remercie vivement le Professeur Luc Morin-Allory, directeur de l'école doctorale, pour m'avoir permis d'aller au terme de la thèse en dépit des impératifs administratifs.*

*J'adresse ma profonde gratitude à Agnès Delmas pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe « Peptides, glycopeptides et protéines de synthèse » et suivi au cours de ses six années d'étude comme directrice de thèse. Agnès a toujours cheminé à mes côtés. Sa rigueur scientifique, ses encouragements sans cesse réitérés, sa patience à mon égard m'ont fait grandir. La rédaction de ce manuscrit s'est avéré être une véritable introspection expérimentale et sans sa présence et sa confiance, la thèse aurait été un songe.*

*Je remercie le Professeur Luigi Agrofoglio pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.*

*Je remercie vivement le Professeur Eric Defrancq et le Chargé de recherche Jean-François Hernandez d'avoir accepté d'examiner et juger ce travail.*

*Je tiens particulièrement à exprimer ma profonde gratitude à Dominique Lelièvre qui m'a accompagné et guidé à travers les méandres de ce rite initiatique. Dominique m'a fait découvrir un « univers peptidique » qui m'a envahi et épanoui intellectuellement. Sa disponibilité tant sur le plan scientifique que dans nos relations humaines m'a permis de creuser des sillons et de faire germer des peptides modifiés. Je tiens à te dire Dominique : MERCI pour ta Maîtrise, ton Exigence, ton Respect, notre Complicité et ton Intégrité. J'aurai vraiment aimé que tu sois officiellement mon co-directeur de thèse, auréolé de ton HDR mais chacun cherche son chat...*

*Si c'était à refaire, je sais sur quelle paillasse je poserais mes erlens, fioles jaugées et autres seringues frittées.*

*Appartenir à l'équipe des « Peptidistes » à été un véritable bonheur. Philippe Marceau, « Docteur es 433AB » a grandement contribué au maintien optimal de notre outil de base. Sa grande compétence technique, son approche de la programmation BbADEFfCd et sa dimension humaine m'ont permis de mener en toute quiétude les synthèses envisagées. J'ai également eu la chance de croiser Vincent Aucagne. Il m'a insufflé une dynamique scientifique et un enthousiasme sans commune mesure. Travailler à ses côtés m'a fait prendre conscience qu'il y a seulement un écart de 1 entre lui et moi ; mais lui, hélas, raisonne à l'échelle logarithmique.*

*Au cours de ces pérégrinations, j'ai voyagé avec Gaëlle-Anne Cremer et Ibaï Valverde. Confronté aux mêmes variations cycliques du thésard en quête du graal, nous avons pu partager nos interrogations, nos attentes, nos déceptions et nos joies. Riches de ses enseignements, un fil indéfectible jalonna notre parcours à venir en dépit des aléas du présent.*

*Un grand merci à Hervé Meudal pour les analyses RMN et également à l'équipe de spectrométrie de masse pour la caractérisation des produits (parfois en dehors des dates de service, surtout à la fin...!) : Corine Buré, Martine Beaufour, Martine Cadène, Rémi Puppo et Guillaume Gabant.*

*Je voudrais également remercier les stagiaires que j'ai encadré et qui ont contribué à ce travail : Haihui Zhang, Julien Huleux et Claire Giboin. J'ai essayé de prodiguer ce que l'on m'a transmis ; une certitude : j'ai beaucoup appris.*

*Je remercie toutes les personnes, du Centre de Biophysique Moléculaire, pour cette expérience inoubliable. Des équipes techniques (Justo, Martial, Michel, François, Franck, Thierry...) et administratives (Viviane, Brigitte, Patricia, Maryse, Nadège, Isabelle, ...) en passant par les équipes de recherche (Fabienne, Régine, Marylène, Hélène, Hervé, Béatrice, Bertrand, Nadège, Franck, Norbert, Stéphane, Lucille, Sylvain, Nicole, Cristine, Jean-Pierre, Céline...) et les acolytes de fortune (Philippe, Céline, Anne, Aurélie...). J'ai une pensée particulière pour Patrice Marchand et Jean-Marc Bonmatin qui m'ont chaleureusement accueilli dans leur antre et soutenu durant la rédaction. La liste est exhaustive mais elle est sincère.*

*Ce travail a été réalisé en parallèle de mon activité professionnelle de météorologiste. A ce titre, je tiens à remercier chaleureusement mes collègues de la base aérienne 107 de Villacoublay (Frédéric, Olivier, Arnaud, Sébastien, Jean-Luc, Patrick...) et 123 d'Orléans (Francky, Souraiche, Didier, Frédéric, Catherine et Martine) qui m'ont permis de suivre des études au Conservatoire National des Arts et Métiers et à l'Université. J'ai une pensée pour Denis Cendrier, ma référence en matière d'idéal intellectuel. Nos interminables discussions existentialistes me manquent. J'embrasse également sur son « frontibus », l'apôtre des paysages solognots et le grand spécialiste de l'ornithomancie, Jean-Paul Ferron.*

*S'adresser enfin à ses proches n'est pas chose aisée.*

*« Un seul être vous manque et tout est dépeuplé ». La réussite de l'un puise irrémédiablement dans les racines de l'autre. Cette thèse, je te la dédie: Jillane.*

*Je voudrais simplement dire à mes filles, Ysée et Eléa, que je les aime et que les mots me manquent pour leur exprimer mes sentiments. Je mesure le temps passé car je ne vous ai pas vu grandir.*

*Joseph et Marie m'ont inculqué certaines valeurs dont je mesure maintenant la portée. Qu'ils en soient remerciés et c'est une partie d'eux qui s'exprime dans cet ouvrage. Je les embrasse d'un amour filial.*

*Serge et Patricia ont grandement contribué à la réussite de ce projet. Leur compréhension de mes aspirations et leur prise en charge de la cellule familiale m'ont permis d'avancer sereinement. Je vous embrasse tendrement.*

*J'aimerais également embrasser mes frères Frank et Patrick ainsi que ma sœur Jacinthe pour leur soutien inconditionnel.*

*J'embrasse toute ma famille : Lucia, Emmanuelle, Raphaël, Isabel, Michel D, Régis, Yaël, Camille , Héroïse, Eric, Alix, Maélys, Loulya, Eliaz, Vanessa, Elliott, Carmen, Michel T, Eliane, Michel L, Béatrice, Hélène, Jérôme, Célia, Lucette, Henri, Roxane, Carlos, Coentin, Florestan...*

*J'embrasse tous mes amis : Catherine, Dominique, Victor, Basile, Isabelle, Ahmed, Octavie...et particulièrement mon ami de vingt ans Philippe Barquet.*

Le travail réalisé au cours de cette thèse a fait l'objet de deux publications, de deux communications orales et de deux communications par affiche :

### **PUBLICATIONS**

Controlling the outcome of overacylation of N-protected aminooxyacetic acid during the synthesis of an aminooxy-peptide for chemical ligation. Decostaire I., Lelièvre D., Zhang H., Delmas A. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 7057-7060.

Synergic effect of hydride and proton donors in the Pd(0)-mediated deprotection of N $\alpha$ -Aloc proline derivatives. Decostaire I., Lelièvre D., Aucagne V., Delmas A. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 6523-6526.

### **COMMUNICATIONS**

#### **ORALES**

#### **XIII<sup>ème</sup> réunion du Groupe Français des Peptides et Protéines (GFPP) :**

Synthèse chimioenzymatique d'analogues glycopeptidiques de MUC1.

#### **XI<sup>ème</sup> Rencontre de Chimie Organique et Biologique (RECOB) :**

Réversibilité de la réaction secondaire d'allylamine observée lors de la déprotection de l'Aloc d'un N $\alpha$  d'amine secondaire en solution et sur résine polaire

#### **POSTERS**

#### **XIV<sup>ème</sup> réunion du Groupe Français des Peptides et Protéines (GFPP) :**

Le groupement Aloc : utilisation comme groupe protecteur temporaire sur N $\alpha$  de peptides déprotégés en solution et sur résine polaire HMPA-PEGA.

#### **XV<sup>ème</sup> réunion du Groupe Français des Peptides et Protéines (GFPP) :**

La ligation polyoxime supportée : obtention d'un peptide déprotégé sur résine polaire.

### **ENCADREMENTS D'ETUDIANTS**

Julien huleux : Stagiaire de 2<sup>ème</sup> année d'IUT de chimie d'Orsay (avril à juin 2004).  
« Synthèse, analyse et purification d'analogues de MUC1. »

Haihui Zhang : Stagiaire élève ingénieur de 3<sup>ème</sup> année de l'INSA de Lyon (mars à juillet 2005).  
« Ligation chimique sur support solide : Mise au point et application à la synthèse d'une protéine potentiellement immunogène (analogue de MUC1). »

Claire Giboin : Stagiaire de 2<sup>ème</sup> année d'IUT de chimie d'Orléans (avril à juin 2006).  
Synthèse de « poly MUC1 » par ligation chimique sur support solide.

## ABREVIATIONS

### Solvants

<b>AcONa</b> :	Acétate de sodium
<b>AcOEt</b> :	Acétate d'éthyle
<b>CH<sub>3</sub>CN</b> :	Acétonitrile
<b>DCM</b> :	Dichlorométhane
<b>DMF</b> :	Diméthylformamide
<b>HFIP</b> :	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
<b>MeOH</b> :	Méthanol
<b>NMP</b> :	N-Méthylpirrolidinone
<b>TFE</b> :	2,2,2-Trifluoroéthanol
<b>DMSO<sub>d6</sub></b> :	Diméthylsulfoxyde deutérée

### Réactifs

<b>AcOH</b> :	Acide acétique
<b>Ac<sub>2</sub>O</b> :	Anhydride acétique
<b>Aoa</b> :	Acide aminoxy acétique
<b>DCC</b> :	N-N'-dicyclohexylcarbodiimide
<b>DIEA</b> :	Diisopropylethylamine
<b>HATU</b> :	2-(1H-7-Azabenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate*
<b>HBTU</b> :	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate*
<b>HCTU</b> :	5-chloro-2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate*

\* HBTU et HATU ont été cristallisés sous forme de sels d'aminium et non d'uronium. Ils devraient donc s'appeler respectivement N-[(1H-benzotriazol-1-yl)(diméthylamine)méthylène]-N-méthylmethanamine hexafluorophosphate N-oxide et N-[(diméthylamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-1-ylméthylène]-N-méthylmethanamine hexafluorophosphate N-oxide. Albericio et al. *Lett. Pept. Sci.* **1994**, 1, 57.

<b>HOBT</b> :	N-Hydroxybenzotriazole
<b>HOAt</b> :	N-Hydroxyazabenzotriazole
<b>TIS</b> :	Triisopropylsilane
<b>TFA</b> :	Acide trifluoroacétique
<b>Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub></b>	complexe de diméthyl amine borane
<b>PhSiH<sub>3</sub></b>	hydrure de phénylsilane
<b>(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>NCS<sub>2</sub>Na.3H<sub>2</sub>O</b>	diéthylthiocarbamate de sodium trihydrate
<b>NDMBA</b> :	acide N-diméthyl barbiturique
<b>TSA</b> :	acide thiosalicylique

## Acides aminés, résines, bras espaceurs et peptides

### Acides aminés :

<b>A</b> :	Ala :	Alanine	<b>T</b> :	Thr :	Thréonine
<b>D</b> :	Asp :	Acide aspartique	<b>V</b> :	Val :	Valine
<b>G</b> :	Gly :	Glycine	<b>W</b> :	Trp :	Tryptophane
<b>H</b> :	His :	Histidine	<b>X</b> :	Cha :	Cyclohexylalanine
<b>K</b> :	Lys :	Lysine	<b>a</b> :	D-Ala :	D-Alanine
<b>P</b> :	Pro :	Proline			
<b>R</b> :	Arg :	Arginine			
<b>S</b> :	Ser :	Sérine			

### Résines :

**PEGA** : Résine PolyéthylèneGlycolAcrylamide

**Wang** : bras 4-hydroxyméthyl-phénoxy méthyle sur une matrice styrène réticulée avec 1% de copolymères divinylbenzène

### Bras espaceurs :

**PAM** : bras espaceur Phénylacétamidométhyle

**HMPA** : bras hydroxyméthylphénoxy acétique acide

**MPPA** : bras acide méthylphénoxy propionique

### Peptides :

**MUC<sub>a</sub>** : PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA

**PADRE** : Pan DR Epitope : aKXVAAWTLKAa

## Groupes protecteurs

**Ac** : Acétyle

**All** : Allyle

**Aloc** : Allyloxycarbonyle

**Boc** : tertio-Butoxycarbonyle

**Mmt** : Methoxytrityle

**Mtt** : Methyltrityle

**Pbf** : 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyle

**tBu** : tertio-butyle

**Trt** : Trityle

## Analyses

**HPLC** : High Performance Liquid Chromatography

**Tr** : Temps de rétention

**ESI** : ElectroSpray Ionisation

**MALDI** : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

## Divers

**SPPS** : Solid Phase Peptide Synthesis

**SPCL** : Solid Phase Chemical Ligation

## MEMENTO DES DIFFERENTS COMPOSES

NOM DES COMPOSES	NUMERO	PAGE
<i>H-MUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH=NO-CH<sub>2</sub>-CO-MUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH=NO-CH<sub>2</sub>-CO-MUC<sub>a</sub>-OH</i> ou MUC <sub>a</sub> = MUC <sub>a</sub> = MUC <sub>a</sub>	<b>1</b>	74
MUC <sub>a</sub> = MUC <sub>a</sub> = MUC <sub>b</sub>	<b>1'</b>	184
<i>H-PADREMUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH=NO-CH<sub>2</sub>-CO-MUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH=NO-CH<sub>2</sub>-CO-MUC<sub>a</sub>-OH</i> ou PADREMUC <sub>a</sub> = MUC <sub>a</sub> = MUC <sub>a</sub>	<b>2</b>	74
PADREMUC <sub>a</sub> = MUC <sub>a</sub> = MUC <sub>b</sub>	<b>2'</b>	187
<i>H-MUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CHO</i>	<b>3</b>	165
<i>H-MUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></i>	<b>3'</b>	164
<i>H-AHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></i>	<b>3''</b>	116
<i>H-Aoa-MUC<sub>a</sub>=MUC<sub>a</sub>-bras-résine</i>	<b>4</b>	100
Aloc-Aoa-MUC <sub>a</sub> -NH-CH <sub>2</sub> -CHO	<b>5</b>	173
<i>H-Aoa-MUC<sub>a</sub>-bras-résine</i>	<b>6</b>	101
<i>H-Aoa-MUC<sub>b</sub>-HMPA-PEGA</i>	<b>6'</b>	181
PADRE-MUC <sub>a</sub> -NH-CH <sub>2</sub> -CHO	<b>7</b>	171
PADRE-MUC <sub>a</sub> -PAM-PEGA	<b>7'</b>	170
Aloc-AoaMUC <sub>a</sub> = MUC <sub>a</sub> = AGAG-bras-PEGA	<b>8</b>	183
<i>H-Aoa-MUC<sub>a</sub>=AGAG-bras-PEGA</i>	<b>9</b>	183
<i>H-Aoa-AGAG-bras-PEGA</i>	<b>10</b>	176
<i>H-MUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH=NO-CH<sub>2</sub>-CO-PADRE-NH<sub>2</sub> ou MUC<sub>a</sub> = PADRE</i>	<b>11</b>	76
Boc-Ala-PAM-PEGA	<b>12</b>	162
<i>H-PPAH(Trt)GVT(tBu)SAPD(tBu)T(tBu)R(Pbf)PAPGS(tBu)T(tBu)A-PAM-PEGA</i>	<b>12'</b>	115
<i>H-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-PAM-PEGA</i>	<b>12''</b>	115
Aloc-Aoa-PPAH(Trt)GVT(tBu)SAPD(tBu)T(tBu)R(Pbf)PAPGS(tBu)T(tBu)A-PAM-PEGA	<b>13</b>	173
Aloc-Aoa-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-PAM-PEGA	<b>14</b>	134
Aloc-Aoa-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH <sub>2</sub> -CH(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<b>15</b>	173
Aloc-Aoa-OH	<b>16</b>	172
HMPA-PEGA	<b>17</b>	175
<i>H-AGAG-HMPA-PEGA</i>	<b>18</b>	175
Aloc-Aoa-AGAG-HMPA-PEGA	<b>19</b>	176
Aloc-Aoa-AGAG-OH	<b>20</b>	176

<b>NOM DES COMPOSES</b>	<b>NUMERO</b>	<b>PAGE</b>
<i>H-Aoa-AGAG-OH</i>	<b>21</b>	176
Aloc-Aoa-MUC <sub>a</sub> -NH-CH <sub>2</sub> -CH=N-O-CH <sub>2</sub> -CO-AGAG-HMPA-PEGA	<b>22</b>	182
Aloc-Aoa-MUC <sub>a</sub> -NH-CH <sub>2</sub> -CH=N-O-CH <sub>2</sub> -CO-AGAG-OH	<b>23</b>	182
<i>H-Aoa-MUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH=N-O-CH<sub>2</sub>-CO-AGAG-OH</i>	<b>24</b>	183
Aloc-Aoa-MUC <sub>a</sub> =MUC <sub>a</sub> =AGAG-OH	<b>25</b>	183
Fmoc-Ala-HMPA-PEGA	<b>26</b>	177
Fmoc-Ala-MPPA-PEGA	<b>27</b>	101
Fmoc-Ala-Wang-PS commerciale	<b>28</b>	101
Fmoc-Ala-O-CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH	<b>29</b>	102
<i>H-PPAH(Trt)GVT(Trt)S(Trt)APD(OAll)T(Trt)R[bis(ω,ω')Aloc]PAPGS(Trt)T(Trt)A-HMPA-PEGA</i>	<b>30</b>	104
<i>H-PPAHGVT SAPD(OAll)TR[bis(ω,ω')-Aloc]PAPGSTA-OH</i>	<b>31</b>	105
<i>H-PPAHGVT SAPDTRPAPGSTA-HMPA-PEGA</i>	<b>32</b>	104
<i>H-G-DTR-GAGA-HMPA-PEGA</i>	<b>33</b>	177
<i>H-G-DAR-GAGA-HMPA-PEGA</i>	<b>33<sub>T-A</sub></b>	177
<i>H-G-ATR-GAGA-HMPA-PEGA</i>	<b>33<sub>D-A</sub></b>	177
<i>H-G-AAR<sub>13</sub>-GAGA-HMPA-PEGA</i>	<b>33<sub>TD-AA</sub></b>	177
<i>H-PPAH(Trt)GVT(Trt)S(Trt)APD(OAll)T(Trt)R(Pbf)]PAPGS(Trt)T(Trt)A-HMPA-PEGA</i>	<b>34</b>	108
<i>H-PPAHGVT SAPD(OAll)TRPAPGSTA-OH</i>	<b>35</b>	108
<i>H-Aoa-PPAHGVTSA-OH</i>	<b>37</b>	181
Trt-Aoa-OH	<b>38</b>	180
Trt-Aoa-PPAH(Mmt)GVT(Trt)S(Trt)A-HMPA-PEGA	<b>39</b>	181
c(Pro-Pro)	<b>40</b>	165
Ac-MUC <sub>a</sub> -NH-CH <sub>2</sub> -CH(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<b>41</b>	166
<b>APAHGVT SAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>42</b>	166
<b>GPAHGVT SAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>43</b>	166
<b>PAAHGVT SAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>44</b>	166
<b>PGAHGVT SAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>45</b>	166
<b>APPAHGVT SAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>46</b>	166

<b>NOM DES COMPOSES</b>	<b>NUMERO</b>	<b>PAGE</b>
<b>AlocPPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>47</b>	164
Aloc-Pro-OH	<b>48</b>	163
Aloc-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-PAM-PEGA	<b>49</b>	162
Aloc-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-OH	<b>50</b>	163
Aloc-APPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-OH	<b>51</b>	168
Aloc-APPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-PAM-PEGA	<b>51'</b>	168
H-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-OH	<b>52</b>	123
Aloc-PGR(Pbf)A-Wang-PS	<b>53</b>	169
Aloc-Ala-OH	<b>54</b>	168
Aloc-Aoa-MUC <sub>a</sub> =MUC <sub>b</sub> -OH	<b>55</b>	133
Aloc-Aoa-MUC <sub>a</sub> =MUC <sub>b</sub> -HMPA-PEGA	<b>56'</b>	184
H-Aoa-MUC <sub>a</sub> =MUC <sub>b</sub> -HMPA-PEGA	<b>57'</b>	185
H-Aoa-MUC <sub>a</sub> =MUC <sub>b</sub> -OH	<b>57</b>	135
MUC2(amide)	<b>58</b>	191
MUC2(oxime)	<b>59</b>	192
MUC2(cystéine)	<b>60</b>	192

## TABLE DES MATIERES

Remerciements	
Publications, Communications et Encadrements d'étudiants	1
Abréviations	2
Mémento des composés synthétisés	4
<b>SOMMAIRE</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>11</b>
<b>GENERALITES</b>	<b>14</b>
MUC1 et les cancers épithéliaux	15
MUC1 et la vaccination thérapeutique anti-tumorale	17
Objectif de la thèse	19
Rappels succincts de la SPPS	20
<b>I. LA LIGATION CHIMIQUE</b>	<b>22</b>
Introduction	22
I. 1. La ligation chimique native ou NCL (native chemical ligation)	24
I. 1. 1. via un peptide thioester.	24
notion sur l'Express Protein Ligation (EPL) voir EPL MUIR	24
I. 1. 2. via la réaction de Staudinger.	27
I. 2. La ligation chimique non native	28
I. 2. 1. La ligation thioéther et thioester	28
I. 2. 2. La ligation thiazolidine et thiaprolin	29
I. 2. 3. La ligation triazole :la chimie« Click » cycloaddition	31
I. 2. 4. La ligation Oxime et hydrazone	32
Conclusion	34
<b>II.LA LIAISON ETHER-OXIME</b>	<b>35</b>
Mécanisme de formation de la liaison éther-oxime	35
II. 1. Introduction de la fonction aldéhyde ou cétone du côté C-terminal	36
II. 1. 1. Introduction de la fonction méthylène aldéhyde du côté C-terminal	37
II. 1. 1. 1. Oxydation d'un diol	37
II. 1. 1. 2. Oxydation du bras BAL	38
II. 1. 1. 3. Par déplacement nucléophile	39
II. 1. 2. Introduction de la fonction $\alpha$ -oxo-aldéhyde du côté C-terminal	40
II. 1. 2. 1. Oxydation d'un 2-amino-alcool	40
II. 1. 2. 2. Utilisation du linker IPT	40
II. 1. 3. Introduction de la fonction cétone du côté C-terminal	41
II.2. Introduction de la fonction aminoxy uniquement du côté N-Terminal	42
II. 2. 1. par acylation	43
II. 2. 2. par déplacement nucléophile	44

II.3. Réactivité des peptides	44
II. 3. 1. Réactivité des peptides possédant la fonction carbonyle	44
II. 3. 2. Réactivité du peptide aminoxy	45
II. 3. 3. Cinétique de ligation éther-oxime	45
Conclusion	47
<b>III. LA MULTILIGATION: VERS LES EDIFICES MACROMOLECULAIRES</b>	<b>48</b>
Notion d'orthogonalité	48
III.1. Multiligation en solution	52
III.1. 1. La multiligation avec des liaisons de même type	52
III.1. 2. La multiligation avec des liaisons de différents types (mixtes)	56
III.1. 3. La multiligation pour la synthèse de dendrimères	59
III. 1. 3. 1. Les MAP	60
III. 1. 3. 2. Les TASP	61
III. 1. 3. 3. Les CAT	62
III.2. En solution et sur support solide	63
III.3. Multiligation sur support solide	64
Conclusion	71
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>72</b>
I. Rappel des objectifs et modèle biologique	73
II. Stratégie générale de synthèse	74
III. Validation de la stratégie polyoxime sur support solide	76
III. 1. Etude de la stabilité de la liaison oxime en milieu acide	76
III. 2. Vers la synthèse de Aloc-AoaMUC <sub>a</sub> = MUC <sub>a</sub> = AGAG-bras-PEGA <b>8</b>	79
III. 2. 1. Synthèse du fragment médian <b>5</b>	80
III. 2. 2. Synthèse du peptide résine C-terminal <b>10</b>	84
III. 2. 2. 1. Synthèse de Aloc-Aoa-AGAG-HMPA-PEGA <b>19</b>	84
III. 2. 2. 2. Etude du phénomène de bis-acylation	86
III. 2. 2. 3. Obtention de H-Aoa-AGAG-HMPA-PEGA <b>10</b>	92
III. 2. 3. Multiligations sur support solide	96
III. 2. 3. 1. Première ligation: obtention du peptide résine <b>22</b>	96
III. 2. 3. 2. Elimination du groupe Aloc après la première ligation oxime: obtention de <b>9</b>	97
III. 2. 3. 3. Seconde ligation et obtention du peptide-résine <b>8</b>	98
Conclusion	99
IV. Vers la synthèse de MUC <sub>a</sub> = MUC <sub>a</sub> = MUC <sub>a</sub> <b>1</b> et PADREMUC <sub>a</sub> = MUC <sub>a</sub> = MUC <sub>a</sub> <b>2</b>	100
IV. 1 Synthèse du fragment C-terminal H-Aoa-MUC <sub>a</sub> -HMPA-PEGA <b>6</b> .	101
IV. 1. 1. Préparation des acides aminés-résines <b>26, 27</b> et <b>28</b>	102
IV. 1. 2. Etude de la stabilité des bras p-alkoxybenzyl alcool en solution diluée de TFA	102
IV. 1. 3. Choix des groupements protecteurs des chaînes latérales de MUC <sub>a</sub>	104
Conclusion.	111
IV. 2. Synthèse des molécules 1' et 2'	111
IV. 2. 1. Synthèse du peptide C-terminal H-Aoa-MUC <sub>b</sub> -HMPA-PEGA <b>6'</b>	114
IV. 2. 2. Synthèse des fragments N-terminaux <b>3</b> et <b>7</b>	115
IV. 2. 2. 1. Etude de l'élimination du groupe Aloc de <b>47</b>	121

IV. 2. 2. 2. Modèle d'étude pour l'élimination de Aloc en milieu polaire: le peptide résine <b>49</b>	123
IV. 2. 2. 3. Modèle d'étude pour l'élimination de Aloc en milieu polaire: le peptide résine <b>53</b>	129
Conclusion	130
IV. 2. 3 Synthèse du composé PADRE-MUC <sub>a</sub> -NH-CH <sub>2</sub> -CHO <b>7</b>	131
IV. 2. 4. Synthèse de <b>1'</b>	132
IV. 2. 5. Synthèse de <b>2'</b>	137
Conclusion générale	138
V. GLYCOSYLATION	140
Introduction	140
V. 1. Les différentes enzymes utilisées pour la glycosylation Les glycosyltransférases de type Leloir	140 141
V. 2. Exemples de glycosylation enzymatique	143
V. 3. Etude de la glycosylation	144
V. 3. 1. Détermination du nombre de sucre incorporé sur les monomères	146
V. 3. 2. Influence d'une liaison oxime au niveau du squelette peptidique	148
Conclusion de l'étude sur la glycosylation	151
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>152</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>	<b>155</b>
<b>I. Méthodes générales</b>	<b>156</b>
<b>II. Mode opératoire des composés synthétisés</b>	<b>161</b>
II. 1. Synthèse des fragments N-terminaux <b>3</b> et <b>7</b>	161
II. 1. 1. H-MUC <sub>a</sub> -NH-CH <sub>2</sub> -CHO <b>3</b>	161
II. 1. 1. 1. Composés synthétisés au cours de l'étude sur la formation de la DKP	165
II. 1. 1. 2. Composés synthétisés au cours de l'étude sur la déprotection du groupement Aloc	167
II. 1. 2. Synthèse du fragment PADREMUC <sub>a</sub> -NH-CH <sub>2</sub> -CHO <b>7</b>	170
II. 2. Synthèse du fragment médian Aloc-Aoa-MUC <sub>a</sub> -NH-CH <sub>2</sub> -CHO <b>5</b>	172
II. 3. Synthèse du fragment C-terminal	174
II. 3. 1. Etudes préliminaires	174
II. 3. 2. Synthèse de H-Aoa-MUC <sub>b</sub> -HMPA-PEGA <b>6'</b>	179
<b>III. Multiligations oxime</b>	<b>182</b>
III. 1. Etude préliminaire: synthèse du composé <b>25</b>	182
III. 2. Synthèse de <b>1'</b>	184
III. 3. Synthèse de <b>2'</b>	187
<b>IV. Glycosylation</b>	<b>188</b>
IV.1. Mode opératoire pour la glycosylation	188

IV. 2. Synthèse des monomères	189
IV. 3. Synthèse des dimères	191
IV. 4. Analyse des composés dimères glycosylés par LC/MS	193
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>194</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>220</b>
Annexe 1	221
Annexe 2	226

## **INTRODUCTION**

## **INTRODUCTION**

Les chiffres sont éloquentes : le cancer est la deuxième cause de mortalité en France derrière les affections cardiovasculaires, soit environ 28 % des décès ; la première chez les personnes jeunes et actives puisqu'il représente 37 % des décès prématurés, loin devant les accidents et les suicides. Le cancer tue dans notre pays 150 000 personnes chaque année, soit 400 décès chaque jour. Il est responsable d'un décès sur trois chez l'homme et d'un sur quatre chez la femme. Selon le rapport de la Commission d'orientation sur le cancer (janvier 2003), la France a le taux de mortalité prématurée le plus élevé d'Europe due au cancer, c'est-à-dire avant 65 ans, supérieur de 20 % au reste de l'Europe. Maladie intime de la vie, le cancer représente donc une urgence thérapeutique et malgré les réels progrès opérés au sein des thérapies combinées (chirurgie assistée par ordinateur, chimiothérapie dérivant de nouvelles substances naturelles ou de molécules totalement synthétisées et radiothérapie comme la neutronthérapie), il progresse au rythme de l'accroissement de notre longévité. Comprendre les mécanismes de cancérisation pour imaginer les thérapies de demain s'avère donc indispensable pour élaborer de nouvelles stratégies plus efficaces et mieux tolérées par l'organisme. Une évolution prometteuse vise, en outre, à étendre la recherche de molécules anticancéreuses au domaine des macromolécules du monde vivant, les protéines en particulier, susceptible de stimuler le système immunitaire afin de déclencher et/ou d'amplifier une réponse contre les gènes anti-tumoraux. La connaissance de ces antigènes spécifiques liés aux tumeurs a permis le développement de vaccins thérapeutiques composés non plus de cellules tumorales inactivées mais directement de ces antigènes.

La glycoprotéine MUC1 est un bon candidat pour une thérapie vaccinale anti-cancéreuse. En effet, elle est surexprimée à la surface des cellules cancéreuses et plusieurs antigènes tumoraux ont été identifiés, ces déterminants étant à la fois de type saccharidiques et peptidiques.

Depuis la découverte de l'immunogénicité de peptides synthétiques, de nombreuses recherches se sont portées sur la préparation de vaccins à base de peptides synthétiques. De tels vaccins présentent l'avantage par rapport aux formulations classiques d'être bon marché, facile à préparer et de présenter une très

bonne innocuité pour l'organisme. Les peptides sont cependant de faibles immunogènes en raison notamment de leur taille. En effet, la machinerie immunitaire semblerait être sensible à la géométrie spatiale et la longueur de l'antigène introduit ainsi qu'à des cofacteurs de stimulation ; d'où la nécessité de trouver des formulations plus performantes permettant d'arriver à une taille « critique décelable ».

La synthèse totale de telles biomacromolécules n'en est encore qu'à ses balbutiements, le verrou technologique principal reposant sur leur polyfonctionnalité. Toutefois, les avancées récentes dans le domaine de la ligation chimiosélective de glycopeptides, ont ouvert un éventail de nouvelles possibilités. La combinaison de compétences en glycochimie et synthèse peptidique avec les outils modernes de ligation promet un accès rapide et très modulaire à des petites chimiothèques de glycoformes de fragments de mucines humaines longs d'une centaine d'acides aminés. L'objectif de cette thèse a donc été la mise au point de la synthèse d'analogues linéaires peptidiques, constructions préalables à l'élaboration de chimères glycoprotéiques capables d'induire une réponse immunitaire efficace et spécifique contre MUC1 tumorale.

Nous décrivons dans un premier temps l'intérêt de MUC1 comme modèle pour le développement d'une approche immunothérapeutique active. Puis nous étudierons les outils chimiques nécessaires à la synthèse d'une telle construction. La multiligation chimique semble en particulier être une méthode de choix pour la synthèse de longs peptides.

Sera ensuite présenté le travail réalisé dans cette thèse qui a été la mise au point d'analogues non glycosylés par multiligation chimique oxime sur support solide. Une étude préliminaire sur des chimères glycosylées par voie enzymatique a été menée parallèlement et les résultats permettent d'envisager l'accès à ces analogues glycoprotéiques de MUC1 par voie chimio-enzymatique.

## **GENERALITES**

## **MUC1 et les cancers épithéliaux**

L'antigène tumoral que nous proposons d'utiliser pour induire une réponse immunitaire humorale et/ou cellulaire est la glycoprotéine MUC1 encore appelée épisialine (Ligtenberg *et al.* 1990 ; Gendler et Spicer, 1995). Cette protéine fait partie de la classe des mucines ; elle a été identifiée pour la première fois dans le lait maternel (Shimizu et Yamauchi. 1982) et c'est la première mucine dont le gène a été séquencé (Gendler *et al.* 1990 ; Lan *et al.* 1990 ; Ligtenberg *et al.* 1990 ; Wreschner *et al.* 1990)). Elle est caractérisée par la présence d'un grand nombre de glycanes liés aux sérines et thréonines de leur chaîne peptidique (jusqu'à 90% du poids moléculaire). Les mucines peuvent être membranaires ou sécrétées. Dans les deux cas, elles recouvrent la membrane plasmique et tapissent les muqueuses. La partie extracellulaire est composée d'unités de répétition de 20 acides aminés (PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA). Cette unité peptidique hautement conservée est répétée entre 25 et 100 fois. Le squelette peptidique est recouvert d'une forte densité de glycanes, ce qui lui confère de bonnes capacités de rétention d'eau à la surface des épithelia, empêchant ainsi la déshydratation des tissus. Leur grande viscosité en fait aussi des agents de protection efficaces contre les agressions mécaniques, chimiques et microbiennes (Porchet *et al.* 1991 ; Gum. 1995). Elles représentent donc la première barrière opposée par les cellules à leur environnement externe et c'est ce qui en fait des cibles privilégiées de la réponse immunitaire. Comme c'est également le cas pour d'autres mucines, le taux d'expression de MUC1 à la surface des cellules épithéliales augmente considérablement lors de la transformation maligne ; de plus, dotée d'une disposition essentiellement apicale dans le tissu épithélial normal, MUC1 s'étend à tout le pourtour de la cellule dans les tissus cancéreux (Gendler et Spicer, 1995). Enfin, la glycosylation de MUC1 change considérablement au cours de la transformation : elle est fortement réduite dans les tissus cancéreux (Burchell *et al.* 1987) ce qui engendre l'apparition d'antigènes normalement cryptiques comme des portions de chaînes peptidiques mises à nu et des glycanes du cœur oligosaccharidique qui sont habituellement coiffés par d'autres motifs glycosidiques. Ainsi, cette sous-glycosylation tumorale rend accessible au système immunitaire non seulement les épitopes saccharidiques (antigènes Tn, T), mais aussi les épitopes peptidiques associés (Hanisch *et al.* 1996). MUC1 se rencontre dans beaucoup de tissus et l'unité peptidique répétitive (20 acides aminés) trouvée dans les tissus normaux peut porter 6 chaînes glycaniques de longueur variable allant généralement de

4 à 15 résidus osidiques. Dans les cellules cancéreuses où MUC1 est notoirement modifiée (glandes mammaires, pancréas, côlon, ovaire), le nombre de glycanes par unité peptidique est réduit à 3 ou 4 et ces chaînes sont elles-mêmes réduites à 1, 2 ou 3 oses qui sont : les antigènes Tn ( $\text{GalNAc}\alpha 1\text{-O-Ser/Thr}$ ) / Sialyl-Tn, STn ( $\text{NeuAc}\alpha 2\text{-6GalNAc}\alpha 1\text{-O-Ser/Thr}$ ) / Sialyl-STn et T[ $\text{Gal}\beta 1\text{-3GalNAc}\alpha 1\text{-O-Ser/Thr}$  / Sialyl-T (Springer, 1984)). Les antigènes tumoraux associés à MUC1 sont donc composés d'épitopes peptidiques et glycopeptidiques avec 1, 2 ou 3 oses (Figure 1).

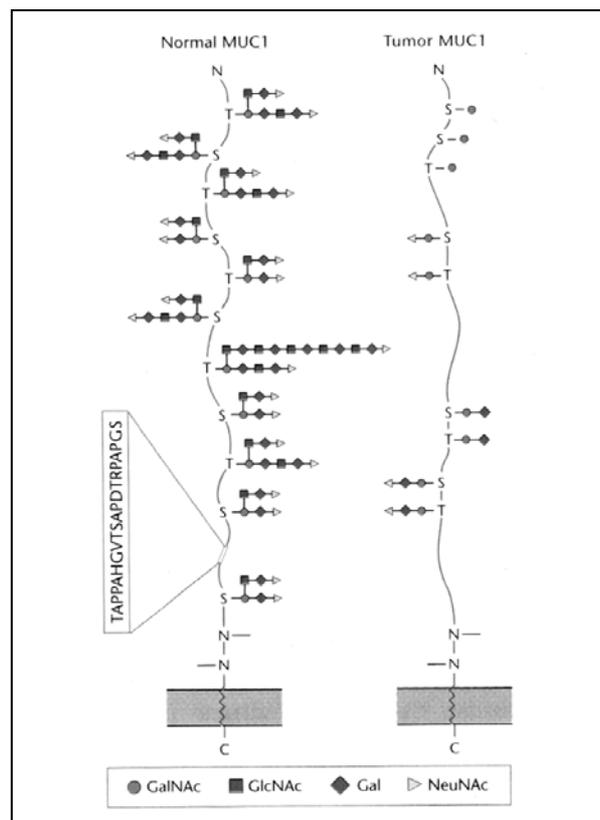


Figure 1: MUC1 normal (à gauche) et cancéreux (à droite), Houghton et Lloyd, 1998.

Ces propriétés font de MUC1 un excellent modèle pour développer de nouveaux immunogènes comme candidats vaccins dans le cadre d'une vaccination thérapeutique.

## **MUC1 et la vaccination thérapeutique anti-tumorale**

De nombreux essais de vaccination thérapeutique ont été effectués avec MUC1, soit sous la forme de la glycoprotéine naturelle isolée de tissus de patients atteints de cancers, soit sous la forme de protéines recombinantes, soit enfin sous forme de peptides de synthèse plus ou moins longs totalement dépourvus de glycanes (Houghton et Lloyd. 1998). Ces essais ont permis de constater que MUC1 est immunogène chez la souris, provoquant une réponse humorale et cytotoxique. Mais, injectée chez l'homme, MUC1 non-glycosylée provoque une immunosuppression (Gimmi *et al.* 1996) qui peut cependant être levée par l'IL-2 (Agrawal *et al.* 1998). De plus, les peptides de MUC1 injectés chez l'homme réagissent avec des anticorps naturels qui présentent une réactivité croisée avec ces peptides (Apostolopoulos *et al.* 1998). Cela aboutit aussi à un affaiblissement du potentiel immunogène de l'antigène MUC1, car il n'y a plus alors qu'une réponse humorale chez les patients ainsi vaccinés. Il a cependant été remarqué qu'une seule unité répétitive du peptide MUC1 n'était pas immunogène mais associée à la KLH (Keyhole Limpet Hémocyanine = hémocyanine de patelle) ou à l'adjuvant DETOX™, elle était capable d'induire une réponse cytotoxique chez des patientes atteintes de cancer du sein (Reddish *et al.* 1998). Ces résultats montrent que l'adjonction d'un adjuvant et l'exposition artificielle du peptide immunogène MUC1 peuvent améliorer la réponse immunitaire. Cependant l'emploi de transporteurs hautement immunogènes tels que la KLH engendre des réponses immunitaires indésirables.

Un consensus se dégage sur le fait que l'épitope tumoral le plus efficace serait glycopeptidique (Hanisch *et al.* 1996 ; Keil *et al.* 2001 ; Kagan *et al.* 2005). Or, très peu d'exemples de constructions d'immunogènes possédant des déterminants glycopeptidiques ont été décrites (krasten *et al.* 2004) en comparaison de celles basées sur des déterminants saccharidiques (Ouerfelli *et al.* 2005 ; Freire *et al.* 2006 ; Liakatos *et al.* 2007). Ceci est corrélé à la difficulté d'obtention de glycoprotéines homogènes par synthèse chimique ou biologie moléculaire. La synthèse par voie chimique des glycopeptides est difficile et nécessite la préparation longue ou l'achat coûteux des synthons Fmoc-Ser(Ac<sub>3</sub>AcNH- $\alpha$ -Gal)-OH et Fmoc-Thr(Ac<sub>3</sub>AcNH- $\alpha$ -Gal)-OH correctement protégés.

De plus, la synthèse par voie récurrente de telles protéines ou glycopeptides permet difficilement d'obtenir des produits purs avec de bons rendements. La synthèse convergente fondée sur le couplage de fragments peptidiques protégés, donc très hydrophobes, est limitée par leur mauvaise solubilité. Dans ce contexte, il est important de développer de nouvelles stratégies de synthèse. La ligation chimique, méthodologie en chimie des peptides, permet de condenser de façon chimiosélective des fragments peptidiques non protégés, donc hydrophiles, et préalablement purifiés (Walker. 1997). Les méthodes impliquées dans la synthèse chimiosélective de peptides déprotégés produisent principalement des liaisons oxime, hydrazone, thioester, thiazolidine ou amides au point de ligation (Shao et Tam. 1995; Tam et Spetzler. 1995).

Deux équipes seulement, dont la nôtre, ont combinées partiellement ces approches et ont obtenus des résultats prometteurs avec des constructions modulaires synthétisées *via* trois ligations successives oxime (Cremer *et al.* 2006) ou native (Ingale *et al.* 2007). Si l'équipe de Boons a combiné au sein de la même macromolécule un épitope T auxiliaire, un immunostimulant ligand du TLR9 à un épitope B décapeptidique portant une seule entité sucre (Lo-Man *et al.* 2001), notre équipe a associé trois épitopes B icosapeptidiques combinant des épitopes saccharidiques Tn et/ou T à un épitope T auxiliaire (Kuduk *et al.* 2004).

Une autre approche proposée par Clausen *et al.* (1996 ; Sorensen *et al.* 2006) propose d'incorporer par voie enzymatique contrôlée les résidus GalNAc à l'aide d'une polypeptide  $\alpha$ GalNAc transférase recombinante. En effet, depuis une décennie, des glycosyltransférases dotées de propriétés cinétiques et spécifiques à un substrat ont permis la synthèse enzymatique contrôlée de glycopeptides (Wandall *et al.* 1997; Bennett *et al.* 1998). Cette alternative pourrait être utilisée au laboratoire pour développer une méthodologie conduisant à des analogues de MUC1.

## Objectif de la thèse

Ainsi, nous nous proposons de synthétiser par voie chimio-enzymatique des glycoprotéines artificielles immunogènes comportant des antigènes spécifiques de tumeurs ainsi que des signaux de co-stimulation. Ces petites glycoprotéines synthétiques, bien que calquées sur des glycoprotéines naturelles, seront élaborées dans le but d'étudier différentes présentations des antigènes pour optimiser leur immunogénicité.

Dans un premier temps, nous couplerons, sur support solide, les différents monomères par ligation chimique via une liaison oxime (-HC=N-O-CH<sub>2</sub>-) obtenue par réaction entre un partenaire aldéhyde et un partenaire amino-oxy. Cette liaison oxime est compatible avec l'induction d'une réponse immune humorale (Rose *et al.* 1995) et cellulaire (Nardin *et al.* 1998) à partir de protéines artificielles. Les unités de répétition seront synthétisées en phase solide et on pourrait envisager la protection de l'amino-oxy par un groupement Alloc dont la déprotection est compatible avec la présence d'ose sur un peptide (Guibé. 1998).

Dans un second temps, une étude préliminaire de glycosylation enzymatique catalysée par une polypeptide  $\alpha$ GalNAc transférase T1 recombinante, capable d'ajouter un résidu GalNAc sur la thréonine sera réalisée sur deux monomères de MUC1 et deux analogues du dimère natif MUC2(amide). Cela nous permettra de déterminer le nombre de sucre incorporé ainsi d'étudier l'influence d'une modification du squelette peptidique sur le taux de glycosylation.

En outre, il est reconnu que pour améliorer l'efficacité de la réponse immune de type anticorps ou T cytotoxique, l'ajout d'un épitope T auxiliaire dit universel, c'est-à-dire capable de se lier à de nombreux allèles, augmente la réponse immunitaire. Nous disposons, au moyen des stratégies de synthèse proposées, de plusieurs possibilités pour introduire aisément des épitopes T à des endroits différents des polymères produits. Dans les structures linéaires, l'épitope T auxiliaire PADRE (PAN DR Epitope) a été choisi et il sera introduit du côté N- terminal.

## Rappels succincts de la SPSS

Grâce aux avancées réalisées au cours du siècle dernier en synthèse peptidique, la synthèse chimique de protéines est aujourd'hui possible. L'un des développements les plus remarquables est la synthèse sur support solide (SPSS) introduite par Merrifield pour la synthèse d'un tetrapeptide (Merrifield. 1963). Le principe, illustré par la figure ci-dessous, consiste à allonger de façon récurrente la chaîne polypeptidique par son extrémité N-terminale. Les chaînes latérales réactives des acides aminés sont bloquées par des groupements stables tout au long de la synthèse et la fonction  $\alpha\text{-NH}_2$  est protégée par un groupe spécifiquement labile. Après couplage de l'acide aminé, la fonction  $\alpha\text{-NH}_2$  est déprotégée. L'acide aminé suivant est couplé sur l'aminoacyl-résine par activation préalable ou in situ de sa fonction  $\alpha$ -carboxylique. Ce cycle de déprotection et de couplage est répété avec chaque acide aminé incorporé dans la chaîne peptidique. A la fin de l'élongation, les fonctions latérales sont déprotégées simultanément au décrochage du peptide de la résine. Cette technique efficace permet ainsi l'obtention rapide de peptides (Figure 2).

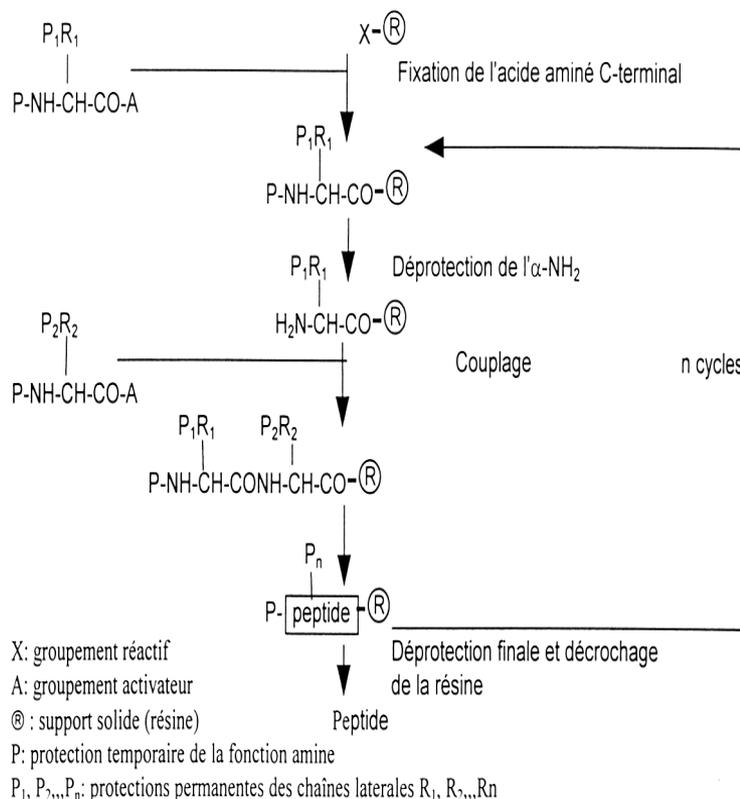


Figure 2: Schéma général de la synthèse peptidique sur support solide.

Actuellement, la synthèse de peptides est généralement réalisée par cette méthodologie qui a été rapidement automatisée. Il existe deux stratégies de synthèse sur support solide qui se différencient par le groupe protecteur de la fonction  $\alpha\text{-NH}_2$  : la stratégie Boc utilisant le tert-butyloxycarbonyle comme protection acido-labile et la stratégie Fmoc faisant appel au 9-fluorénylméthoxycarbonyle. Ce groupement est déprotégé en milieu basique (pipéridine à 20% dans la N-méthyl-2-pyrrolidone, NMP) par  $\beta$ -élimination. Le produit de la réaction, le dibenzofulvène, réagit avec la pipéridine pour former un composé dosable ( $\epsilon=7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  par spectrophotométrie UV à 301nm (Meienhofer *et al.* 1979) (figure 3).

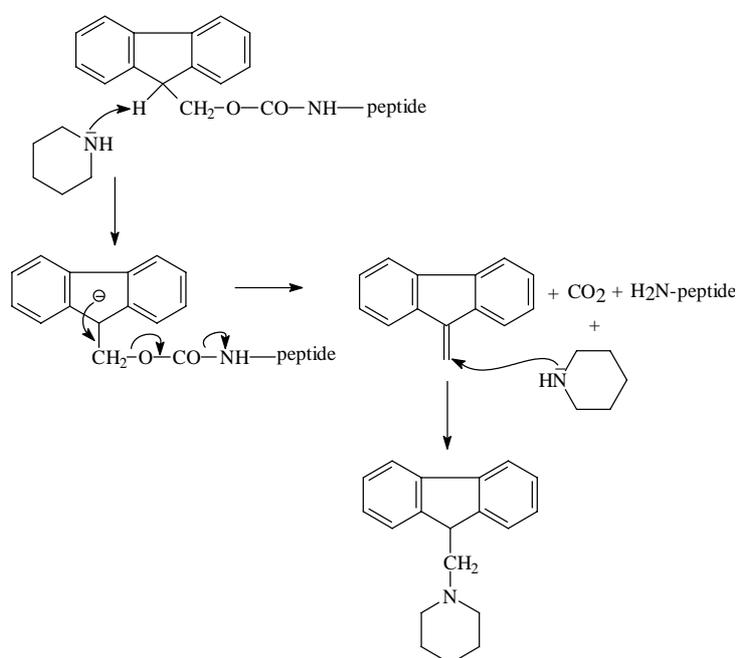


Figure 3: Réaction de formation de l'adduit fluorénylméthyl-pipéridine.

Le développement de nouvelles résines (Meldal, 1997), de nouveaux agents de couplages (Han et Kim. 2004), de nouveaux groupes protecteurs (Albericio. 2000) et de nouveaux bras ont augmenté l'efficacité de la SPPS et permis d'accéder à la préparation de peptides contenant plusieurs dizaine d'acides-aminés. Cependant, des difficultés subsistent (réaction secondaires, phénomènes d'agrégation, séquences difficiles, etc...) et la préparation de peptides de taille importante (supérieure à 50 acides aminés) et de protéines demande une optimisation au cas par cas et ne peut donc pas être réalisée en routine.

Une solution réside dans la synthèse convergente. Elle consiste à condenser par une liaison amide deux fragments peptidiques protégés ou partiellement déprotégés en solution ou sur support solide. L'avantage de cette méthode est que chaque fragment de la protéine est synthétisé, caractérisé et purifié. Les effets négatifs et cumulatifs de la synthèse pas à pas sont alors minimisés. Ainsi, la GFP (Green Fluorescent Protein formés de 238 résidus) a ainsi été synthétisée en solution à partir de 26 fragments synthétisés sur support solide (Nishiuchi *et al.* 1998). La stratégie convergente est également couramment utilisée dans le milieu industriel [a) Bray *et al.* 2004 ; b) Bruckdorfer *et al.* 2004]. Cependant, plusieurs inconvénients et notamment la difficulté de purifier les fragments protégés qui sont faiblement solubles dans les solvants aqueux classiques utilisés en chromatographie liquide, limitent cette approche. De plus, la cinétique de réaction est significativement réduite comparée à l'activation des acides aminés en synthèse peptidique pas à pas. Il en suit un temps de couplage souvent plus important afin d'augmenter l'efficacité de la réaction. Enfin, une racémisation au niveau du site de couplage, limite les déconvolutions des peptides à des glycines et des prolines en position C-terminale (Borgia et Fields. 2000) rendant ainsi cette stratégie laborieuse.

## **I. LA LIGATION CHIMIQUE**

### **Introduction**

Une avancée majeure, pour la synthèse de peptides supérieure à 50 résidus proposée par Schnölzer et Kent en 1992 (Science) a été d'utiliser la ligation chimique. Elle consiste à condenser en milieu aqueux et de façon chimio-sélective des fragments peptidiques non protégés spécifiquement fonctionnalisés (Muir. 1995) (figure 4). Il s'agit toujours d'une stratégie convergente mais elle est appliquée à des fragments déprotégés.

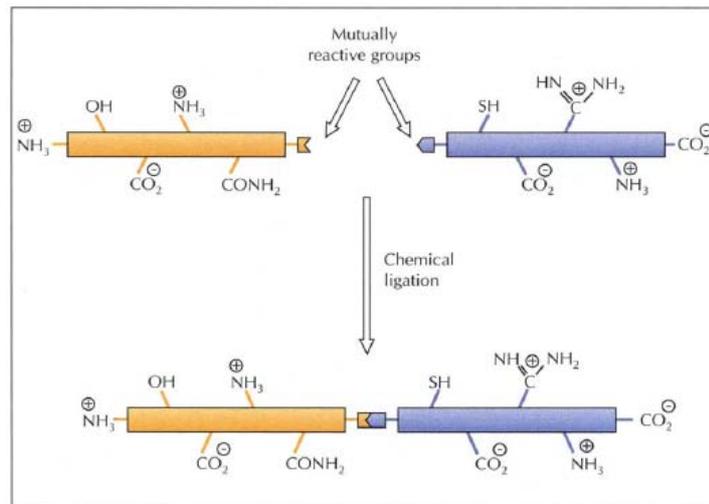


Figure 4 : Principe de la ligation chimique (d'après Muir)

La ligation chimiosélective peut-être divisée en deux classes : les ligations non-natives et les ligations avec transfert d'acyle. Les ligations non-natives comme les liaisons hydrazone, oxime, thioester ou thioéther ont la particularité d'avoir une réactivité unique qui est absente des protéines. Les réactions de transfert d'acyle comme la capture de thiol antérieur, la ligation de type pseudo-proline, la ligation native ou la ligation de Staudinger se produisent en général par une réaction de ligation suivie d'un transfert d'acyle intramoléculaire (Coltart. 2000) pour former une liaison amide.

Cette nouvelle méthode a donc connu de nombreux développements et a permis de nombreux succès dans la synthèse totale ou la semi-synthèse de protéines [a) Dawson et Kent. 2000; b) Nilsson et al. 2005] ou de glycoprotéines (Hang et Bertozzi. 2001) de taille de plus en plus importante (Figure 5).

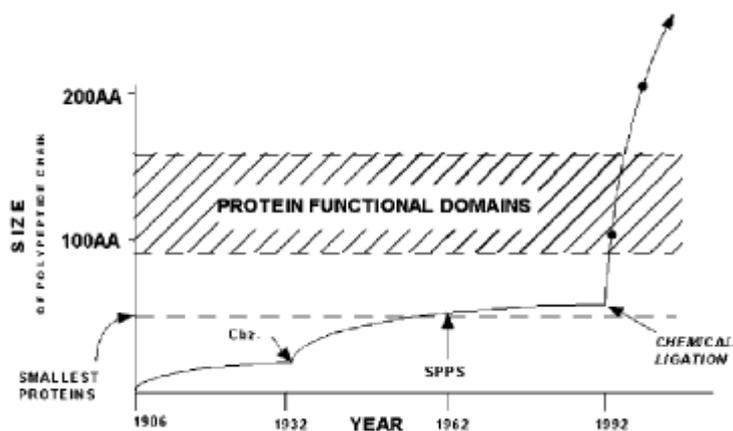


Figure 5 : Evolution de la taille des peptides et protéines accessibles par synthèse chimique (Dawson et Kent)

## I. 1. La ligation par transfert d'acyle ou NCL (Native Chemical Ligation)

### I. 1. 1. via un peptide thioester

La ligation chimique native génère une liaison amide (figure 6) (Dawson *et al.* 1994) au site de ligation. Cette stratégie repose sur la labilité de la liaison thioester et sa capacité d'acylation intramoléculaire. Elle consiste en un échange intermoléculaire entre un thioester situé en position C-terminale d'un peptide et le thiol d'une cystéine situé en position N-terminale d'un autre peptide suivie d'un réarrangement intramoléculaire par transfert d'acyle.

Le premier exemple d'utilisation de cette ligation pour la synthèse d'une protéine est la synthèse de l'interleukin 8, une protéine de 72 acides aminés, obtenue par ligation entre le fragment 1-33 (peptide 1) et le fragment 34-72 (peptide 2).

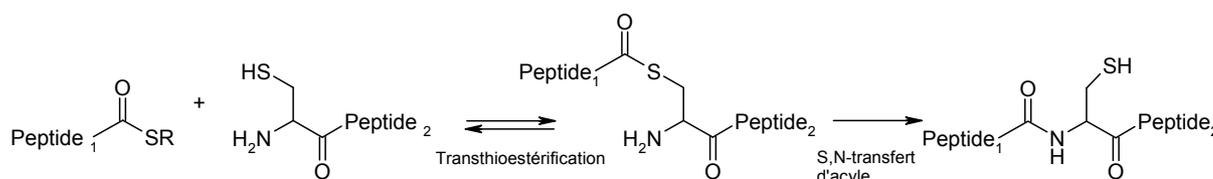


Figure 6: Ligation native via un peptide thioester (d'après Dawson *et al.*)

### Notion sur l'Express Protein Ligation (EPL)

L'«expressed protein ligation» est une extension de cette méthodologie pour préparer des protéines de plusieurs milliers de daltons (David *et al.* 2004 ; Hahn *et al.* 2005). Elle consiste à synthétiser l'un des fragments (généralement le fragment thioester) ou les 2 par biologie moléculaire. La synthèse recombinante du peptide thioester est basée sur l'utilisation des « inteins ». Les « inteins » sont des fragments internes de précurseurs de protéines capables de catalyser leur excision et la ligation entre les deux fragments adjacents selon un mécanisme intramoléculaire appelé « protein splicing ». Ce mécanisme implique la formation d'un thioester entre le fragment adjacent situé côté N-terminal et l'« intein ». L'obtention d'un peptide thioester par synthèse recombinante consiste donc à faire exprimer la protéine d'intérêt sous forme d'une protéine de fusion avec une « intein » mutée. La mutation permet de stopper le mécanisme de « splicing » à la formation du thioester intermédiaire. La

protéine d'intérêt est ensuite séparée de l'«intein» par transthioestérification et peut alors réagir avec un peptide cystéinylé en position N-terminale selon le mécanisme de ligation native (figure 7). Les deux dernières étapes de transthioestérification et de ligation ont lieu simultanément.

L'intérêt de cette ligation est qu'elle permet la ligation entre un peptide synthétique limité en taille comme un acide aminé non naturel, une sonde fluorescente, etc...et un peptide ou une protéine de taille beaucoup plus importante.

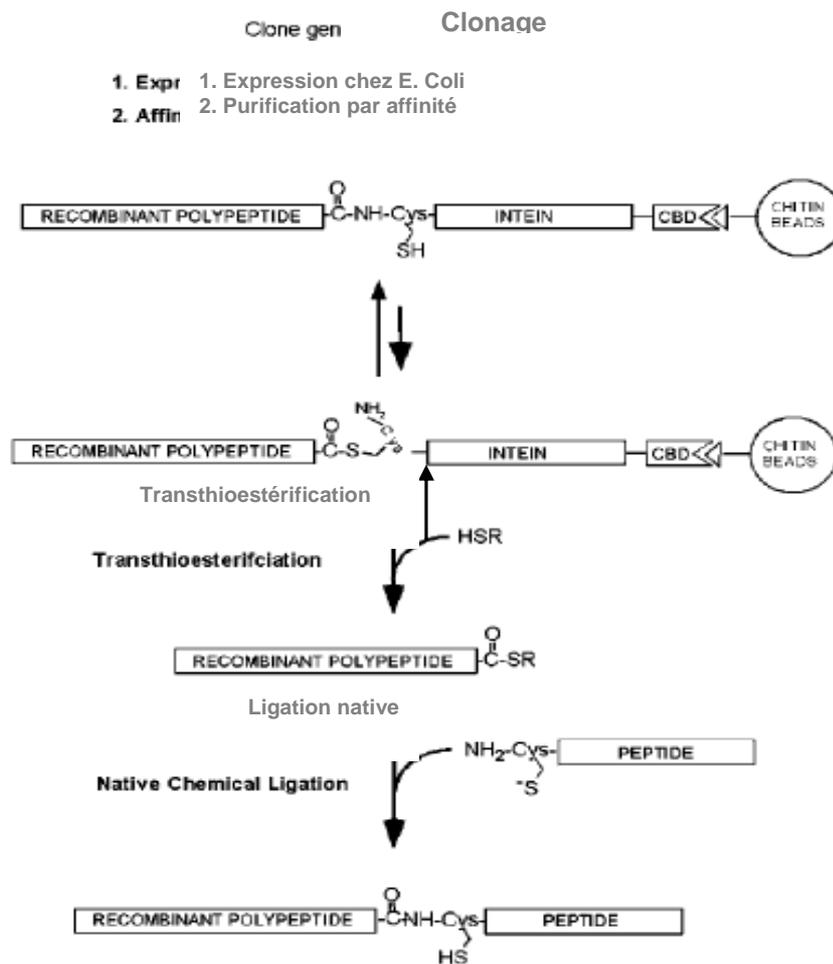


Figure 7: Expressed protein ligation (d'après Dawson et Kent)

Les principales limitations de ces approches concernent :

- La présence d'une cystéine au site de ligation. Une étude menée par McCaldon et Argos (1988) (Figure 8) sur la fréquence des acides aminés dans la structure primaire

de 1021 protéines synthétiques indépendantes, a révélée un très faible pourcentage de cystéine (1,7%) au niveau du site de jonction.

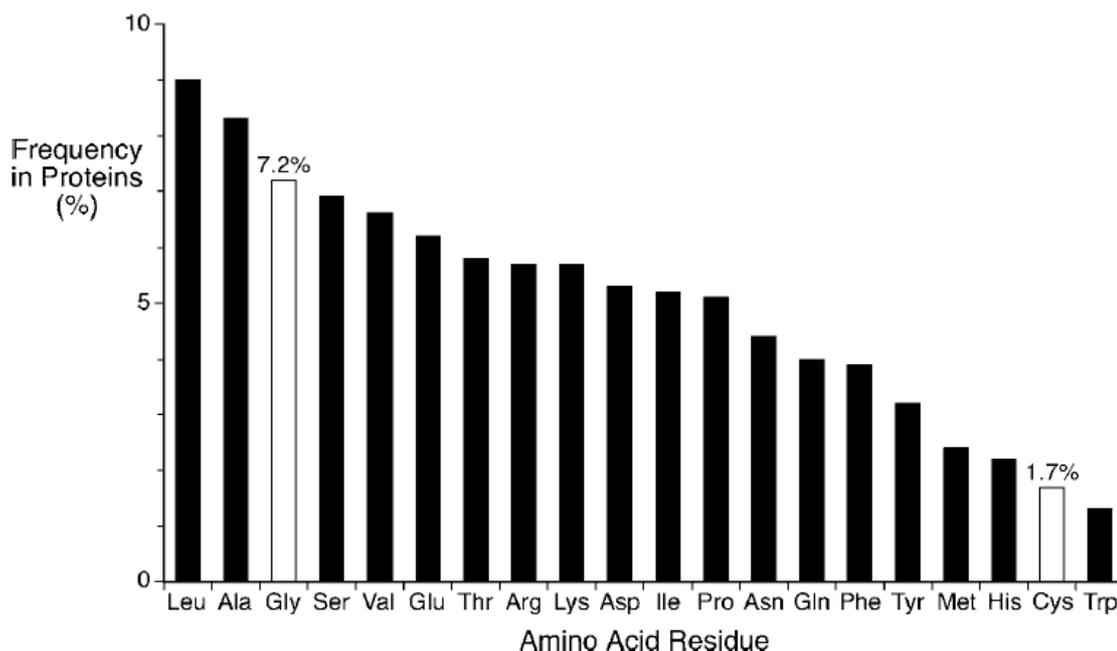


Figure 8: Fréquence des acides aminés dans la structure primaire de 1021 protéines synthétiques indépendantes (McCaldon et Argos)

- La production de peptides thioester qui sont principalement préparés en stratégie Boc en raison de l'instabilité de cette fonction en présence de nucléophiles habituellement utilisés en stratégie Fmoc (Wieland *et al.* 1956). De nombreuses équipes ont essayé de développer des méthodologies en par stratégie Fmoc mais les résultats ne sont pas probants (Revue de Muir). Actuellement, plus d'une dizaine de méthodes concernant la préparation de peptide thioester en stratégie Fmoc sont décrites dans la littérature mais aucune n'est applicable à tous les acides aminés existants dans les protéines.
- La grande réactivité du thiolate de la cystéine à former une liaison disulfure, à réagir avec l'oxygène gazeux où avec des électrophiles (Schneider *et al.* 1968). En outre, une réaction de  $\beta$  élimination catalysée en milieu basique peut conduire à la formation de déhydroalanine et entraîner d'autres réactions parasites.
- Si le composé possède plusieurs cystéines, une réaction secondaire de formation de thiolactame cyclique peut se produire et diminuer le rendement de la synthèse.

Ainsi, beaucoup de protéines ne peuvent être préparées sous la forme native et des stratégies ont dûes être élaborées pour permettre la synthèse de protéines par ligation chimique native (Kochendoerfer *et al.* 2003) ou par EPL (Huse *et al.* 2001 ; Valiyaveetil *et al.* 2004). On peut citer l'utilisation de groupements auxiliaires possédant une fonction thiol éliminée lors de la ligation, la ligation conformationnelle assistée ou la ligation de Staudinger qui est explicitée ci-dessous.

### I. 1. 2. via la réaction de Staudinger

La ligation de Staudinger, développée par Bertozzi (Saxon *et al.* 2000) et Raines (Nilson *et al.* 2000) permet d'obtenir une liaison amide au site de ligation. Il s'agit de la réaction entre un peptide phosphinothioester (1), obtenu par déplacement nucléophile d'un peptide thioester en présence d'un phosphinothiol, et un peptide azoture (2) (Figure 9). Le mécanisme réactionnel supposé fait intervenir un iminophosphorane (3) comme intermédiaire réactionnel qui subit un - S,N - transfert d'acyle pour former l'aminophosphonium (4) qui est alors hydrolysé.

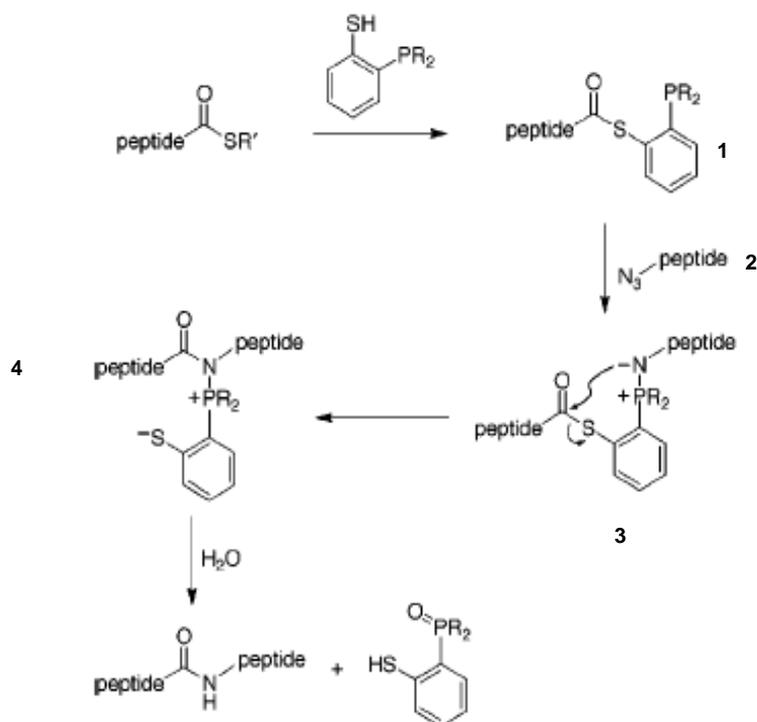


Figure 9 : Schéma de réaction de la ligation de Staudinger (Nilson *et al.*)

## I. 2. La ligation non native

Elle a été utilisée pour l'élaboration de vaccins synthétiques, l'introduction de liaison non amide ou encore la construction d'édifices moléculaires. En fonction des groupes réactionnels greffés sur chaque partenaire, on obtient différents types de liaisons au site de ligation. Ces différentes méthodes de ligation sont répertoriées dans les paragraphes suivants.

### I. 2. 1. La ligation thioéther et thioester

Deux types de ligation faisant intervenir un bromoacétate N-terminal comme électrophile ont été développés. Les thiocarboxylates ou les thiols peuvent réagir avec le bromoacétate selon une réaction de substitution nucléophile pour donner une liaison thioester ou thioether (Figure 10).

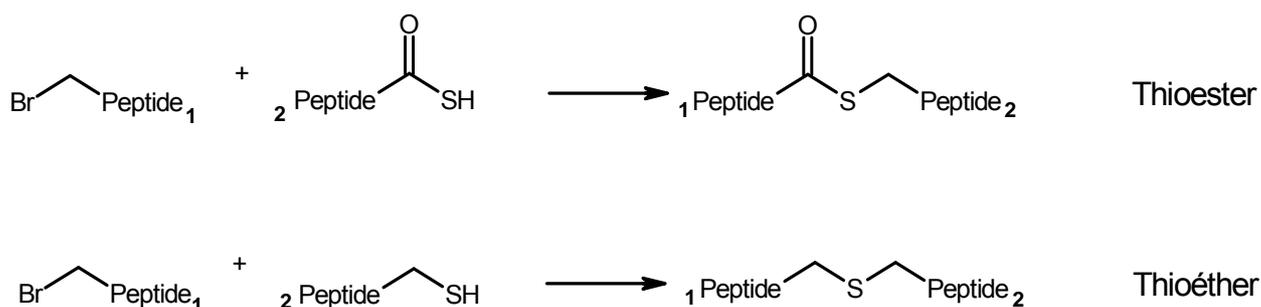


Figure 10 : Ligation par liaison thioester et thioéther

La ligation thioester est chimiosélective. En effet, au pH de la réaction (pH 5-6), les cystéines (pKa ~8) ou les amines sont protonées, contrairement au thiocarboxylate (pKa ~3) qui réagit alors beaucoup plus rapidement. La ligation thioéther qui s'effectue à pH neutre ou basique est quant à elle incompatible avec la présence de résidus cystéine.

Ces deux types de ligation ont été utilisés pour la synthèse de l'HIV-1 protéase (Figure 11). Cette protéine de 99 acides aminés est un bon candidat pour la synthèse par ligation chimique. Elle présente au milieu de sa séquence une région flexible contenant deux glycines adjacentes (résidus 51 et 52) qui n'intervient pas dans l'activité enzymatique. Il est donc facilement envisageable d'introduire une liaison thioéther ou thioester au niveau de ces deux glycines. Ceci nécessite la fonctionnalisation et la

condensation de deux fragments peptidiques d'une cinquantaine d'acides aminés pouvant être synthétisés par SPPS.

Le fragment 1-50 a été fonctionnalisé coté C-terminal par un thiocarboxylate ou un thiol et a été condensé avec le fragment 53-99 fonctionnalisé coté N-terminal par un bromoacétate pour former respectivement au site de liaison une liaison thioester ou thioéther (Englebretsen *et al.* 1995).

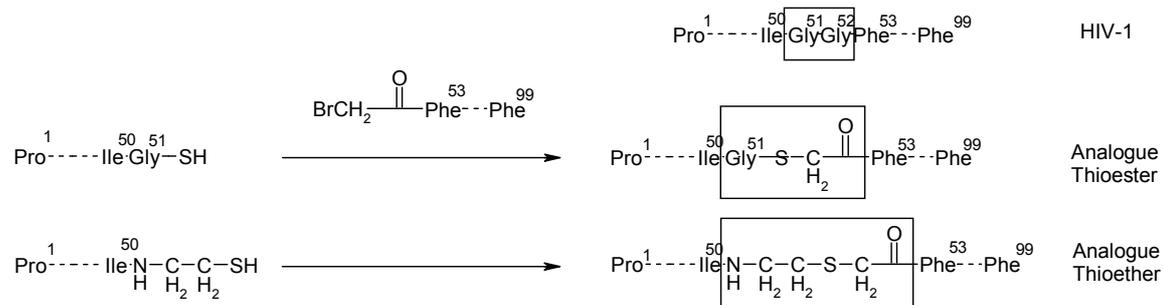


Figure 11 : Synthèse des analogues thioéther et thioester de l'HIV-1 protéase (d'après Englebretsen *et al.*)

Une liaison thioéther peut également être obtenue par adition de Michael entre un peptide thiol (1) et un peptide maléimide (2) (Figure 12). Ce type de ligation a par exemple été utilisé par Nefzi *et al.* (1995) pour la synthèse de TASP (Template Assembled Synthetic Protein) et abondamment utilisée pour fixer des haptènes sur des protéines porteuses

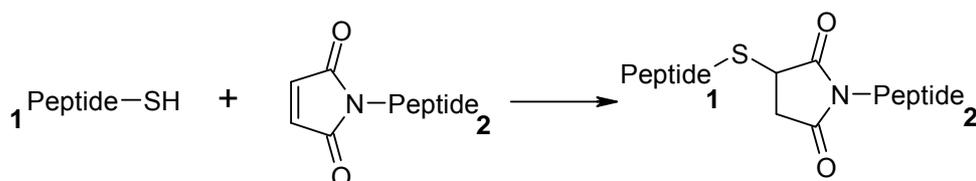


Figure 12 : Formation d'une liaison thioéther entre un peptide thiol et un peptide maléimide.

## I. 2. 2. La ligation thiazolidine et thiaproline

### La ligation thiazolidine :

La ligation par des liaisons thiazolidine a été développée par Tam et ses collaborateurs (Liu *et al.* 1994). Elle est formée par condensation, à pH acide (2 à 5), d'un aldéhyde avec une cystéine suivie d'un réarrangement intramoléculaire (Figure 13).

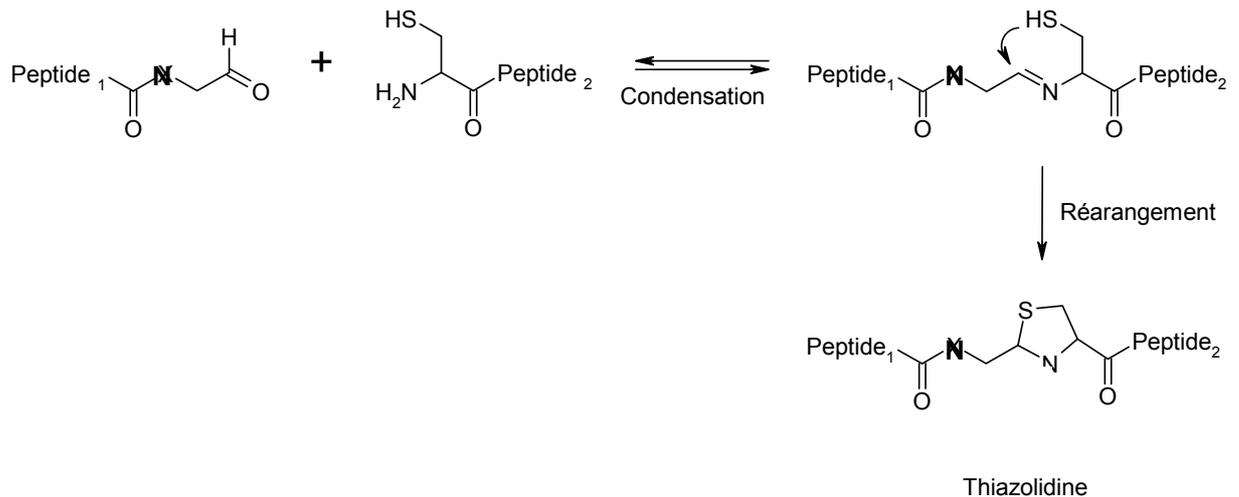


Figure 13 : Formation d'une liaison thiazolidine entre un peptide aldéhyde et un peptide N-term cystéine.

Cette ligation présente deux inconvénients :

- La première est l'utilisation d'un peptide comportant une cystéine libre du côté N-terminale. Les effets de dimérisation avec formation de pont disulfure sont importants malgré la présence de réducteur dans le milieu comme la TCEP (Tris-carboxyethyl phosphine).
- La seconde concerne la faible gamme de pH autorisée pour obtenir cette liaison thiazolidine qui ne pourra pas être utilisée en stratégie orthogonale, avec des groupes protecteurs acido-labiles.

#### La ligation thiaproline :

Dans le cas d'un ester méthylaldéhyde (X = O), contrairement à l'amido méthylaldéhyde (X = N), la thiazolidine obtenue peut subir à pH plus élevé (6 à 9) un O,N - transfert d'acyle pour former une pseudo-proline. La liaison obtenue s'apparente alors à une liaison de type XX-Pro (Figure 14).

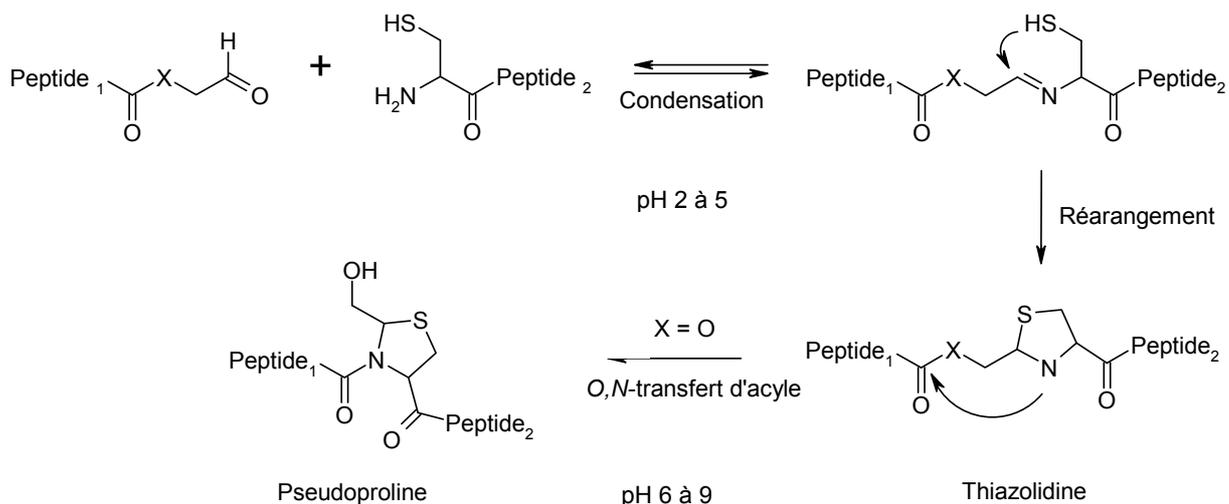


Figure 14 : Formation d'une liaison thiaproline par O,N transfert d'acyle à partir d'une thiazolidine

### I. 2. 3. La ligation triazole : la chimie « Click » cycloaddition

La ligation triazole est basée sur une réaction de cycloaddition catalysée par des métaux de transition comme le cuivre(I) entre des alcynes terminaux (composé dipolarophile) et des azotures organiques (composé dipolaire) (Figure 15). Le nombre d'application de ce nouvel outil de la chimie organique a littéralement explosé depuis sa découverte indépendante par Rostovtsev *et al* (2002) et Tornøe *et al* en (2002). Sa popularité (en dehors de l'inévitable "effet de mode") s'explique par la facilité d'introduction des fonctions azotures et alcynes et leur inertie quasi parfaite en l'absence de Cu(I). La facilité de mise en œuvre et la compatibilité inégalée de cette réaction avec d'autres fonctionnalités chimiques (entre autres, celles des acides nucléiques, des sucres et des protéines) lui ont valu l'appellation de "click-chemistry" (Meldal et Tornøe. 2008). Cependant, l'inconvénient est l'élimination du Cu(I) qui est toxique *in vivo* et qui peut générer d'autres réactions non désirées comme l'oxydation de la Cystéine ou la Méthionine.

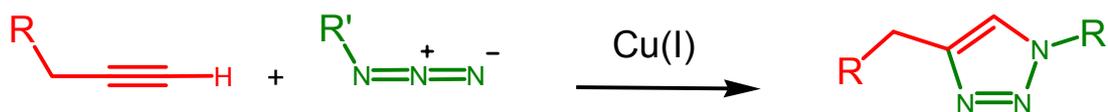


Figure 15 :

## I. 2. 4 La ligation Oxime et hydrazone

Les aldéhydes, de nature électrophile unique par rapport aux chaînes latérales des peptides qui sont de nature nucléophile, réagissent avec les groupes aminoxy, hydrazide ou hydrazine selon une réaction de condensation catalysée en milieu acide pour former des liaisons oxime ou hydrazone (Figure 16). Les aminoxy, hydrazide ou hydrazine sont beaucoup plus nucléophiles que les thiols ou les amines des chaînes latérales. De plus, au pH de la réaction, ces groupes qui ont des pKa faibles (~3,5 à 5) sont déprotonés alors que les chaînes latérales sont protonées. La réaction est donc chimiosélective.

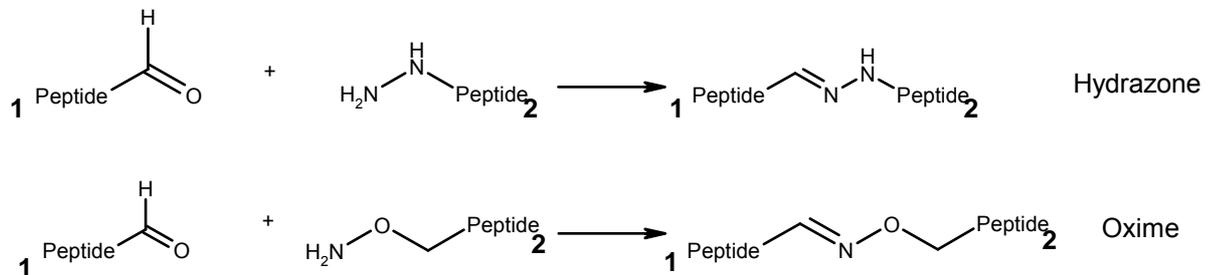


Figure 16 : Ligation par liaison oxime et hydrazone

### La ligation hydrazone :

La ligation par la liaison hydrazone est la première ligation non-native à avoir été étudiée (King *et al.* 1986). Afin de prouver son efficacité, une protéine recombinante la G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) a été spécifiquement coupée par voie enzymatique entre deux résidus lysine et sérine puis les deux fragments ont été fonctionnalisés et condensés pour reformer la G-CSF (Figure 17) (Gaertner *et al.* 1992).

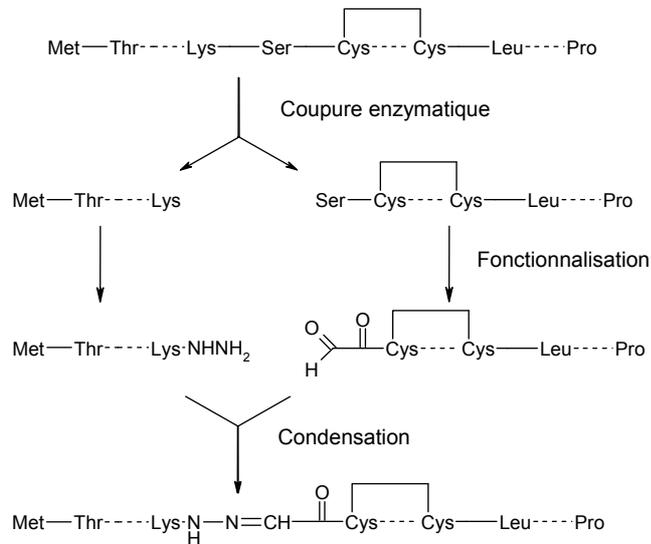


Figure 17 : Synthèse d'un analogue de la G-CSF par ligation hydrazone (d'après Gaertner et al)

### La ligation oxime :

Mise au point par Rose lors de la synthèse d'une protéine dendrimère d'environ 20 kDa (Rose *et al.* 1994), la ligation chimique par liaison oxime a été fréquemment utilisée pour l'élaboration de vaccins synthétiques afin de fixer plusieurs entités antigéniques sur une même molécule. Rose a ainsi préparé une construction vaccinale contre le choléra contenant huit branches peptidiques greffées sur un chassis à sept lysines (Figure 46) (Rose *et al.* 1996) et l'a comparée à celle obtenue par le concept des MAP (Multiple Antigenic Peptide) développé par Tam à la fin des années 1980. Cette approche sera développée dans le chapitre consacré aux dendrimères.

Les différents types de ligation décrits ci-dessus et résumés dans le tableau (Figure 18) permettent le couplage de deux fragments peptidiques synthétiques possédant pour l'un, une entité électrophile, et pour l'autre, une entité nucléophile.

Type de ligation	Electrophile	Nucléophile	Condition de pH
Oxime	Aldehyde	Aminoxy	4,5-5,5
Hydrazone	Aldehyde	Hydrazide/Hydrazine	4,5-5,5
Thioéther	Bromoacétyl	Thiol	6-8
Thioester	Bromoacétyl	Thioacide	3-7
Thiazolidine	Aldéhyde	Cystéine N-terminale	2-5
Pseudoproline	Réarrangement thiazolidine		6-9
Ligation native	Thioester	Cystéine N-terminale	7-8

*Figure 18 : Différents types de ligation*

## **CONCLUSION**

Dans le cadre de ce travail de thèse concernant la synthèse modulaire, par ligation chimique, de molécules potentiellement immunogènes contre la protéine MUC1 sous glycosylées et secrétées par certaines cellules cancéreuses, nous avons choisi d'utiliser cette liaison oxime. C'est la raison pour laquelle la ligation chimique via une liaison oxime sera spécifiquement développée dans un prochain paragraphe.

## II. LA LIAISON ETHER-OXIME.

La chimie éther-oxime est connue depuis longtemps. Elle a été utilisée la première fois par Erlanger *et al* en 1957 et le mécanisme a été étudié de manière approfondie par Cordes et Jenks (1962).

### Mécanisme de formation de la liaison éther-oxime

La formation de la liaison éther-oxime en ligation chimique résulte de la condensation sélective d'un peptide aldéhyde (R=H) ou cétone (R=alkyl) déprotégé sur un peptide aminooxy également déprotégé en milieu aqueux (Figure 19).

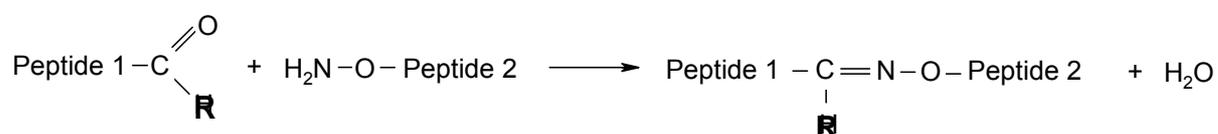


Figure 19 : ligation entre un peptide aldéhyde et un peptide aminooxy

La formation de cette liaison covalente se fait entre un peptide comportant un carbone électrophile (aldéhyde ou cétone) en position C-terminale, d'une part, et un peptide comportant un azote nucléophile (groupe aminooxy) en position N-terminale, d'autre part. La réaction d'oximation est optimale en milieu aqueux à pH 4,6.

La cinétique de réaction est faible à pH 7, ce qui limite son utilisation dans beaucoup d'applications biologiques. En milieu acide, la réaction s'effectue en deux étapes:

La première étape correspond à une addition nucléophile sur le groupe carbonyle et à la protonation de l'oxygène induisant la formation d'une forme tétraédrique carbinolamine (Figure 20).

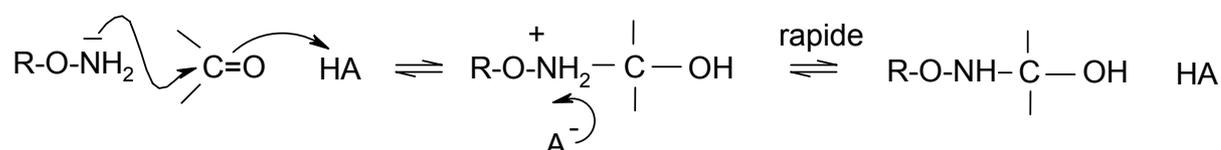


Figure 20: Mécanisme concerté de l'addition nucléophile sur le groupe carbonyle et de la protonation de l'oxygène induisant la formation d'une forme tétraédrique carbinolamine.

D'après Sayer *et al* (1974) cette première étape peut s'effectuer soit par un mécanisme concerté si nous sommes en présence d'une amine faiblement basique, soit

par un mécanisme par étapes, passant par un intermédiaire d'addition zwitterionique, si nous sommes en présence d'une amine fortement basique. Lors de notre réaction de ligation, nous travaillons en milieu acide à pH 4,6 avec un peptide aminooxy faiblement basique de pKa de 3,5, ce qui nous laisse supposer que nous travaillons selon un mécanisme concerté dans la première étape de la réaction.

La deuxième étape correspond à la protonation de l'hydroxyle, puis à la déshydratation induisant la formation de l'oxime (Figure 21).

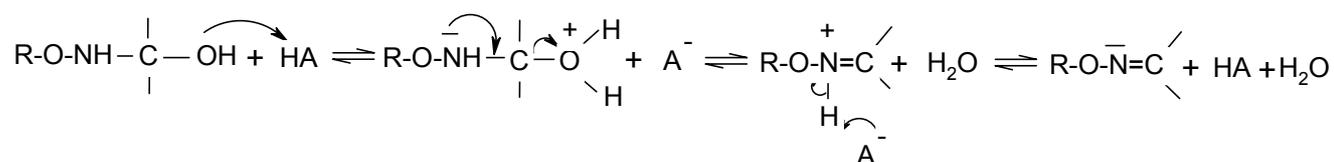


Figure 21 : Protonation de l'hydroxyle puis déshydratation induisant la formation de l'oxime.

## **II. 1. Introduction de la fonction aldéhyde ou cétone du côté C-terminal**

La fonctionnalisation de peptides et protéines par un groupe aldéhyde ou cétone a fait l'objet de recherches intensives depuis la découverte des propriétés inhibitrices des peptides aldéhydes sur les protéases à sérine et cystéine comme la trypsine, la plasmine ou encore la papaïne (Aoyagi *et al.* 1969) mais également sur une protéase de l'acide aspartique impliqué dans le cycle de prolifération du virus HIV (human immunodeficiency virus) (Sarrubi *et al.* 1992). Indépendamment de leurs propriétés inhibitrices de protéases, les peptides aldehydes sont des partenaires de choix pour des méthodes de bioconjugaison conduisant à la formation de liaison éther-oxime. Cette dernière a été utilisée avec succès pour fixer un grand nombre de substances sur des protéines (Webb et Kaneko. 1990; Kurth *et al.* 1993) ou former des haptens (Mikola et Hänninen. 1992) en vue d'applications *in vivo* comme les peptido-conjugués, peptides-DNA, glycopeptides, dendrimères, etc...

De nombreuses méthodes ont été développées pour la synthèse de peptides aldéhydes à l'intérieur de séquence sur des chaînes latérales (Marcaurelle et Bertozzi. 1998; Spetzler et Hoeg-Jensen. 2002), en position C- ou N-terminale (Melnik *et al.* 2000).

Cependant, dans le paragraphe qui suit, nous nous limiterons volontairement à décrire différentes méthodes d'obtention de peptides possédant une fonction méthyl ou ceto aldehyde ou cétone en position C-terminale dans un but de bioconjugaison. Ces composés peuvent être obtenus en solution ou sur support solide. La stratégie sur support solide permettant la synthèse rapide de peptides aldéhydes de grande pureté a été rendue possible grâce aux développements de bras espaceurs spécifiques (ou linkers). Selon le bras employé, le peptide est décroché de la résine sous différentes conditions (réduction, ozonolyse...) avec la génération d'une fonction aldéhyde ou aldéhyde masquée en position C-terminale.

## **II. 1. 1. Introduction d'une fonction méthylène aldéhyde du côté C-terminal**

### II. 1. 1. 1. Oxydation d'un diol

Une méthode intéressante développée par Zhang *et al* (1998) est l'introduction d'un diol en position C- terminale. Le Fmoc-amino-diol (1) (Figure 22) préalablement synthétisé a été couplé sur une résine chlorotriptyl puis la fonction alcool libre a été protégée par un *t*-butyl. Ce type de résine commerciale, permet l'élongation du peptide en stratégie Fmoc puis sa déprotection des chaînes latérales et son décrochage sous forme de diol C-terminal par un traitement TFA. Le diol sera ensuite oxydé en solution par NaIO<sub>4</sub> et générera un glycinale.

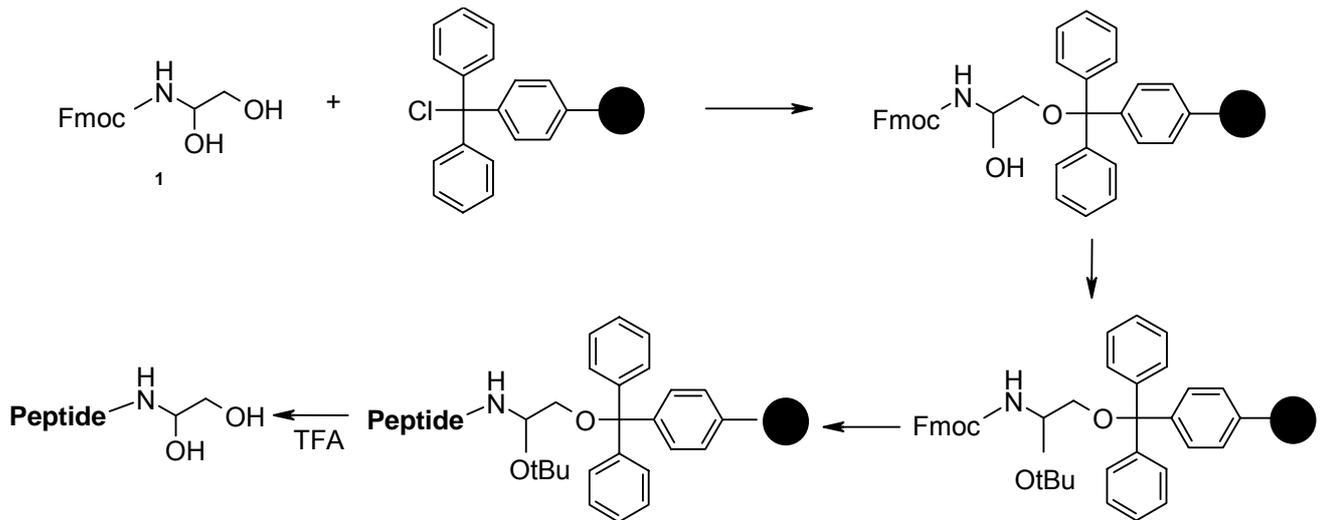


Figure 22 : Synthèse d'un peptide diol C-terminal (d'après Zhang et al)

L'inconvénient majeur de cette méthode est la sensibilité de certains acides aminés tels que la méthionine à l'oxydation.

### II. 1. 1. 2. Oxydation du bras BAL

Le bras BAL (Backbone Amide Linker) développé par Barany et ses collaborateurs (1998) peut être utilisé pour la synthèse d'un peptide portant une fonction aldéhyde en position C-terminale (Figure 23). Il s'agit de fixer sur ce bras, par amination réductrice, un amino acétal puis de réaliser l'élongation sur l'amine secondaire. Le traitement final au TFA permet de déprotéger l'acétal en même temps que la libération du peptide de la résine. L'inconvénient de cette stratégie est la difficulté de coupler le premier acide aminé sur l'azote secondaire.

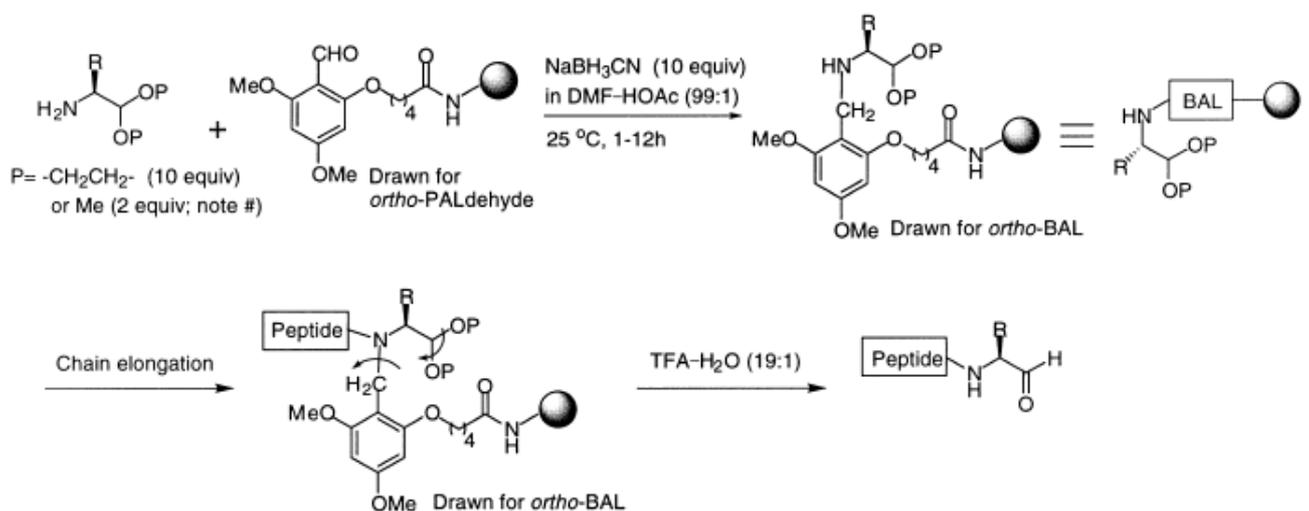


Figure 23: Synthèse d'un peptide aldéhyde C-terminal à partir du bras BAL (Guillaumie et al)

### II. 1. 1. 3. Par déplacement nucléophile

Au laboratoire, Lelièvre *et al* (1998, 2001) ont exploité la sensibilité aux nucléophiles du bras 4-(oxyméthyl)-PhenylAcétamidoMéthyl (« bras PAM ») (Figure 24) introduit par Mitchell *et al* (1976) pour installer en position C-terminale une fonction aldéhyde masquée sous forme d'acétal (Lelièvre *et al.* 1998) (Figure 25). La présence du substituant acétamidométhyl, électroattracteur, en para du phényl rend l'ester benzylique beaucoup plus stable en milieu acide que dans le cas du bras 4-(oxyméthyl)-phenoxy méthyl de la résine de Wang. Cette liaison est par contre plus sensible aux nucléophiles.

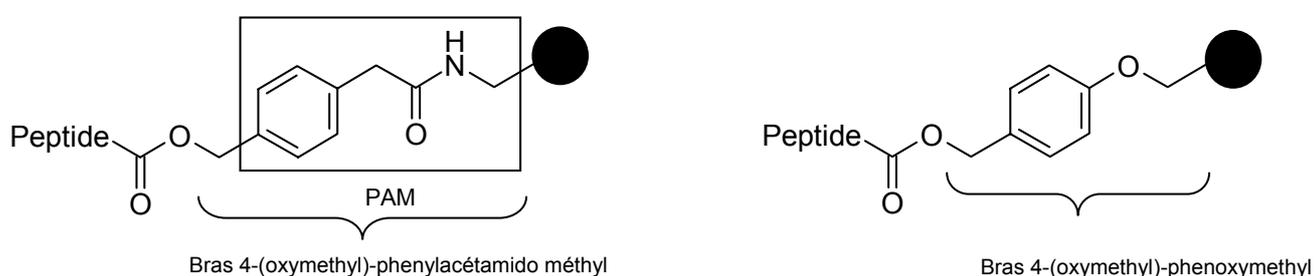


Figure 24 : schéma des bras 4-(oxyméthyl)-phenylacétamido méthyl (« bras PAM ») et 4-(oxyméthyl)-phenoxy méthyl

Le bras PAM reste stable durant l'élongation du peptide en stratégie Fmoc/tBu et la déprotection des chaînes latérales par un traitement au TFA. La réaction d'aminolyse de l'ester benzylique par l'aminocétaldéhyde diméthylacétal (déplacement nucléophile) conduit à un peptide en C-terminal. Cet acétal est ensuite très facilement déprotégé par traitement au TFA pour obtenir le glycinal C-terminal.

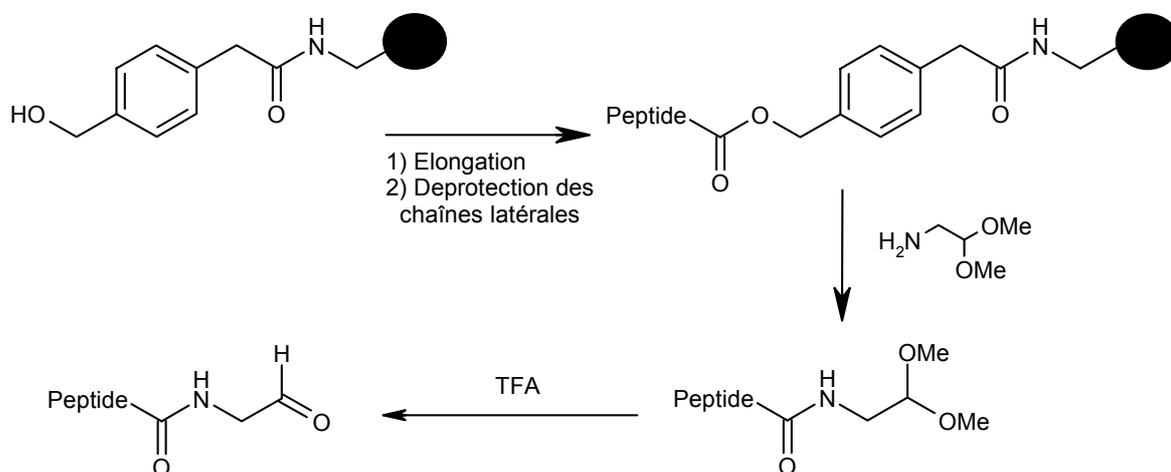


Figure 25 : Synthèse d'un peptide aldéhyde par aminolyse (d'après Lelièvre *et al* 1998)

Il est important de noter que pour conduire à la synthèse de longs peptides aldéhyde par aminolyse il est préférable d'utiliser une résine polaire telle que la résine PEGA (Lelièvre *et al.* 2002).

## II. 1. 2. Introduction d'une fonction $\alpha$ -oxo-aldéhyde du côté C-terminal

### II. 1. 2. 1. Oxydation d'un 2-aminoalcool

L'oxydation des 2-aminoalcools par  $\text{NaIO}_4$  est une réaction bien connue en chimie organique. Cette réaction peut être facilement appliquée à la synthèse de peptide aldéhyde en incluant dans la séquence une sérine ou une thréonine ou fixée sur la chaîne latérale d'une lysine située (très important) en position C-terminale. Ce résidu est ensuite oxydé pour former un  $\alpha$ -oxo-aldéhyde.

Du fait de sa simplicité et de son efficacité (oxydation totale en quelques minutes) cette méthode est largement répandue. L'inconvénient de cette réaction est l'oxydation de la méthionine présente dans la séquence.

### II. 1. 2. 2. Utilisation du linker IPT

Melnyk et ses collaborateurs (2001) ont développé un linker basé sur le (+)diméthyl-2-3-O-isopropylidène-D-tartrate [IPT] (Figure 26). Le groupe protecteur acétone est stable durant l'élongation du peptide en stratégie Fmoc/*t*Bu. Il est déprotégé en même temps que les chaînes latérales par un traitement TFA pour former un diol qui sera oxydé par le periodate de sodium pour libérer le peptide  $\alpha$ -oxo-aldéhyde C-terminal.

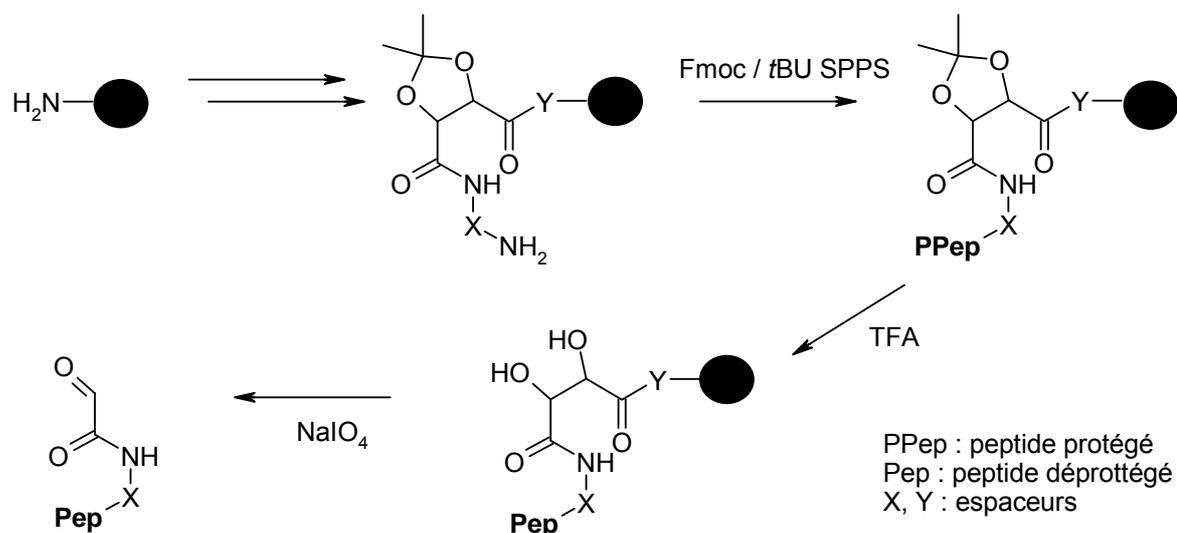


Figure 26 : Synthèse d'un peptide cétoaldéhyde C-terminal (Melnyk *et al.*).

Cependant l'utilisation d'un céto-aldéhyde peut être accompagnée de sous-produits comme la formation de 1,3,4 oxadiazolidino peptide contenant deux unités aldéhyde (Melnyk *et al.* 1998). De plus, des séquences avec une proline précédant l' $\alpha$ -oxo-aldéhyde conduisent à une cyclisation intramoléculaire et formation d'un hétérocycle stable en milieu acide (Rose *et al.* 1999).

### **II. 1. 3. Introduction d'une fonction cétone du côté C-terminal**

Une méthode développée au laboratoire (Figure 27) permet d'obtenir un  $\alpha$ -amido méthylcétone en utilisant une résine NovaTag <sup>TM</sup> (Marceau *et al.* 2005). La résine NovaTag <sup>TM</sup> possède un linker de type BAL, l'acide 4-(3-formyl-2-méthoxyphénoxy) butanoïque [FMPB linker] fonctionnalisé par amination réductrice avec une éthylènediamine mono-protégée par un groupe méthoxytrityl (Mmt). L'élongation peptidique a été effectuée en stratégie Fmoc/*t*Bu. L'introduction de l'acide pyruvique (CH<sub>3</sub>-CO-COOH) au niveau C-terminal a nécessité des précautions particulières. Afin d'éviter l'apparition d'un sous-produit (dimère) issu d'une réaction de Claisen en milieu basique, l'acide pyruvique est couplé par le DCC/NHS. De plus, le dernier amino acide situé du côté N-terminal est protégé au niveau du N <sup>$\alpha$</sup>  par un groupe Boc. Le peptide cétone est ensuite clivé de la résine par un traitement au TFA en absence de TIS afin d'éviter la réduction de la fonction carbonyle.

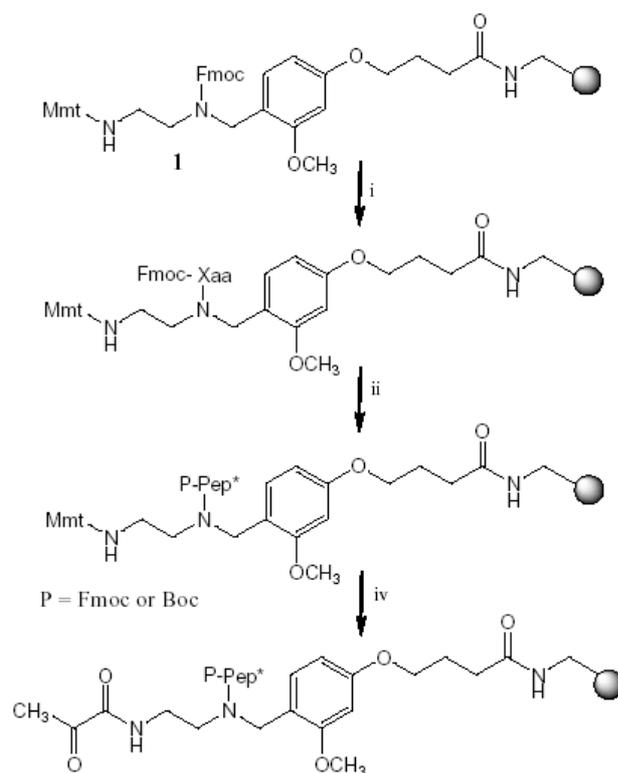


Figure 27 : Synthèse d'un peptide cétoaldéhyde C-terminal (d'après Marceau et al).  
 (i) a, 20% pipéridine dans DMF; b, Fmoc-Xaa-OH, HATU, DIEA. (ii) élongation Fmoc/tBu.  
 (iii) 1 M HOBt dans TFE/DCM. (iv) couplage de CH<sub>3</sub>-CO-COOH avec DCC/NHS

## **Conclusion :**

Les différentes stratégies décrites ici permettent d'introduire des fonctions aldéhyde, cétoaldéhyde ou des fonctions cétone en position C-terminale. De nombreuses possibilités sont donc ainsi offertes pour la synthèse de protéines par ligation chimique oxime.

## **II. 2. Introduction de la fonction aminoxy du côté N-Terminal**

La synthèse des acides  $\alpha$ -aminoxy acétiques (Aoa) a été décrite la première fois en 1893 par Werner. Puis il faut attendre le début des années 1960 pour que ces acides soient de nouveau étudiés (Hale *et al.* 1964). Plus tard, des dérivés N-protégés de l'acide  $\alpha$ -aminoxy acétique ont été préparés par réaction entre un sel de sodium de l'hydroxylamine N-protégée avec un  $\alpha$ -bromo acide obtenu via désamination par l'acide nitreux de l' $\alpha$ -amino acide correspondant. Cette méthode de Briggs et Morley (1979) a été utilisée pour la synthèse de dérivés  $\alpha$ -alkylés de l'acide  $\alpha$ -N-Boc-aminoxyacétique.

Des méthodologies plus récentes basées sur la fonctionnalisation d'acide aminé sont apparues comme celles de Lang *et al* (1998) ou de Spetzler et Hoeg-Jensen (1999) mais elles ne seront pas développées dans ce chapitre.

## II. 2. 1. Par acylation

Le couplage des dérivés de l'acide aminooxyacétique (Aoa) sur l'extrémité N-terminale d'un peptide-résine est fréquemment utilisé pour l'introduction d'une fonction aminooxy. Lors des premiers essais de ligation avec une liaison oxime, Rose et ses collaborateurs (1994) ont utilisé l'ester de succinimide protégé sur le N<sup>α</sup>, Boc-Aoa-OSu (1) (Figure 28). Les mêmes agents de couplages et groupements protecteurs des α-NH<sub>2</sub> employés en synthèse peptidique classique peuvent être utilisés.

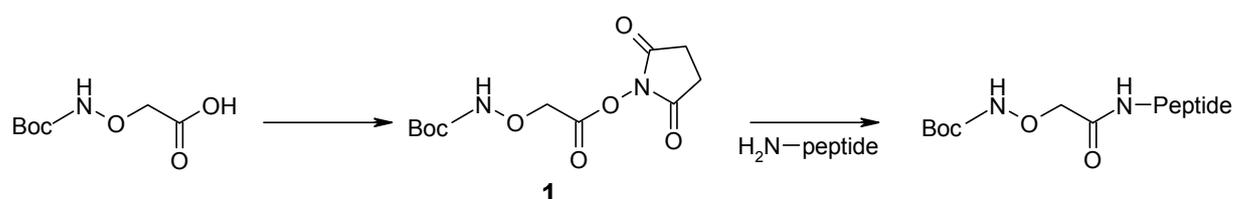


Figure 28 : Couplage de l'acide aminooxy acétique en position N-terminale d'un peptide (d'après Rose et al).

## II. 2. 2. Par déplacement nucléophile

Outre l'utilisation des dérivés de l'Aoa, il est possible d'obtenir une fonction aminooxy en position N-terminale d'un peptide en utilisant le N-hydroxysuccinimide pour le déplacement nucléophile d'un peptide-résine N-bromoacétamide. L'élimination du groupement succinimide par l'hydrazine génère ensuite la fonction aminooxy (Figure 29) (Horn *et al.* 2004).

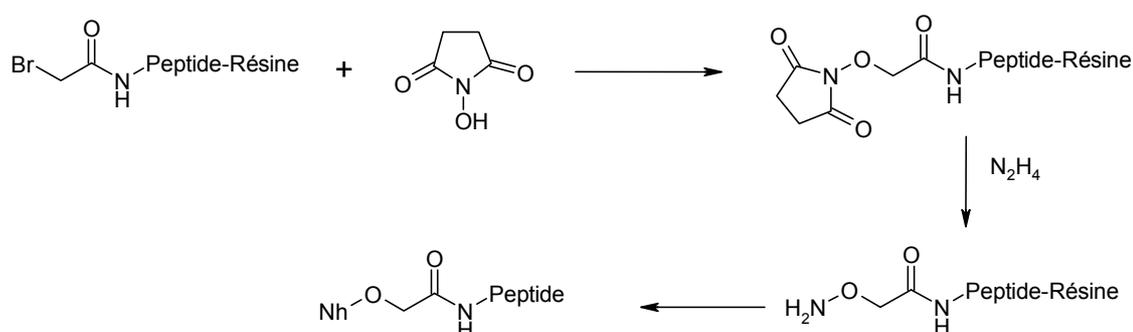


Figure 29 : Utilisation de l'hydroxysuccinimide pour la synthèse d'un peptide aminooxy (d'après Horn et al)

### II.3. Réactivité des peptides

La réaction de formation de la liaison éther-oxime se déroule en milieu aqueux acide. Par conséquent, la cinétique de la réaction va dépendre de la solvation des composés mis en jeu.

#### **II. 3. 1. Réactivité des peptides possédant une fonction aldéhyde ou cétone**

Les travaux de thèse de Corinne Buré (université d'Orléans.2005) sur l'hydratation de peptides possédant une fonction aldéhyde ou cétone en position C-terminale, en solution par RMN et en phase gazeuse par fragmentation dans la source a permis une meilleure compréhension du mécanisme de la réaction d'oximation (Melnik *et al.* 1998).

Pour cette étude, des peptides dérivés de la séquence MUC1 (Figure 30) ont été synthétisés au laboratoire avec des substituants électroattracteur ou électrodonneur en  $\alpha$  du carbonyl considéré. La réactivité sur un peptide méthylène-aldéhyde P4, un peptide  $\alpha$ -oxo--aldéhyde P5 et un peptide cétone P6 a été étudiée en solution dans un tampon acétate. Par souci de clarté dans le tableau de la figure 16, nous appelons 'pep' la séquence PPAHGVTSAPDTRPAGST, i.e. la séquence répétitive de MUC1 sans alanine en C-terminal.

Nom	Séquence	MH <sup>+</sup> (+ [M+H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> ) (Da)	
		calculée	expérimentale
P4	pep-A-NH-CH <sub>2</sub> -CHO	1928,1 (+ 1946,1)	1928,3 (+ 1946,3)
P5	pep-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-CO-CHO	1914,1 (+ 1932,1)	1914,3 (+ 1932,1)
P6	pep-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-CO-CO-CH <sub>3</sub>	1928,1 (+ 1946,1)	1928,6 (+ 1946,3)

Figure 30 : Séquences peptidiques P4, P5 et P6

Dans le cas des peptides aldéhyde, l'hydratation de l' $\alpha$ -oxo-aldéhyde est légèrement supérieure à celle d'un méthylène-aldéhyde. Les peptides cétone s'hydratent peu suggérant que l'attaque nucléophile de l'eau sur le carbonyle ne soit pas favorisée. Ainsi, le taux d'hydratation des peptides aldéhyde et cétone en solution déterminée par RMN a permis de définir un ordre d'hydratation des peptides : peptide  $\alpha$ -oxo-aldéhyde > peptide méthylène-aldéhyde >> peptide cétone et d'envisager une réactivité vis-à-vis d'un nucléophile comme une amine selon le même ordre.

L'expérience est en accord avec le caractère électrophile du carbone « fonctionnel » des peptides aldéhyde. L'effet attracteur du carbonyl en  $\alpha$  du carbone fonctionnel du  $\alpha$ -oxo-aldéhyde va le rendre plus sensible à l'attaque d'un nucléophile comparé à l'effet inducteur du méthylène en  $\alpha$  du carbone fonctionnel du méthylène-aldéhyde (Figure 31).

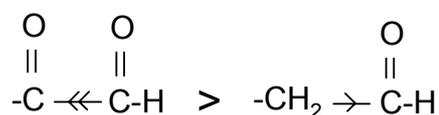


Figure 31 : Electrophilie du carbone fonctionnel de peptides aldéhyde

### II. 3. 2. Réactivité du peptide aminoxy

L'effet  $\alpha$  de l'atome d'oxygène affecte le caractère nucléophile de l'azote adjacent et augmente considérablement le caractère acide du groupe aminoxy ( $pK_a = 4,6$ ), le rendant ainsi très sensible à l'acylation durant son couplage en synthèse peptidique en stratégie Fmoc/*t*Bu. De ce fait, des phénomènes de bis-acylation ont pu être observés lorsque l'azote de l'amino-oxy est mono protégé. Cette réaction secondaire peut être supprimée par l'utilisation de dérivés doublement protégés (Bis-Boc, phthaloyle) ou possédant un groupement protecteur encombré (Trt). Des conditions particulières d'activation de l'acide aminoxyacétique développé au laboratoire et décrite dans le chapitre résultats et discussion permettent également de supprimé cette réaction secondaire.

### II. 3. 3. Cinétique de ligation éther-oxime

Les peptides résultant de la ligation chimique entre Paoa et les peptides aldéhyde et cétone précédemment décrits sont les peptides Plig4, Plig5 et Plig6 (Figure 32).

Nom	Séquence	MH <sup>+</sup> calculée (Da)	MH <sup>+</sup> expérimentale (Da)
Paoa	H <sub>2</sub> N-O-CH <sub>2</sub> -CO-ALKWSLA	861.0	861.6
Plig4	pep-A-NH-CH <sub>2</sub> -CH=N-O-CH <sub>2</sub> -CO-ALKWSLA	2771.1	2771.5
Plig5	pep-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-CO-CH=N-O-CH <sub>2</sub> -CO-ALKWSLA	2757.1	2757.6
Plig6	pep-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-CO-C(CH <sub>3</sub> )=N-O-CH <sub>2</sub> -CO-ALKWSLA	2771.1	2771.3

Figure 32 : Séquences des peptides Plig4, Plig5 et Plig6

La cinétique de la réaction est suivie par HPLC, à 25°C, pendant 37 heures (Figure 33).

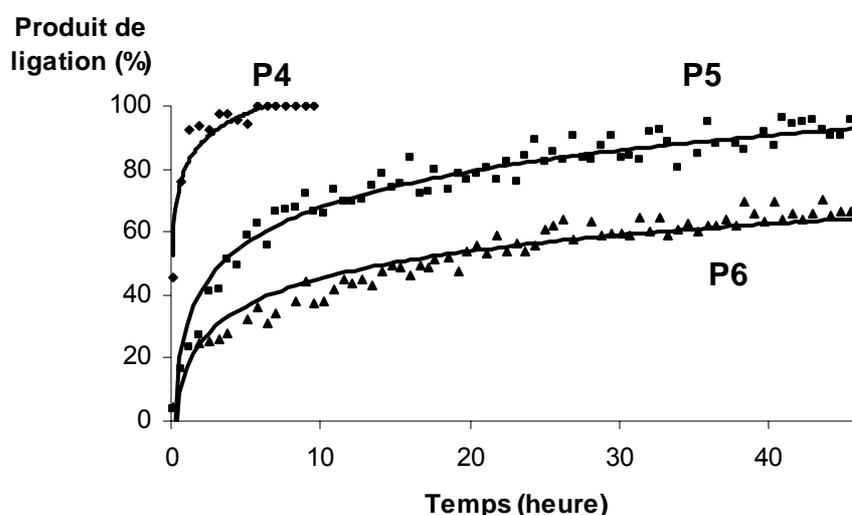
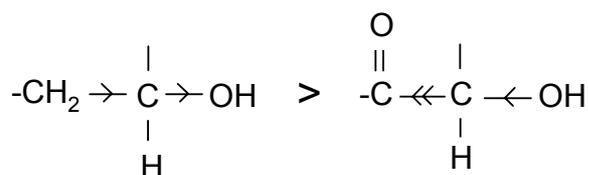


Figure 33 : Cinétique de la réaction de ligation des trois peptides P4, P5 et P6 avec le peptide aminooxy Paoa.

D'après la figure 33, le peptide méthylène-aldéhyde P4 est plus réactif que le peptide  $\alpha$ -oxo-aldéhyde, surtout en début de réaction. L'ordre de réactivité en présence de Paoa est le suivant: peptide méthylène-aldéhyde P4 >> peptide  $\alpha$ -oxo-aldéhyde P5 > peptide cétone P6. Concernant les peptides aldéhyde, la réactivité est inversée en comparaison des résultats observés lors de l'hydratation.

La première étape de la réaction de ligation (page 35) semble être l'étape limitante pour les peptides cétone. Ces peptides sont les moins réactifs vis-à-vis d'un peptide aminooxy, certainement du fait de l'encombrement stérique de la fonction carbonyle qui rendrait plus difficile l'attaque du nucléophile  $H_2N-O-$ . Pour les peptides aldéhyde, la seconde étape de la réaction de ligation (page 36) semblerait être prépondérante dans la formation de l'oxime. La basicité de l'oxygène de la fonction hydroxyle serait affectée par l'effet attracteur du carbonyle en  $\alpha$  du carbone fonctionnel de l' $\alpha$ -oxo-aldéhyde et le rendrait moins basique que celui du méthylène-aldéhyde dont l'effet inducteur du méthylène en  $\alpha$  du carbone fonctionnel augmenterait son caractère basique (Figure 34).



*Figure 34 : Basicité de l'oxygène de la fonction hydroxyle entre un carbinolamine de méthyl-aldéhyde et de céto-aldéhyde*

Par conséquent, il devrait lui être plus facile de capter un proton présent dans le milieu de réaction ce qui faciliterait l'élimination de la molécule d'eau. Par analogie, il est tentant de penser qu'en solution, l'élimination d'une molécule d'eau de la carbinolamine issue du peptide méthyl-aldéhyde serait plus facile que de celle issue du peptide céto-aldéhyde. Cette hypothèse pourrait expliquer la raison pour laquelle la réaction d'oximation est plus rapide avec les peptides méthylène-aldéhyde qu'avec les peptides  $\alpha$ -oxo-aldéhyde.

### **Conclusion**

La fonctionnalisation des peptides et l'étude de leur réactivité dans les conditions de la ligation oxime nous ont conduit à choisir la ligation méthylène éther oxime. En effet, le temps de réaction sera un des paramètres à prendre en considération dans un but de multiligations afin de minimiser une éventuelle réaction parasite de transoximation.

### **III. LA MULTILIGATION :VERS LES EDIFICES MACROMOLECULAIRES**

Sauf dans le cas de l'«expressed protein ligation» où l'un des deux fragments est obtenu par synthèse recombinante, la taille des protéines obtenues à partir d'une seule ligation reste limitée par la taille des fragments peptidiques pouvant être synthétisés. Afin d'augmenter le poids et la diversité moléculaire des édifices macromoléculaires, des méthodologies utilisant plusieurs ligations (natives et/ou non natives) ont été développées. Elles impliquent la présence simultanée de plusieurs fonctions réactives qu'il faudra activer ou protéger temporairement. Cette approche inhérente aux domaines de la chimie des sucres, des oligonucléotides et des peptides fait intervenir le concept d'orthogonalité.

#### **Notion d'orthogonalité :**

Barany et Merrifield (1977) le définissent comme «un ensemble de groupes protecteurs complètement indépendant de tel sorte que chaque groupe puisse être enlevé dans n'importe quel ordre en présence des autres groupes protecteurs ». Des exemples d'orthogonalité de groupes protecteurs en synthèse peptidique associent la stratégie Boc-benzyl avec des groupes protecteurs sensibles à des nucléophiles, à des bases, au palladium (Aloc, All...) ou encore à la lumière. De même, en stratégie Fmoc-tert-butyl on utilise des groupes protecteurs sensibles à des acides (Trt, Mtt, Mmt...), au palladium (Aloc, All), ou à la lumière.

Ce concept d'orthogonalité a été étendu par Kanie à l'étape d'activation de donneurs et d'accepteurs de glycosides afin d'accélérer la formation d'heptasaccharides (Kanie *et al.* 1994) (Figure 35).

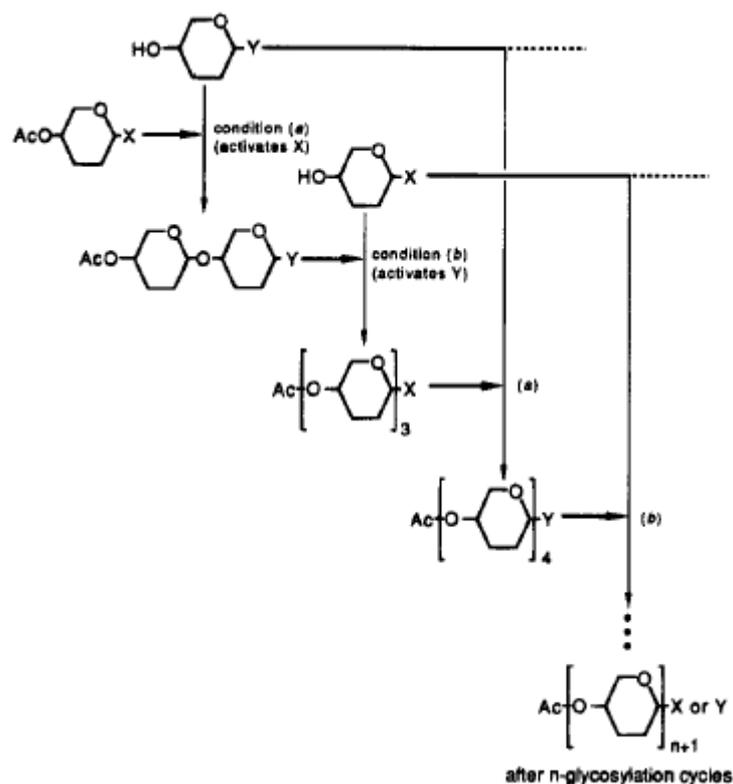


Figure 35 :Obtention d'oligosaccharides d'après Kanie et al

L'unité monosaccharidique de départ est une glucose-amine (GlcN) N protégée par un phtaloyle. Le groupe X est un groupe phénylthio activé par un mélange de N-iodosuccinimide (NIS)-acide triflique (TfOH) et le groupe Y est un atome de fluor activé par  $\text{Cp}_2\text{HfCl}_2 - \text{AgClO}_4$ .

Zeng et Zimmerman (1996) ont proposé un concept de couplage orthogonal pour obtenir des dendrimères (Figure 36) et réduire de moitié le nombre d'étapes de protection et d'activation nécessaires à la synthèse de ces polymères généralement obtenus par une approche divergente (Tomalia *et al.* 1993 ; Newkome *et al.* 1992) où une méthode convergente (Fréchet *et al.* 1990). Un dendron de sixième génération (G6I) de  $21\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  a été synthétisé en trois étapes à partir d'un tétra-acide iodé subissant une tétra-estérification selon la réaction de Mitsunobu (1981) et d'un tétra-acétylène hydroxylé réagissant avec le composé iodé estérifié selon une réaction de Sonogashira *et al* (1975).

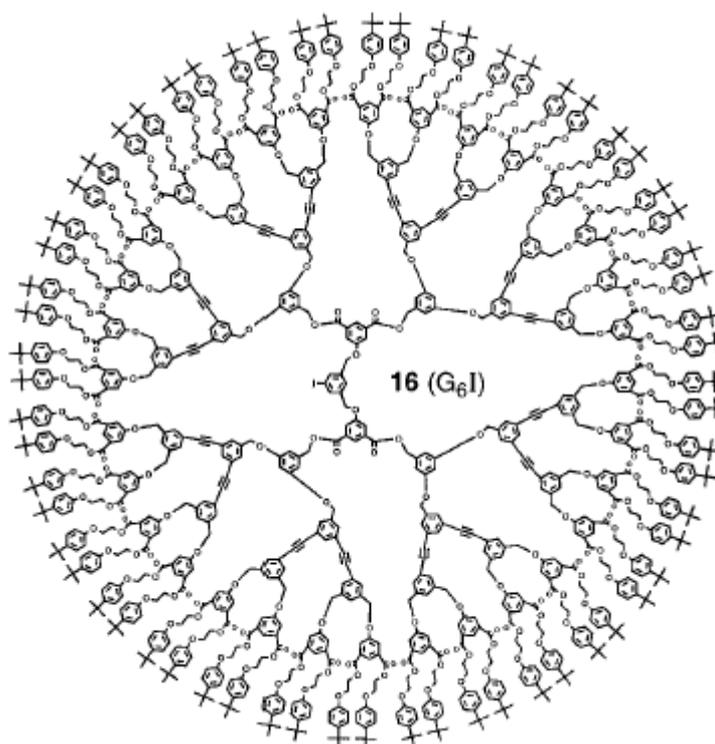


Figure 36 : synthèse d'un dendron d'après Zeng et Zimmerman

Ils appellent leur approche couplage orthogonal dans la mesure où les réactions de Sonogashira et Mitsunobu peuvent être réalisées dans n'importe quel ordre.

D'une manière générale, ce concept d'orthogonalité incluant des stratégies de protection, d'activation ou encore de couplage en chimie organique met toujours en jeu deux groupes fonctionnels réagissant de manière chimiosélective malgré la présence d'autres entités réactionnelles. Au regard de la définition d'orthogonalité, les méthodes de multiligations natives et non natives peuvent être assimilées à des ligations orthogonales.

Cette notion est primordiale dans une stratégie de multiligation puisqu'elle consiste à étendre la ligation chimique à la synthèse de protéines et/ou d'édifices macromoléculaires de taille plus importante en réalisant plusieurs ligations pour assembler trois fragments ou plus (Figure 37).

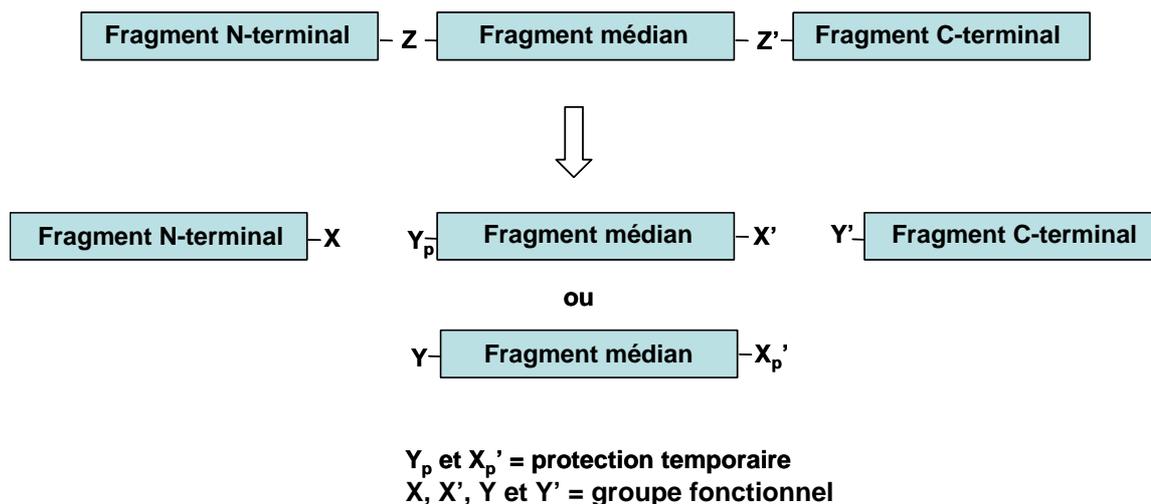


Figure 37 : Schéma rétrosynthétique d'assemblage de trois fragments

Au regard de ce schéma, la stratégie de multiligation peut se faire selon deux approches :

- La première consiste à activer spécifiquement une fonction où à réaliser un couplage orthogonal. Ces deux voies n'ont pas été étudiées car cela aurait nécessité une mise au point fastidieuse pour l'activation et une stratégie inappropriée pour notre étude dans le cas du couplage orthogonal. En effet, les liaisons Z et Z' sont des liaisons de même nature et les groupes fonctionnels mis en jeu sont identiques.
- la seconde réside dans la protection temporaire d'une des deux fonctions (Y<sub>p</sub> et X<sub>p</sub>') réactives du fragment médian. Après une première ligation, cette protection est sélectivement éliminée pour permettre d'effectuer la ligation suivante. C'est cette approche que nous avons décidé de suivre au cours de la thèse.

La multiligation peut comporter des ligations de même type ou de différents types (mixtes). Elle peut être effectuée en solution ou sur support solide et de nombreux exemples montrent l'efficacité de l'utilisation de plusieurs ligations orthogonales pour parvenir à la synthèse d'édifices moléculaires «protéiques» de taille importante. Nous avons choisi d'en présenter seulement quelques exemples qui nous paraissent significatifs.

### III.1. Multiligation en solution

#### III.1. 1. La multiligation avec des liaisons de même type

La synthèse de la crambine réalisée par Bang et Kent (2004) avec deux ligations natives illustre la deuxième approche. La stratégie réside dans la protection temporaire d'une des fonctions réactives. Parmi les cinq résidus cystéine de la crambine, les résidus choisis comme sites de ligation sont les résidus 16 et 32. La première étape (Figure 38) est la ligation entre le résidu 16-31 fonctionnalisé par un thioester et le résidu 32-46. Lors de cette ligation la cystéine 16 est protégée sous forme de thiazolidine, permettant de s'affranchir d'une étape de purification lors de l'utilisation du groupe protecteur AcM (acétamidométhyl) et d'améliorer ainsi le rendement intermédiaire de la synthèse. La deuxième étape consiste à déprotéger la cystéine 16 et à introduire dans le milieu réactionnel le fragment 1-15 fonctionnalisé par un thioester, pour former la deuxième liaison native.

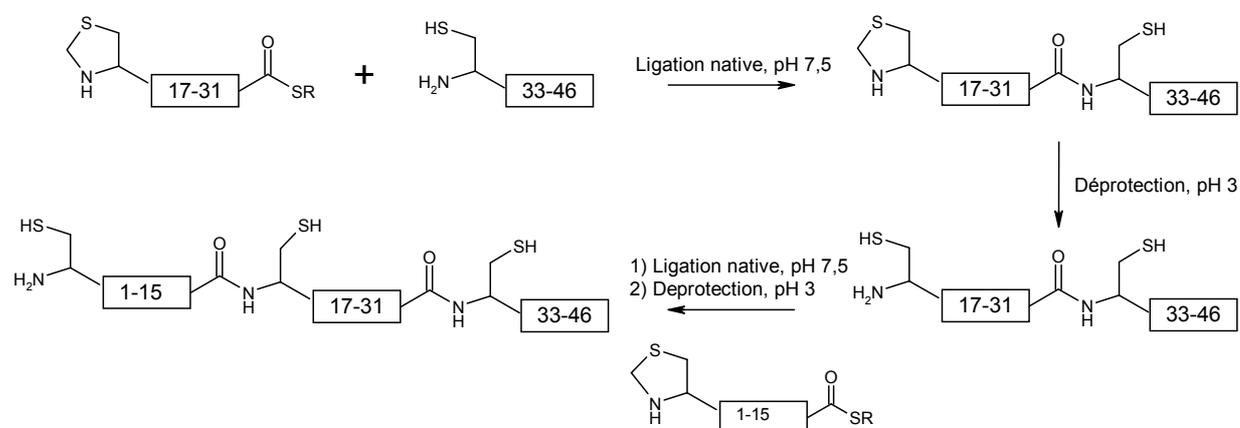


Figure 38 : Synthèse de la crambine (d'après Bang et al)

Les travaux récents de Torbeev et Kent (2007) illustrent la première approche en « jouant » sur les différences de réactivités des thioesters. Ils ont réalisé la synthèse d'une HIV-1 protéase de 203 acides aminés à partir de 4 fragments peptidiques (Figure 39). La première étape est la synthèse convergente de deux fragments peptidiques (A1-A40)-( $\alpha$ thioarylester) (1) et Cys-(A42-A99)-( $\alpha$ thioalkylester) (2). Le peptide (1) réagit sélectivement avec la cystéine du peptide (2) par une réaction de ligation cinétiquement contrôlée (KCL) en absence de thiol pour former le fragment (A1-A99)( $\alpha$ thioalkylester). Cette sélectivité est due à la grande réactivité

intrinsèque des ( $\alpha$ thioarylester). Le fragment peptidique Cys-Gly<sub>4</sub>-(B1-B99) est obtenu par ligation chimique native (NCL). Après purification, ces deux fragments, sont reliés par NCL pour former le polypeptide final. Cependant, la réactivité de la fonction sulfhydryl de la Cys<sup>41</sup> a engendré la formation de deux sous-produits contraignant les auteurs à alkyler cette dernière avec du 2-bromoacétamide. Le résultat est la formation de pseudo liaison  $\psi$ -Gln aux différents sites de ligation.

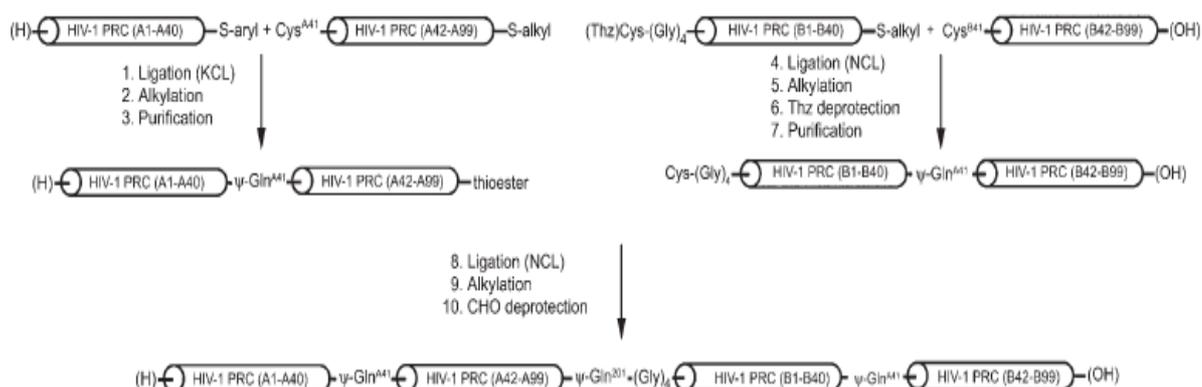


Figure 39 : Synthèse de la de la HIV-1 protéase d'après Torbeev et Kent  
*S-aryl*=4-mercaptophenylacetic acid thioester, *S-alkyl*=3-mercaptopropionic acid tetraarginine amide  
 KCL=kinetically controlled ligation, NCL= native chemical ligation, Thz=thiazolidine

Un autre exemple remarquable de couplage orthogonal en solution avec la formation de liaison de même type a été développé au laboratoire par Gaëlle-Anne Cremer *et al.* (2004). Son approche a été de jouer sur la réactivité du cétoaldéhyde et du méthylaldéhyde vis-à-vis d'un partenaire aminoxy.

la synthèse de la chimère Muc(Muc)PADRE (1) consiste à condenser les deux partenaires Aoa-Muc (3) et Aoa-PADRE (2) sur un synthon MUC dialdéhyde masqué (4) qui est le peptide MUC(Ser)Acétal, (Figure 40). Ce dernier possède deux fonctions aldéhydes positionnées coté C-terminal en position branchée et protégées de façon orthogonale.

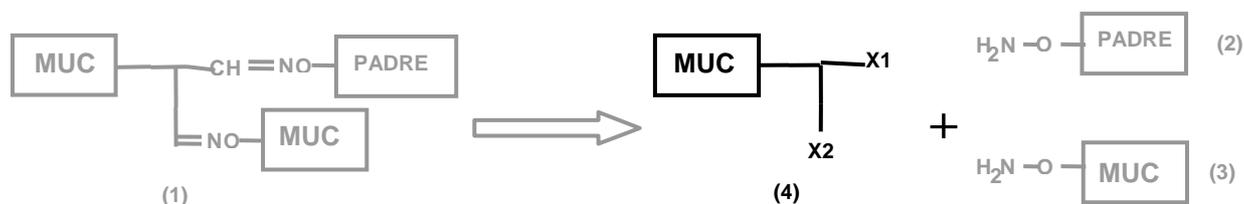


Figure 40 : Représentation du synthon MUC dialdéhyde masqué (4)  
 X1 et X2 : fonctions aldéhydes masquées de façon orthogonale

La première fonction aldéhyde masquée X1 a été introduite sous forme d'un acétal obtenu par aminolyse du bras PAM. Le bras PAM est stable en milieu basique ainsi qu'en milieu acide moyen, il est par contre sensible aux attaques nucléophiles. L'utilisation de ce bras, permet donc de réaliser l'élongation du peptide selon la stratégie Fmoc/tBu, de déprotéger les chaînes latérales du peptide, puis d'effectuer un déplacement nucléophile par le diméthyl acétaldéhyde diméthylacétal. La fonction acétal du peptide obtenu peut alors être déprotégée en milieu acide.

La deuxième fonction aldéhyde masquée X2 a été introduite sous forme d'un 2-aminoalcool. Il s'agit d'une sérine couplée sur le  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> d'une lysine introduite en position C-terminale de la séquence MUC1. Une alanine a été ajoutée coté C-terminal de cette lysine car les acides aminés encombrés sont connus pour influencer défavorablement les rendements de réactions lors de déplacements nucléophiles.

Les deux fonctions aldéhyde seront obtenues par une déprotection au TFA de l'acétal d'une part et par oxydation de la sérine par NaIO<sub>4</sub> d'autre part.

A partir du synthon Muc(Ser)Acétal (4) possédant deux fonctions aldéhyde potentielles, deux stratégies de synthèse sont envisageables suivant l'ordre des réactions de ligation (Figure 41).

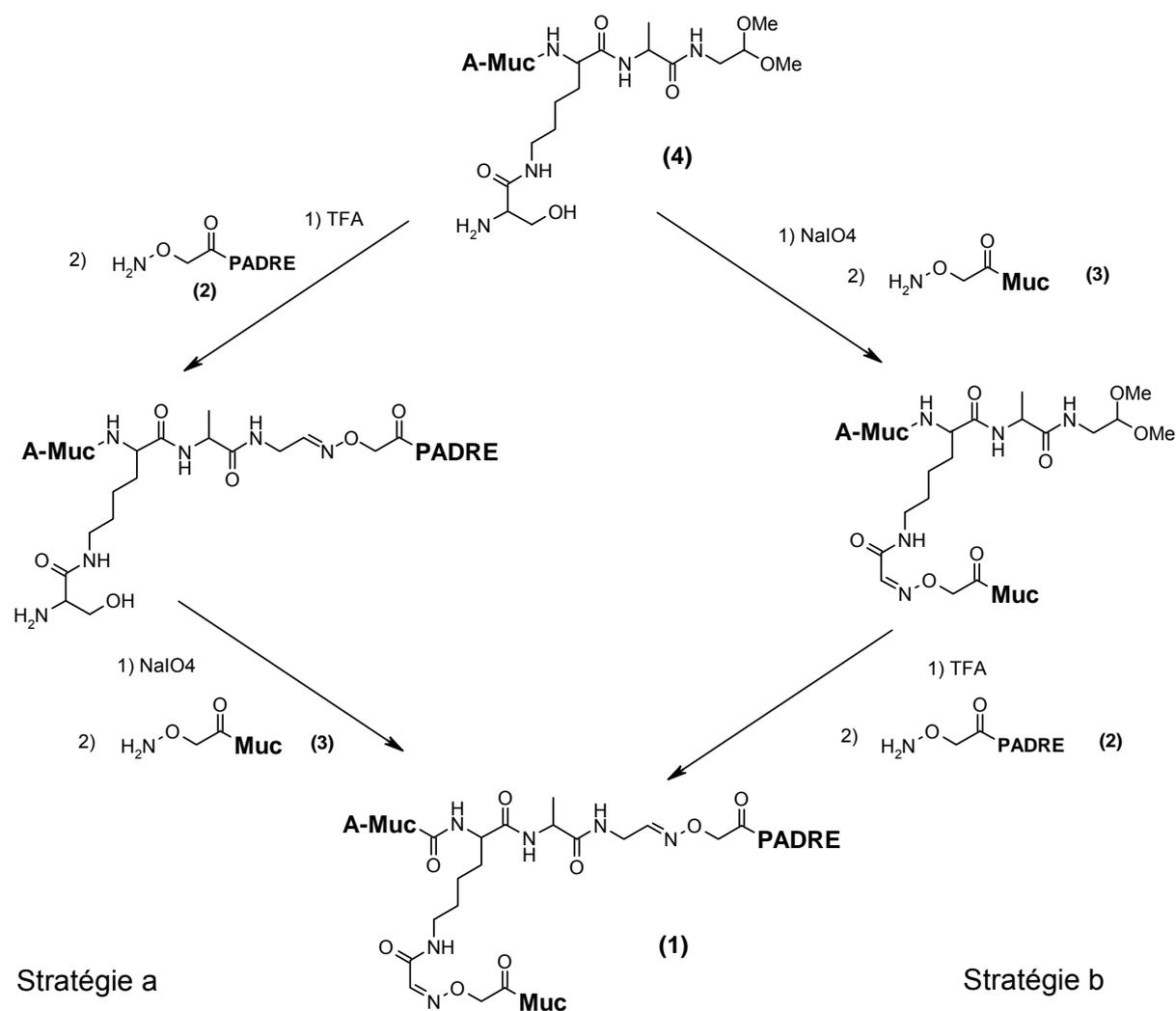


Figure 41: Stratégie de ligation de la chimère Muc1(Muc1)PADRE (1)

Selon la stratégie testée précédemment (stratégie a) (Lelièvre *et al.* 2001), la première ligation était effectuée sur le méthyl aldéhyde après déprotection de l'acétal. Suivait alors la seconde ligation sur le cétoaldéhyde après oxydation de la sérine par  $\text{NaIO}_4$ . Il s'est cependant avéré que la seconde ligation sur le cétoaldéhyde, beaucoup plus lente que la ligation sur le méthylaldéhyde, était accompagnée d'une réaction de transoximation. Afin d'éviter cette réaction secondaire Gaëlle-Anne a choisi de réaliser la réaction la plus lente, celle sur le cétoaldéhyde, en premier. La synthèse de la chimère **1** a donc été réalisée selon la stratégie b. Le partenaire Aoa-Muc (**3**) a été ajouté dans le milieu contenant le cétoaldéhyde et la réaction de ligation a été suivie par HPLC. Après 20 heures, la réaction est complète à environ 90%. Le produit issu de la première ligation est purifié en présence du partenaire Aoa-PADRE (**2**). Ainsi, l'aldéhyde généré lors de la purification, de l'évaporation des fractions, de la

lyophilisation ou du traitement TFA, réagit immédiatement avec le partenaire aminooxy pour former in situ la chimère (1) attendue.

La réaction a ensuite été menée à terme par un traitement au TFA et la chimère (1) a été purifiée par HPLC sur une colonne C4 puis lyophilisée. Après optimisation des différentes étapes de la synthèse, le rendement global est de 10%. Si l'on remplace le peptide PADRE par l'unique résidu aminooxy, le rendement obtenu est de 25%.

Ces récentes stratégies convergentes et « one-pot », en solution, visant à réduire des étapes intermédiaires de purification permettent d'augmenter le rendement final (40% au final pour la crambine de Kent constituée de 46 acides aminés) mais dans la plupart des cas, et après plusieurs ligations, une accumulation de produits secondaires rend la purification du polypeptide envisagée difficile (6,7% au final pour Torbeev).

### **III.1. 2. La multiligation avec des liaisons de différents types (mixtes)**

Un des premiers exemples de multiligation décrit avec des liaisons non-natives est la synthèse du facteur de transcription cMyc-Max (Canne *et al.* 1995). Les deux protéines cMyc et Max forment un hétérodimère non covalent stable capable de se fixer sur l'ADN et d'activer la transcription. Afin de faciliter l'étude de cette interaction un hétérodimère covalent des protéines cMyc et Max tronquées a été assemblée par trois ligations (Figure 42). Dans un premier temps, une ligation thioester a permis de former les fragments cMyc et Max. Après purification de chacun des monomères, la fonction aminooxy de cMyc réagit avec la fonction aldéhyde de Max pour donner un hétérodimère lié par ligation oxime. Le dimère covalent ainsi synthétisé a montré la même affinité pour l'ADN que le dimère non covalent.

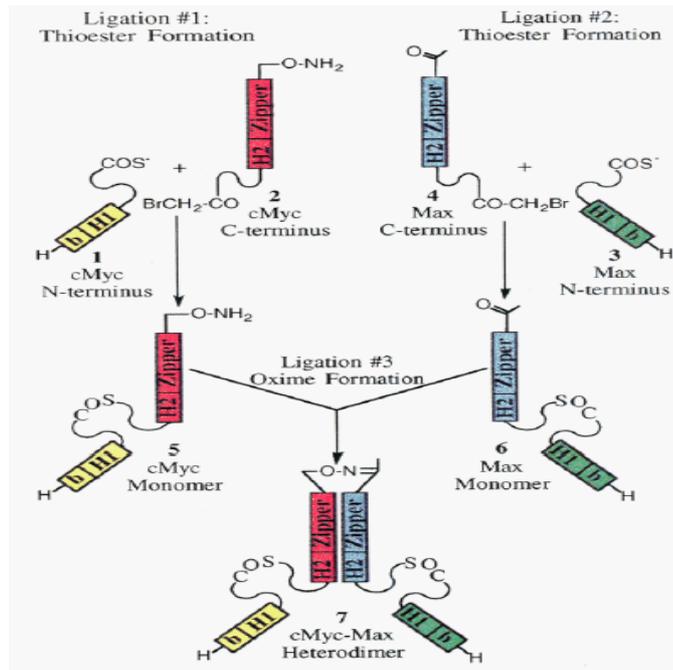


Figure 42 : Synthèse de l'hétérodimère covalent cMyc-Max par trois ligations (Canne et al)

Un deuxième exemple est illustré par les travaux de Miao et Tam (2000) utilisant une stratégie de synthèse avec trois fragments reliés par une liaison pseudoproline et une liaison native (Figure 43). Les trois fragments mis en jeu sont le fragment N-terminal (N) fonctionnalisé coté C-terminal par un aldéhyde, le fragment interne (M) fonctionnalisé côté N-terminal par une cystéine et côté C-terminal par un thioester et le fragment C-terminal (C) fonctionnalisé par une cystéine. L'orthogonalité des deux ligations repose ici sur les conditions de pH. La première étape est la formation d'une thiazolidine entre le fragment N et le fragment M. Cette réaction s'effectue à pH acide, la ligation native inter ou intra-moléculaire pouvant avoir lieu avec le fragment M est inhibée. Après purification du fragment NM, celui-ci est couplé au fragment C par une ligation native. Cette deuxième étape s'effectue à pH légèrement basique permettant également le réarrangement de la liaison thiazolidine pour former une pseudoproline.

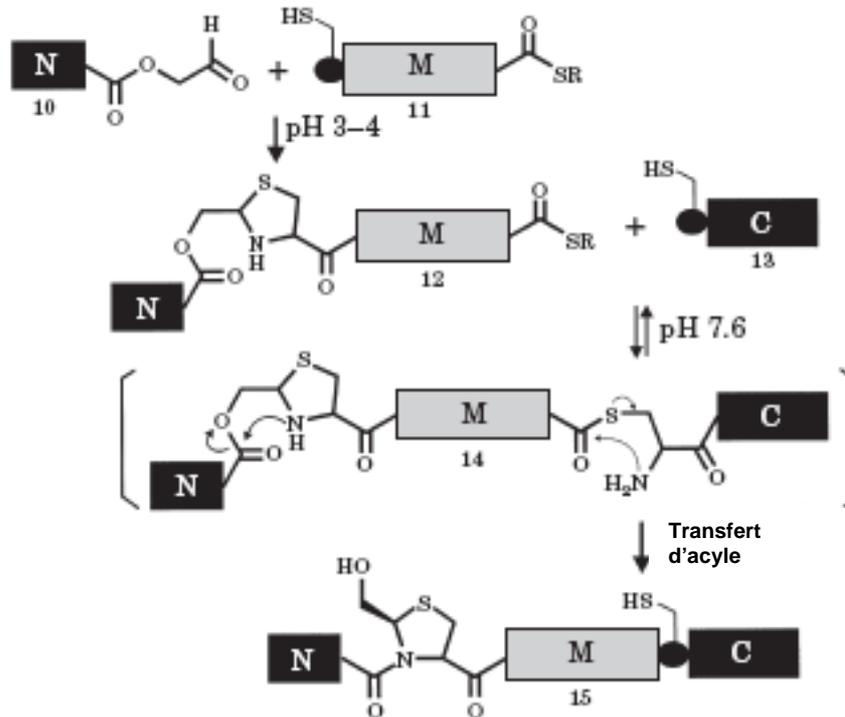


Figure 43 : Stratégie de double ligation par liaison de « type » pseudoproline et une liaison native (d'après Miao et Tam)

La préparation d'un analogue de la SEP (Synthetic Erythropoiesis Protein), une glycoprotéine de 51 Kda, est un exemple remarquable de synthèse par multiligation chimique (Kochendoerfer *et al.* 2003). L'érythropoïétine est une hormone glycosylée qui régule la prolifération, la différenciation et la maturation des cellules érythropoïétiques. Cette glycoprotéine possède un squelette peptidique de 166 résidus et quatre sites de glycosylation. La SEP qui a été synthétisée contient le même squelette peptidique que l'Erythropoïétine naturelle. La partie osidique a été mimée par deux polymères branchés de longueur définie et possédant huit charges négatives. La synthèse a été réalisée à partir de quatre fragments peptidiques (Figure 44). La première étape a consisté à condenser les polymères sur les fragments N- et C-terminaux par une liaison oxime. Les quatre fragments ont ensuite été condensés par ligation native pour former le squelette peptidique.

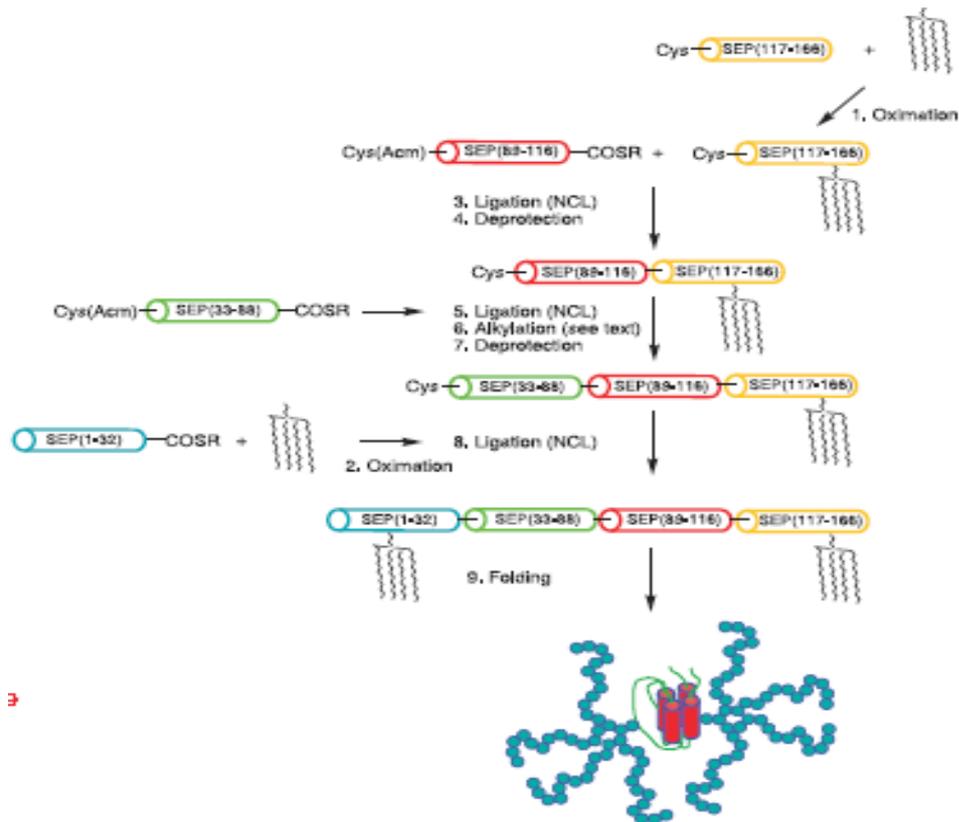


Figure 44: Synthèse de la SEP (Synthetic Erythropoietin Protein) (Kochendorfer et al)

Lors d'études réalisées in vitro et in vivo, la SEP a montré une activité similaire à celle de l'érythropoïétine naturelle mais avec une durée d'action significativement augmentée.

### III.1. 3. La multiligations pour la synthèse de dendrimères

Les différents exemples cités précédemment montrent l'étendue des possibilités qu'offre la ligation chimique pour la synthèse de protéines. La combinaison de différentes ligations orthogonales, l'utilisation éventuelle de groupes protecteurs, sans oublier l'«expressed protein ligation» qui permet l'obtention de fragment de taille importante permet d'imaginer de nombreuses voies de synthèses adaptables suivant la protéine cible. Une approche originale développée il y a maintenant vingt ans a conduit à la formation de dendrimères, édifices complexes tels que les TASP (Template Assembled Synthetic Peptide) ou les MAP où plusieurs copies d'un peptide sont couplés simultanément sur une matrice possédant plusieurs fonctions réactives identiques.

### III. 1. 3. 1. Les MAP

Mis au point par Tam, les MAP (Multiple Antigenic Peptide) (1988) sont composés d'un noyau de lysines branchées portant plusieurs fonctions amines sur lesquelles sont couplées plusieurs copies peptidiques (Figure 45). Ceci conduit à l'obtention d'une structure bien définie dont le noyau de lysine ne représente plus qu'une faible proportion et est non immunogène.

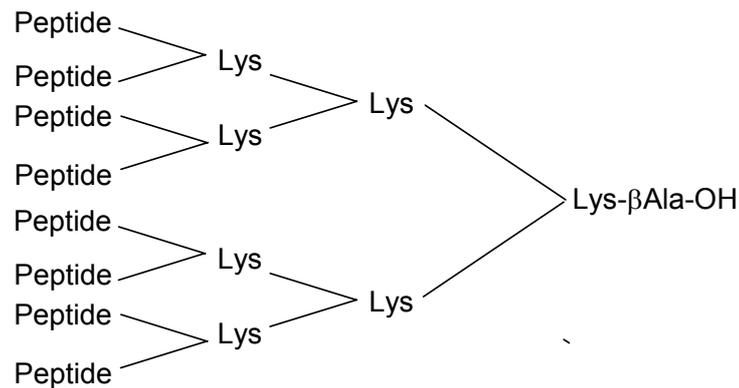


Figure 45: MAP à 8 branches (d'après Tam)

Le concept de MAP était un bon modèle pour la synthèse de vaccins synthétiques. Cependant leur synthèse par SPPS conduisait le plus souvent à des molécules non homogènes du fait de l'accumulation de couplages incomplets. La formation de MAP par ligation chimique a permis de s'affranchir de ces problèmes.

Rose et ses collaborateurs (1996) ont synthétisé des MAP à huit branches avec des liaisons oxime (Figure 46) ou hydrazone à partir d'un noyau de huit lysines branchées et de l'insuline porcine fonctionnalisée par une fonction aminoxy ou hydrazide.

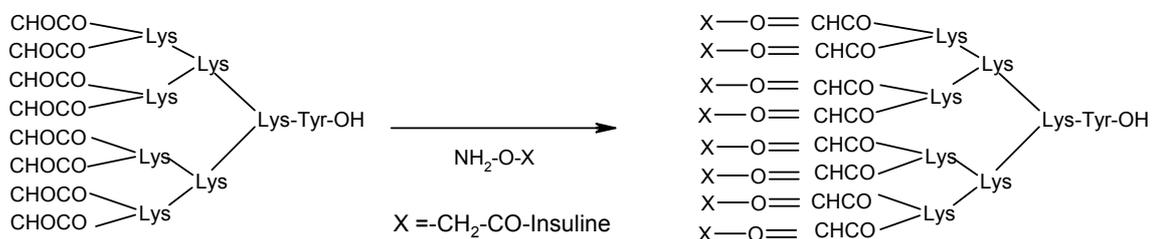


Figure 46 : Formation d'une octaoxime avec l'insuline porcine (Rose et al)

Selon ce principe de MAP obtenu par ligation chimique, deux candidats vaccins ont été synthétisés par liaison oxime. L'un possède quatre copies d'un peptide issu du virus de la grippe (Figure 47a) (Zheng *et al.* 2000) et l'autre contient quatre copies d'un peptide constitué des épitopes B, T-cytotoxique et T-auxiliaire de la protéine de la malaria

(Figure 47b) (Nardin *et al.* 2001). Les deux constructions se sont révélées être de très bon immunogènes chez la souris (Zheng *et al.* 2000) ou en étude clinique de phase (Nardin *et al.* 2001).

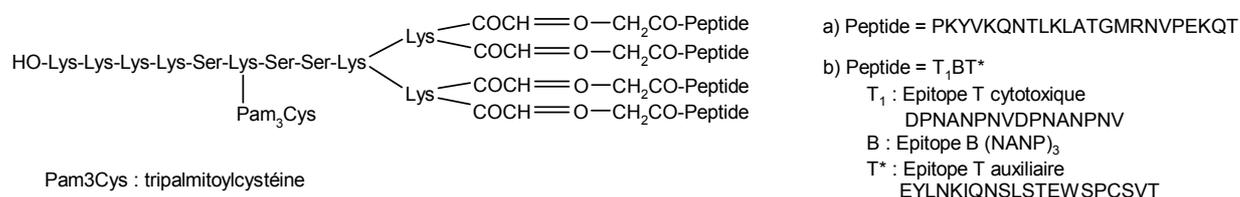


Figure 47 : Vaccins synthétiques sous forme de MAP obtenu par ligation oxime  
 a : vaccin contre la grippe (d'après Zheng *et al.*) ; b : vaccin contre la malaria (d'après Nardin *et al.*)

### III. 1. 3. 2. Les TASP

Le concept de TASP (Template Assembled Synthetic Proteins) a été introduit par Mutter et ses collaborateurs pour contourner le problème du repliement des protéines (Mutter et Vuillemer. 1989). Selon cette approche, des unités peptidiques ayant une structure secondaire inhérente sont fixées sur une matrice de topologie définie, permettant ainsi le repliement des peptides selon une structure tertiaire. Pour la synthèse de telles protéines, la ligation chimique est une bonne alternative à la stratégie convergente utilisant des peptides protégés. Ainsi plusieurs synthèses de TASP basées sur des liaisons thioester (Dawson et Kent. 1993), thioéther (Rau et Haehnel. 1998), thiazolidine (Mathieu *et al.* 2000) ou oxime (Kochendoerfer *et al.* 2002) ont été réalisées.

Dans ce dernier exemple Kochendoerfer et ses collaborateurs ont appliqué le principe des TASP pour l'étude du canal ionique MscL (Mechanosensitive channel Large) de *Mycobacterium tuberculosis*. Celui-ci est constitué d'un peptide de 151 acides aminés dont la structure cristalline révèle deux régions adoptant une structure secondaire hélicoïdale arrangées sous forme d'homopentamère. Le domaine C-terminal 103-151 en solution à pH neutre ne présente aucune structure secondaire. Par contre, la fixation de ce peptide fonctionnalisé par un aminoxy sur une matrice portant cinq fonctions cétone induit une structure secondaire.

Dans une étude récente Boturyn et ses collaborateurs (2004) ont également utilisé la liaison oxime pour la fixation d'un ligand de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  sur un RAFT

(Regioselectively Adressable Functionalized Template). Les RAFT sont des décapeptides cycliques contenant deux types de site de fixation protégés de façon orthogonale et orientés vers les deux faces opposées du squelette peptidique (Dumy *et al.* 1995). A partir des deux RAFT (1) et (2) dont les chaînes latérales des lysines d'une face sont protégées par des Boc et celles de l'autre face protégées par des Alloc (Figure 48), Dumy et ses collaborateurs ont préparé les composés de type (3) et (4) sur lesquels le cyclopeptide c[RGFV-1] reconnu par l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  a été condensé par des liaisons oxime afin d'obtenir les composés de type (5).

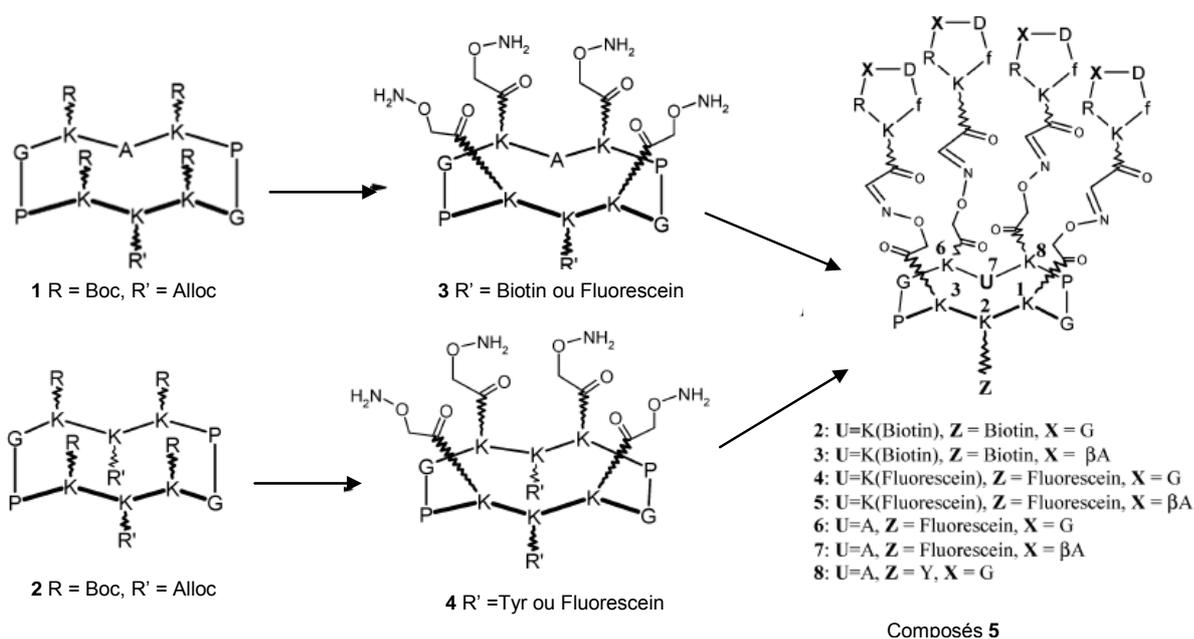


Figure 48 : Synthèse de RAFT (Boturyn *et al*)

### III. 1. 3. 3. Les CAT

La conception modulaire de nouvelles molécules conjuguées qui peuvent combiner une fonction de ciblage cellulaire (ligand) avec des molécules cytotoxiques (récepteur) a été développée par Garanger *et al* (2006) (Figure 49). Cette approche utilise un intermédiaire clé appelé châssis spécifiquement chimiosélectif (CAT=Chemoselectively Addressable Template). Ce peptide cyclique possède sur une face, des fonctions aminoxy et sur l'autre face, des fonctions aldéhyde. Les deux composés, ligand et récepteur sont reliés au CAT par liaisons oxime. Ce système a permis d'obtenir efficacement des vecteurs synthétiques combinant un système RAFT(c[-RGDfK-])<sub>4</sub> avec un peptide ou un oligonucléotide cytotoxique.

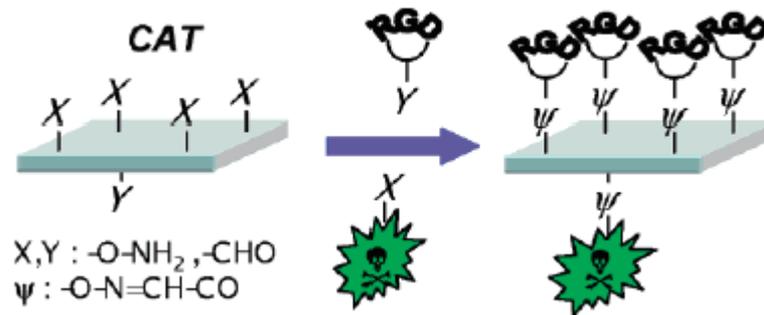


Figure 49: Synthèse de CAT (Garanger et al)

### III.2. En solution et sur support solide

Nous avons vu dans le chapitre sur la ligation chimique native que cette dernière est généralement limitée par l'emploi en milieu aqueux de peptides  $\alpha$ -thioesters, éléments essentiels de la stratégie, sensibles à l'hydrolyse et à d'autres réactions. Camarero *et al* (1998) (Figure 50) ont proposé une méthodologie permettant d'obtenir du côté C-terminal, un peptide  $\alpha$ -thioester déprotégé et fixé sur une résine. La réaction avec un peptide également déprotégé et possédant une cystéine du côté N-terminal va couper le peptide thioester de son support par transthioestérification et former en solution la liaison amide au site de ligation. Ainsi, les auteurs s'affranchissent de la manipulation de ces thioesters et augmentent significativement le rendement de la synthèse. La résine PEGA (polyéthylène glycole-poly-(N, N-diméthylacrylamide) est fonctionnalisée en trois étapes pour former une résine 3-mercaptopropionamide-PEGA (HS-PEGA) sur laquelle le peptide peut être assemblé en stratégie Boc. La stabilité de la liaison thioester propionamide au traitement à l'acide fluorhydrique (HF) permet la déprotection des chaînes latérales sans couper le peptide de la résine. La cystéine située du côté N-terminal est protégée au niveau de l'azote par un 2-(méthylsulfonyl)éthylloxycarbonyl (Msc) baso-labile. La faisabilité de cette stratégie a été appliquée sur un polypeptide de 79 acides aminés, construction protéique destinée à étudier le rôle des interactions intramoléculeuses ligand-récepteur impliquées dans la régulation du signal de transduction du domaine Abl-SH3. Ce polypeptide a été obtenu à partir de trois fragments peptidiques et deux ligations natives en milieux neutre aqueux dont l'une a lieu sur support solide et l'autre en solution.

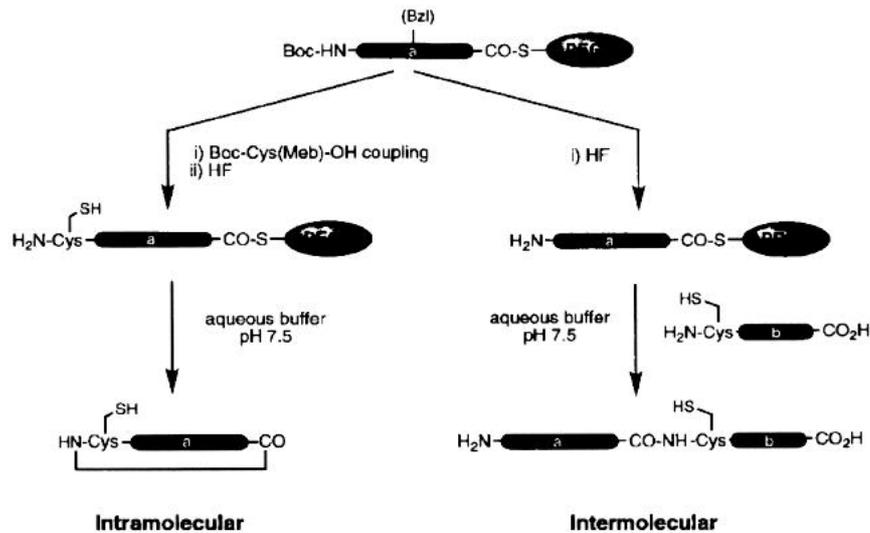


Figure 50 : Synthèse d'un polypeptide selon Camarero et al

### III.3. Multiligation sur support solide

La synthèse de protéines ou analogues de protéines contenant plus de trois fragments peptidiques en solution est rare en raison, d'une part, des contraintes imposées par le choix des protections temporaires des fragments intermédiaires et d'autre part, de la décroissance continue du rendement. En effet, chaque intermédiaire de synthèse nécessite une étape de purification qui peut être longue et fastidieuse avant d'engager une nouvelle réaction de ligation (Wilken et Kent. 1998). Il en résulte des rendements inférieurs à 15% pour une ligation incluant trois fragments (Beligere et Dawson. 2000) et inférieur à 10% pour une ligation avec quatre fragments (Hackeng *et al.* 1999).

Pour éviter ces étapes de purification intermédiaires, une nouvelle approche appelée ligation chimique sur phase solide (SPCL) et basée sur la synthèse organique sur support polymérique, permettra la construction de grands polypeptides (synthèse non publiée de Lu Wuyuan d'un polypeptide de 28kD impliqué dans l'activation d'un domaine catalytique à partir de 7 fragments peptidiques) et d'accéder à la synthèse chimique totale de protéines (Figure 51).

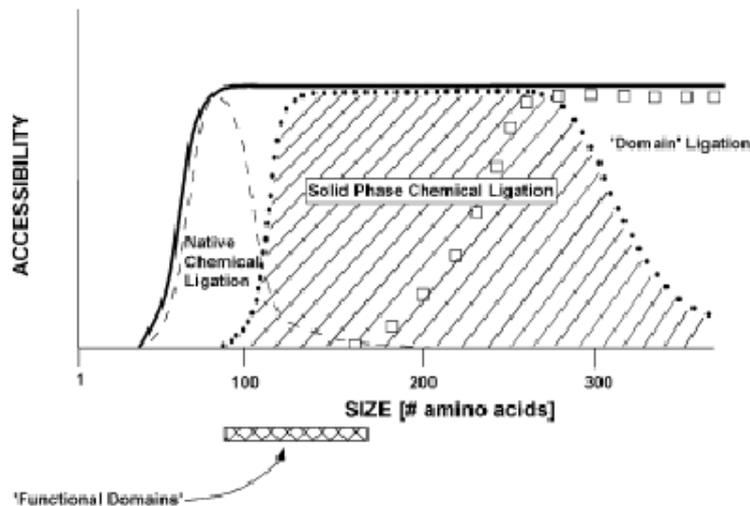


Figure 51 : Taille de polypeptides synthétiques accessibles par SPCL (d'après Dawson et Kent. *Annu. Rev. Biochem.* 2000)

Notons que ce schéma reste théorique car il n'a pas encore été validé par de nombreuses synthèses. De plus, à ce jour, on considère que les résines utilisées ne permettent pas la synthèse de protéines de haut poids moléculaire du fait d'une diffusion difficile des partenaires.

Cependant, l'emploi du support solide a de nombreux avantages : il permet de changer facilement les conditions opératoires nécessaires aux différentes étapes du cycle synthétique; l'élimination des groupes protecteurs, la rapidité et l'efficacité de la synthèse. En outre, la facilité d'élimination d'un des réactifs en excès permet d'utiliser une concentration de fragments peptidiques plus importante susceptible d'accroître la cinétique de réaction et par conséquent l'accession plus rapide au produit final.

De plus, pour certaines classes de protéines, comme les membranes protéiques, un problème supplémentaire de solubilité de ces composés dans les solvants de ligation limite leur synthèse. A l'heure actuelle, il n'existe pas de stratégie efficace pour solubiliser des intermédiaires impliqués dans les réactions de ligation chimique sans effectuer des modifications sur les fragments peptidiques. Une alternative élégante pour obtenir des composés à caractère hydrophobe et donc peu soluble consiste à les élaborer sur support solide par ligation chimique. En effet, les problèmes de solubilité des polypeptides générés au cours de la synthèse sont réduits dans la mesure où leur fixation sur un support polymérique solvato, minimisent les phénomènes d'aggrégation (Kent *et al.* 1998).

Cette méthode nécessite la prise en compte de plusieurs paramètres :

- le choix du support solide qui doit être compatible avec des réactions chimiques se déroulant en milieu aqueux.
- le choix du bras ou linker qui doit permettre l'accrochage du premier fragment les différentes ligations, la déprotection spécifique des fonctions temporaires protégées puis le décrochage du polypeptide final du support polymérique.
- la stratégie orthogonale adoptée pour le groupe protecteur de la fonction N-terminale des fragments médians qui a déjà été abordée tout au long de ce chapitre.

La ligation chimique sur support solide peut se dérouler de la direction N vers C ou bien de la direction C vers N. Cependant, un seul cas fait mention d'une stratégie sur support solide dans la direction N vers C (Canne *et al.* 1999) et quelques cas seulement dans le sens C vers N.

La synthèse du polypeptide [GV-PLA<sub>2</sub>(1-118)] réalisée par Canne *et al* (1999) (Figure 52) a été effectuée à partir de 4 fragments. L'originalité de cette synthèse réside dans l'utilisation de deux résines de propriétés physico-chimiques différentes: le support utilisé pour les réactions de multiligations est une résine de cellulose possédant un groupe aminoxy en position N-terminale. Le fragment C-terminal possédant le bras espaceur carboxyamidométhyl (CAM) [-OCH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>] est synthétisé sur une résine hydrophobe de type styrène-divinylbenzène (S-DVB) en stratégie Boc/HF. Une fonction cétone est formée sur la chaîne latérale d'une lysine par action de l'acide lévulinique [fragment O-CAM-Lys(lévulinate)]. Après coupure de la résine et purification, ce fragment est relié au support de cellulose par une réaction chimiosélective oxime en milieu acide aqueux (pH=4,6).

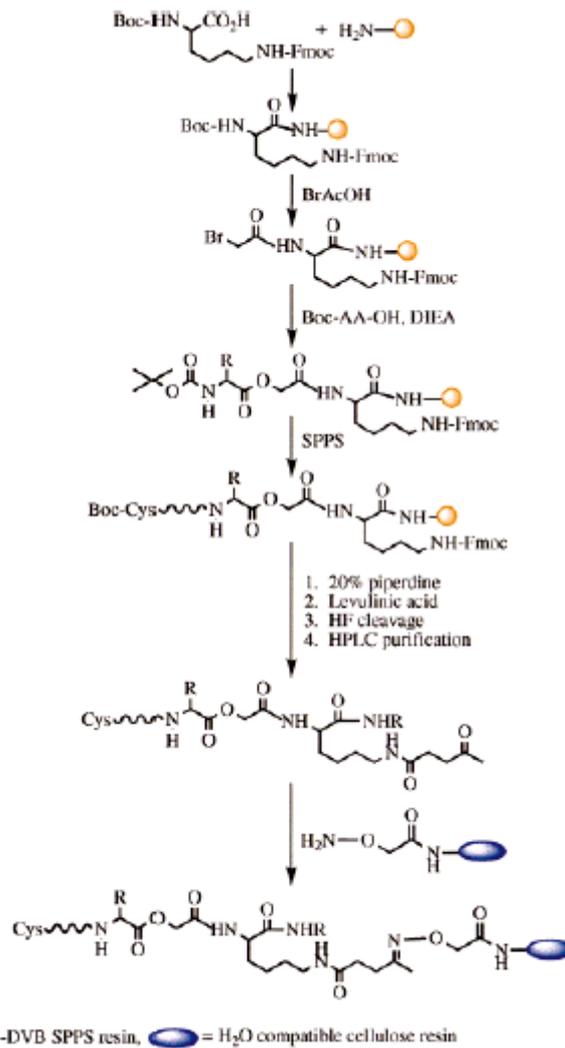


Figure 52: Synthèse dans la direction N vers C d'après Canne et al

Le fragment intermédiaire possède une cystéine du côté N-terminal protégée par un groupe acétamidométhyl (Acm) [-CH<sub>2</sub>NHCOCH<sub>3</sub>] et une fonction thioester du côté C-terminal [Cys(Acm)peptide<sup>α</sup>COSR]. La première ligation native entre le fragment C-terminal et le fragment médian se déroule à pH=7 puis le groupe Acm est éliminé par un traitement à l'acétate mercurique (Greene *et al.* 1991). Une deuxième et troisième ligation se déroule selon le même schéma et le polypeptide final [GV-PLA<sub>2</sub>(1-118)] est décroché du support polymérique par un traitement basique aqueux conduisant à une extrémité C-terminale carboxylate.

Une autre approche de la ligation chimique sur une résine de sépharose développée par Brik et collaborateurs (2000) a permis la synthèse d'une chimiokine, la vMIP-I, constituée par 71 acides aminés et deux ponts disulfures à partir de trois fragments en stratégie Boc/HF et dans la direction C vers N (Figure 54). Le linker SCAL (Safety Catch Acid-labile Linker) (Figure 53) développé par Patek et Lebl (1991) est stable sous sa forme oxydée et il est compatible avec de très nombreuses stratégies utilisées en synthèse peptidique. La réduction de la fonction aryle sulfoxyde en aryle sulfide par du tetrachlorure de silicium ( $\text{SiCl}_4$ ) par exemple, rend le bras SCAL acido-labile et un traitement à l'acide trifluoroacétique (TFA) permet de couper le peptide du support polymérique. Cette dernière étape peut-être visualisée par la disparition progressive de la couleur bleue de la solution due à la capture du carbocation benzhydryle par des pièges comme l'éthanedithiole, le thioanisole ou encore le méta-crésol.



Figure 53: Schéma du SCAL d'après Patek et Lebl

Les trois entités ont été préparées et purifiées à partir d'une résine TAMPAL (Trityl-Associated Mercaptopropionic-Acid Leucine) qui permet d'obtenir un peptide thioester du côté C-terminal après décrochage (Hackeng *et al.* 1999). La fonction thiol de la cystéine située du côté N-terminal des deux premiers fragments est protégée par un groupe acétamidométhyl (Acm) ou 2-(methylsulfonyl)ethyl carbonate (Msc) Le premier fragment qui contient le linker SCAL et un dipeptide glycine-glycine, est condensé par ligation chimique native en milieu aqueux sur le support solide qui est une résine de sépharose fonctionnalisée par une cystéine. La déprotection du groupe Acm (Veber *et al.* 1972) ou Msc (Muir *et al.* 1997) s'effectue dans les conditions classiques et les deux autres ligations natives sont réalisées. Une acidolyse réductrice permet de couper le polypeptide de la résine avec une extrémité C-terminale carboxamide. Une oxydation à l'air en milieu aqueux neutre conduit à la formation des deux ponts disulfures.

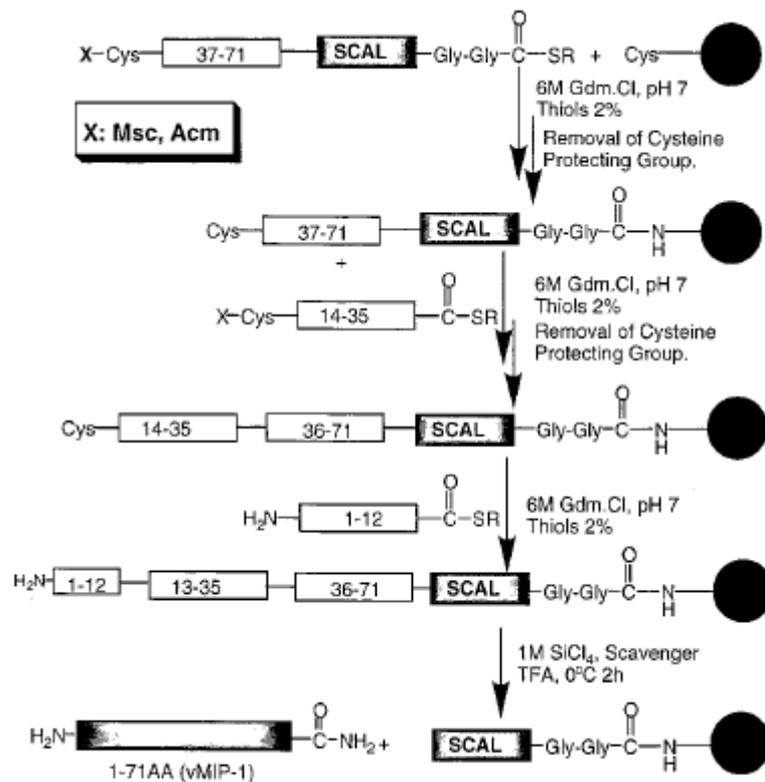


Figure 54 : Synthèse de la vMIP-1

Le troisième exemple est la synthèse d'un inhibiteur de la trypsine, EETI-II, par trois ligations chimiques natives sur phase solide en stratégie Boc/HF et dans la direction C vers N (Johnson *et al.* 2006) (Figure 55). Ce peptide issu de la famille des courges a été synthétisé sur une résine de type PEG [poly(éthylène glycole)] dénommée SPOCC (superpermeable organic combinatorial chemistry) [Rademann. *et al.* 1999 ; Grotli *et al.* 2000; Miranda *et al.* 2002] en raison de sa très bonne solvatisation et de sa nature très perméable permettant la diffusion de la trypsine au sein du réseau polymérique. L'originalité de leur approche ne réside pas dans la taille de la molécule finale obtenue mais concerne l'analyse de l'activité inhibitrice de l'EETI-II sur la trypsine en dépit de sa fixation sur le réseau polymérique. Une Glycine protégée par un groupe Fmoc est fixée sur la résine SPOCC via un linker acido-labile. Après la déprotection du Fmoc de la glycine, une cystéine protégée sous la forme d'un acide (4R)-1,3-thiazolidine-4-carboxylique (Thz) et protégé par un Fmoc sur l'azote, est couplé (Villain *et al.* 2001). Le groupe Fmoc est enlevé et la thiazolidine est convertit en cystéine par un traitement au chlorhydrate de méthoxylamine. La première ligation native sur support solide peut avoir lieu avec le premier fragment 19-26 dont la cystéine N-terminale est également protégée sous la forme d'une thiazolidine. Le cycle se répète deux autres

fois avec les fragments 9-18 et 1-8. L'oxydation à l'air dans un tampon phosphate à pH=8 pendant 36 heures permet d'obtenir le bon repliement.

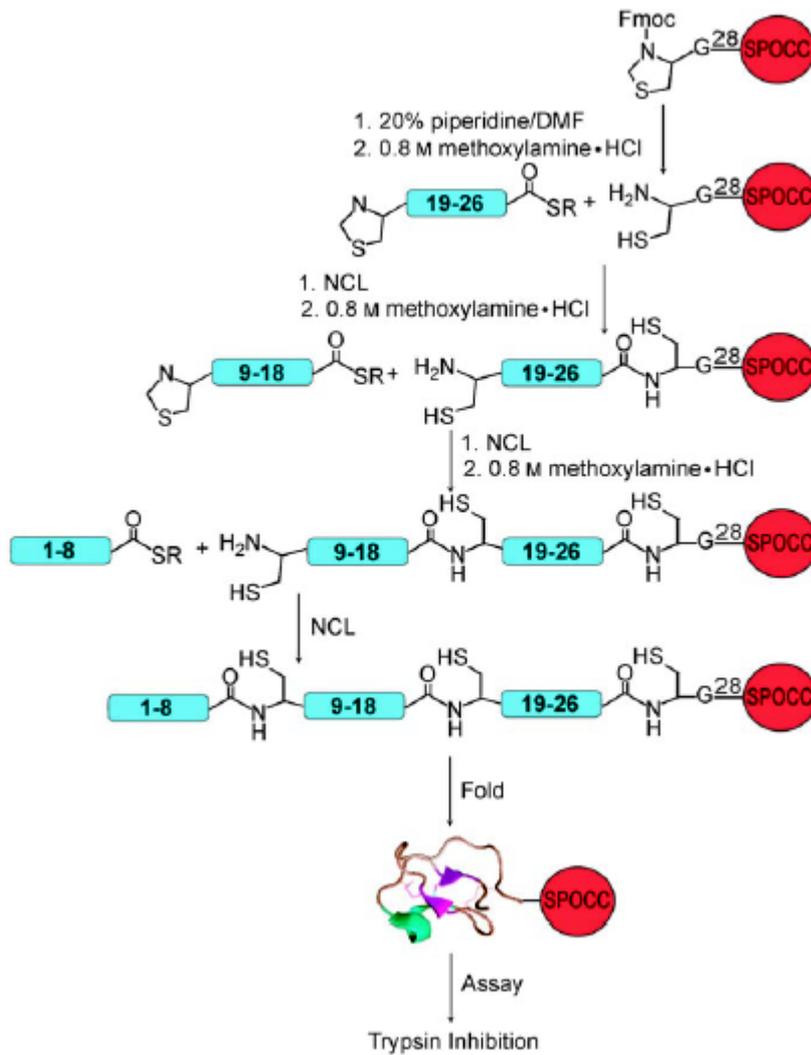


Figure 55 : Synthèse de l'EETI-II

## **Conclusion :**

Les 3 exemples ci-dessus ont permis l'obtention de polypeptides sur phase solide de taille variée par des stratégies originales en milieu aqueux. La nature de ce support semble être le paramètre fondamental permettant l'accession à des édifices macromoléculaires : il doit être inerte, stable chimiquement aux conditions de déprotection, de ligation, de coupure et posséder de bonnes propriétés de solvation quelque soit la ligation envisagée. A ce sujet, très peu d'exemples dans la littérature mentionnent la formation de liaisons non natives au site de ligation (Katajisto *et al.* 2004). Il serait intéressant d'apporter des modifications chimiques au niveau du squelette peptidique afin d'augmenter la résistance à la dégradation enzymatique ou d'étudier les relations structure-activité des protéines avec leur récepteur.

Cette approche de ligation chimique sur support solide (SPCL) nous a semblée particulièrement bien adaptée pour préparer des constructions linéaires contenant plusieurs unités de MUC1 et comparer leurs activités immunogènes avec des constructions branchées déjà obtenues au laboratoire. Le choix d'employer des ligations oxime a été développé dans le chapitre précédent. La synthèse de longs peptides requièrent des temps de réaction plus long en raison probablement de leur lente diffusion au sein du réseau polymérique. Un des aspects les plus connus en chimie sur phase solide est la nécessité d'utiliser les réactifs à des concentrations importantes (en général supérieur à 20mM) afin d'arriver à des réactions quantitatives. Pour des réactifs «précieux» comme les fragments peptidiques déprotégés, cet impératif peut présenter une limitation à l'utilisation de la SPCL. Compte tenu du manque de recul et de l'absence d'exemples utilisant cette approche en stratégie Fmoc/tBu, nous avons décidé d'élaborer une stratégie qui puisse répondre d'une part, à notre objectif de départ et d'autre part, d'essayer d'optimiser certaines étapes de la SPCL comme la synthèse du fragment C-terminal directement sur le support ou le « recyclage des réactifs » comme le fragment médian.

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

# RESULTATS ET DISCUSSION

## I. Rappel des objectifs et modèle biologique

Cette thèse se situe dans un contexte de développement méthodologique dans le but d'obtenir de petites protéines par multiligation sur support solide. Différents critères de faisabilité de notre stratégie ont été étudiés sur des peptides modèles puis appliqués sur un modèle biologique. Nous avons choisi de synthétiser des analogues de la mucine, glycoprotéine située à la surface des cellules épithéliales pour développer de nouveaux candidats vaccins anti-tumoraux.

Les antigènes associés à la forme tumorale de la protéine MUC1 sont des cibles prometteuses pour l'immunothérapie des cancers épithéliaux. Dans ce contexte, nous souhaitons synthétiser des immunogènes qui imiteraient ces antigènes tumoraux afin de stimuler la production d'anticorps spécifiques dirigés contre MUC1 tumorale. De tels immunogènes devront être des composés chimiquement définis.

L'objectif de cette thèse est la mise au point d'une méthode de synthèse de petites protéines linéaires analogues de MUC1 constituées de plusieurs unités de la séquence répétitive  $MUC_a$  et assemblées via des liaisons oxime en suivant une approche de ligation sur support solide (Figures 56 et 57). L'ajout d'un épitope universel T-auxiliaire à nos constructions devrait permettre de stimuler une réponse humorale T-dépendante. Nous avons choisi l'épitope T-auxiliaire PADRE (Pan DR Epitope) dont l'activité biologique est bien documentée (Alexander *et al.* 1994).



Figure 56: Représentation schématique d'un immunogène souhaité contenant 4 unités répétitives  $MUC_a$  et un épitope universel T-auxiliaire.  
Aux T: épitope PADRE;  $\psi$  = liaison oxime;  $MUC_a$ : unité de répétition de MUC1.

## II. Stratégie générale de synthèse

La nomenclature utilisée pour les molécules cibles est présentée Figure 57.

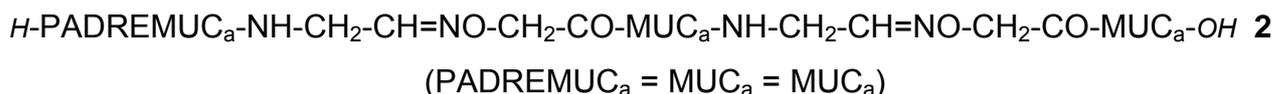
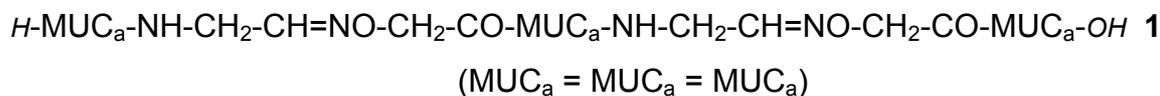


Figure 57: Peptides polyoxime **1** et **2** envisagés au cours de ce travail de thèse.  
 $\text{MUC}_a$ : PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA;  
 $\text{PADRE}$ : aKXVAAWTLKAa avec a: D-Ala et X: Cha

L'approche que nous avons suivie pour la synthèse de **1** et **2** fait intervenir la ligation chimique sur support solide qui combine la synthèse peptidique sur support solide et la méthode de ligation chimique conduisant à des liaisons oxime (Figure 58).

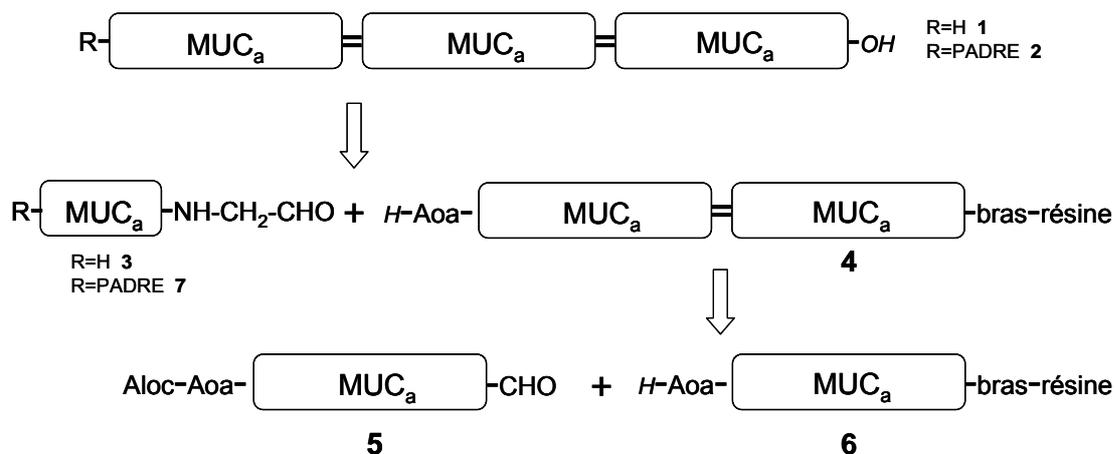


Figure 58 : Schéma rétrosynthétique des peptides polyoxime **1** et **2**

Cette stratégie de synthèse repose sur une approche convergente en phase solide basée sur la condensation par liaison oxime en milieu aqueux de 3 synthons peptidiques déprotégés distincts ; les synthons N-terminal (**3** ou **7**), médian **5** et C-terminal **6**. Le synthon médian **5**, aldéhyde en C-terminal et aminooxy protégé en N-terminal sera synthétisé et condensé sur un peptide nu fixé sur un polymère (fragment C-terminal **6**). Après une première ligation, l'aminooxy sera déprotégé pour conduire à **4** qui sera engagé dans l'étape de ligation suivante avec le fragment N-terminal **3** ou **7** pour donner, après décrochage de la résine, le polyoxime **1** ou **2**.

Outre les préparations des synthons N-terminal (**3** ou **7**), médian **5** et C-terminal **6**, la faisabilité de cette stratégie repose aussi sur les éléments suivants :

- la nature de la résine :

Le support solide doit être insoluble dans les différents solvants, stable chimiquement et physiquement, avoir un bon taux de gonflement et permettre une bonne diffusion des solvants et des réactifs. Elle doit être compatible avec les solvants aqueux et posséder un taux de substitution pouvant permettre un grand nombre de ligations chimiques. Nous avons choisi la résine PEGA (polyéthylèneglycol-polyacrylamide) (Figure 59) développée par Meldal (1992) pour effectuer des réactions enzymatiques sur résine. La polarité de cette résine proche de celle du squelette peptidique est préconisée pour la synthèse de longs peptides (White *et al.* 2000) et de séquences difficiles (Cremer *et al.* 2006).

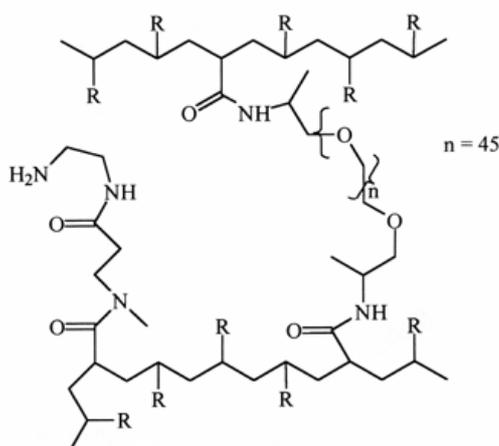


Figure 59: Support polymérique polaire de type PEGA

- la nature du bras:

Cette matrice inerte constitue un réseau polymérique fonctionnalisé sur lequel un bras ou « linker » est fixé ; ce composé, bifonctionnel permet par son autre extrémité d'accrocher dans une très grande majorité, le premier résidu par sa fonction carboxylique. Ainsi, le linker éloigne le peptide du polymère, permettant de diminuer les problèmes d'encombrement stérique. Il sert également de support de la chaîne peptidique en élongation et de groupe protecteur permanent de la fonction acide carboxylique terminale. De plus, il doit permettre l'obtention du fragment C-terminal, peptide déprotégé, accroché sur la résine et le traitement final pour décrocher les

molécules polyoxime **1** et **2**. Pour éviter la refixation du fragment peptidique sur un support après synthèse et purification (Canne *et al.* 1999 ; Brik *et al.* 2000), nous avons opté pour l'obtention directe du peptide résine. Cette approche repose sur la déprotection sélective des chaînes latérales après élongation sans affecter la liaison peptide-résine.

- La stabilité de la liaison oxime en milieu acide:

La ligation oxime est catalysée en milieu acide aqueux (pH=4.6). Cette liaison oxime doit être stable lors des étapes de ligations successives et lors du décrochage du peptide du support.

- La stabilité de la liaison oxime aux conditions de déprotection de l'aminooxy du synthon médian **5**:

Le synthon médian **5**, possède à la fois une fonction aldéhyde réactive et une fonction aminooxy temporairement protégée. Ce groupement protecteur doit être stable lors de la synthèse du fragment médian et sa déprotection ne doit pas affecter la liaison oxime et le lien peptide-résine. Comme nous le décrirons plus loin, c'est le groupement Alloc qui a été retenu.

- L'éventuelle réaction de transoximation lors de la formation de la seconde liaison oxime

### **III. Validation de la stratégie polyoxime sur support solide**

#### **III. 1. Etude de la stabilité de la liaison oxime en milieu acide**

Afin d'étudier la stabilité de la liaison oxime en milieu aqueux acide lors des étapes de ligations successives et lors du décrochage du peptide final de son support, nous avons réalisé au préalable à la synthèse de **1** et **2**, une étude de la stabilité en solution, du peptide **11** (Figure 60) contenant une liaison oxime et déjà synthétisé au laboratoire.

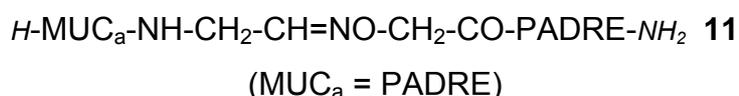


Figure 60 : Peptide 11

● Stabilité dans les conditions de ligation:

Le peptide **11** a été mis en solution, à température ambiante, dans un tampon AcONa à pH 4,6 et 3,6 qui sont des conditions classiques pour la ligation oxime. Sa stabilité, en fonction du temps, a été suivie par HPLC et les résultats sont répertoriés Figures 61 et 62.

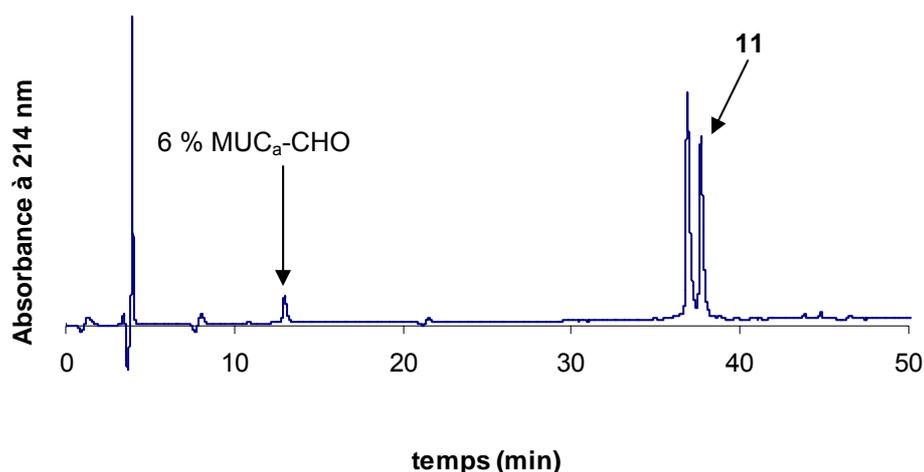


Figure 61 : Chromatogramme HPLC du peptide **11** après 6 jours en solution dans 0,1M AcONa. pH = 3,6 ; gradient : 10-41% B en 50 minutes.

Remarques: La présence de 2 pics correspondant au produit **11** est due à l'isomérisation *cis-trans* de la liaison oxime. L'hydrolyse de la liaison oxime ne fait apparaître qu'un seul des deux composés.

Temps	pH	% hydrolyse
30'	3.6	1
1h30'	3.6	2
1 jour	3.6	3
6 jours	3.6	6
30'	4.6	1
1h30'	4.6	2
1 jour	4.6	2
6 jours	4.6	4

Figure 62 : Stabilité de la liaison oxime en fonction du pH déterminée par intégration des aires des pics HPLC

Les résultats montrent une bonne stabilité dans les conditions de ligation envisagées. Ils sont différents de ceux obtenus par Spinelli *et al* (2007). Ces derniers ont étudié la stabilité en milieu acide, neutre et basique de la liaison méthyloxime au sein d'oligonucléotides conjugués. Dans un tampon phosphate à pH 4 et à une température de 37 °C, ils observent au bout de 5 jours d'expérience, 51% d'hydrolyse de la liaison méthyloxime. L'influence de la séquence et des conditions opératoires (température, nature du tampon, lien  $-(CH_2)_x-CH=NO$  différent du lien méthylène-oxime) employées semblent avoir une incidence directe sur la stabilité de cette liaison et implique donc une étude au cas par cas.

#### ● Stabilité dans les conditions de décrochage final du peptide de son support :

Le peptide **11** a été traité par TFA à 95% en présence de pièges à carbocations (scavengers) comme l'eau et le triisopropylsilane (TIS) pendant 1h30'. L'analyse HPLC a permis de confirmer la stabilité de la liaison oxime dans les conditions de décrochage du peptide de son support (Figure 63).

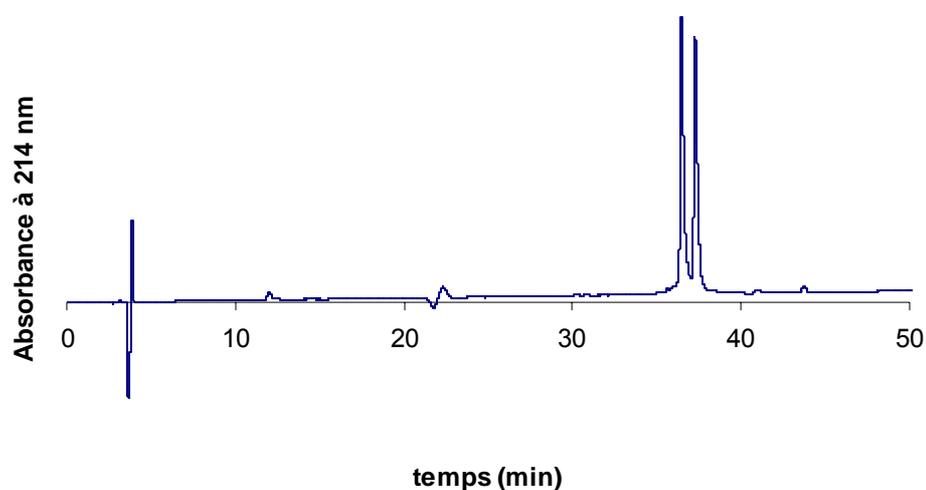


Figure 63 : Chromatogramme HPLC de **11** après traitement TFA à 95% pendant 1h30'.  
gradient : 10-41% B en 50 minutes

#### ● Réaction de transoximation:

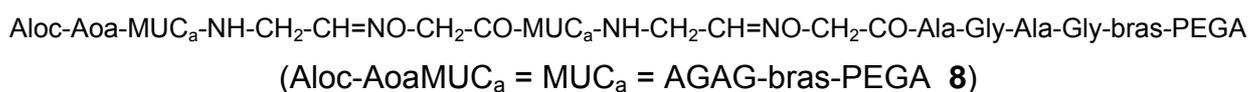
La recherche d'une éventuelle réaction de transoximation (hydrolyse de la liaison qui libère le partenaire Aoa) a été mise au point par la formation d'un cétoxime appelé « adduit acétone ». L'ajout d'acétone à hauteur de 5 équivalents et 100 équivalents sur

un Aoa peptide-résine dans les conditions de ligation pendant 120 minutes ont été réalisées. Une coupure au TFA/H<sub>2</sub>O/TIS pendant 30 minutes suivie d'une précipitation dans un mélange Et<sub>2</sub>O/EP (1/1), une évaporation à sec des solvants et une analyse HPLC et SM ont conclues à une absence de transoximation avec 5 eq d'acétone et une transoximation à hauteur de 50% avec 100 eq d'acétone. Les quantités stoechiométriques des partenaires de ligation seront donc choisies afin d'obtenir une réaction quantitative et éviter cette réaction parasite.

### Conclusion :

Nous avons vérifié la stabilité de la liaison oxime en milieu aqueux acide et lors du décrochage de **11** du support solide. Cela a permis d'évaluer la stratégie dans les conditions de ligation oxime proposée.

### **III. 2. Vers la synthèse de Aloc-AoaMUC<sub>a</sub> = MUC<sub>a</sub> = AGAG-bras-PEGA **8****



Dans le but de valider la stratégie et d'en optimiser les conditions, nous avons synthétisé, dans un premier temps, le peptide résine **8** où la séquence MUC<sub>a</sub> en position C terminale de **1** et **2** a été remplacée par un peptide court (AGAG) ne comportant pas d'acides aminés avec des chaînes latérales fonctionnalisées (Figure 64).

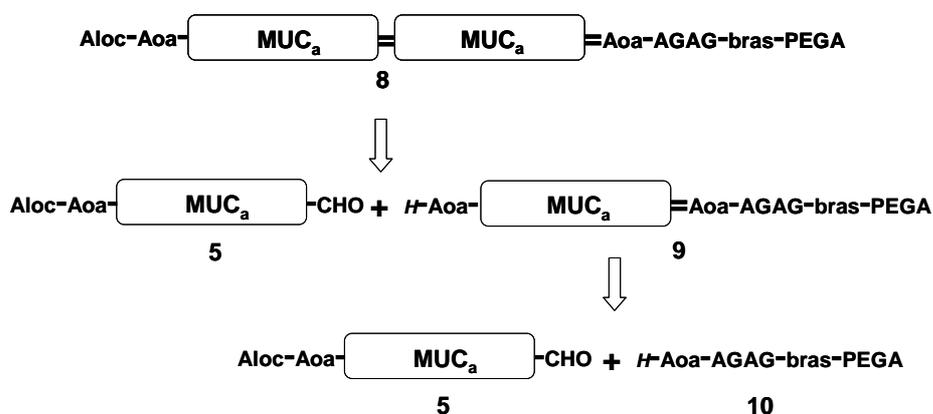


Figure 64 : Schéma rétrosynthétique de **8**

### III. 2. 1 Synthèse du fragment médian 5

Le fragment médian 5 a été synthétisé par SPPS (Figure 65).



Figure 65 : Synthèse du fragment médian 5

La fonction aldéhyde a été obtenue protégée sous forme d'un acétal introduit par aminolyse de l'ester benzylique reliant le peptide au bras phenylacétamido méthyl (PAM) (Figure 66). Le bras PAM, classiquement utilisé en stratégie Boc, est stable en milieu basique ainsi qu'en milieu acide moyen (Mitchell. 1976) ; il est par contre sensible aux attaques nucléophiles. L'utilisation de ce bras, permet donc de réaliser l'élongation du peptide selon la stratégie Fmoc/tBu, de déprotéger les chaînes latérales du peptide par TFA, puis d'effectuer un déplacement nucléophile par l'amino acétaldéhyde diméthylacétal (Lelièvre *et al.* 1998). Cette méthodologie présente l'avantage de purifier le peptide avec l'aldéhyde protégé. La protection acétal est éliminée en milieu acide juste avant d'engager le peptide dans la réaction de ligation.

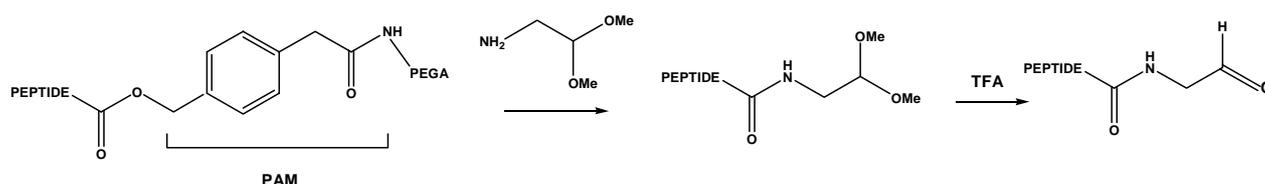


Figure 66 : Préparation d'un peptide-aldéhyde C-terminal par aminolyse selon Lelièvre *et al.* 1998.

Le groupement protecteur de Aoa en N-terminal du peptide glycinal doit être stable lors de la déprotection des chaînes latérales par TFA et lors de l'aminolyse (milieu basique et présence de nucléophiles). Le groupement Aloc qui est stable en milieu acide et basique et sélectivement éliminé en milieu neutre par Pd(0) (Tsuji-Trost. 1965) semble être parfaitement compatible avec nos conditions. La résine choisie pour l'élongation de ce peptide est la résine PEGA plus appropriée pour l'aminolyse de peptides polaires supérieurs à 10 acides aminés (Lelièvre *et al.* 2002).

Tous les produits de départ sont commerciaux à l'exception de Aloc-Aoa-OH **16**. Celui-ci a été synthétisé dans les conditions classiques de Schotten et Baumann à partir de l'acide amino oxyacétique commercial et de l'Aloc activé sous forme de carbonate de succinimide (Lapatsanis. 1983) (Figure 67).

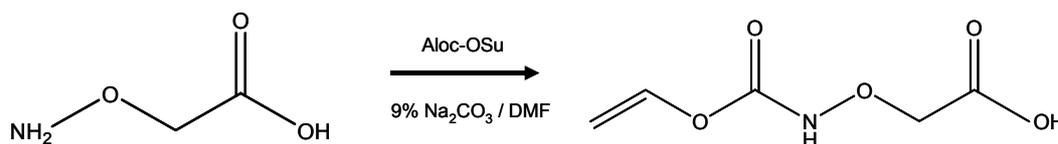


Figure 67 : Synthèse de Aloc-Aoa-OH **16** **16**

Le couplage de Boc-Ala-OCH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH sur la résine amino méthylée pour conduire au composé **12** peut être effectué de deux manières différentes :

- Suivant le protocole le plus couramment utilisé et notamment en SPPS, la fonction acide du composé a d'abord été préactivée par HBTU/HOBt en présence de DIEA pour former l'ester actif d'HOBt qui a ensuite été mis en présence de la résine portant la fonction amine (Figure 68).

Remarque : L'ajout de DIEA dans les réactions de couplage permet d'éviter la formation de méthanamminium.

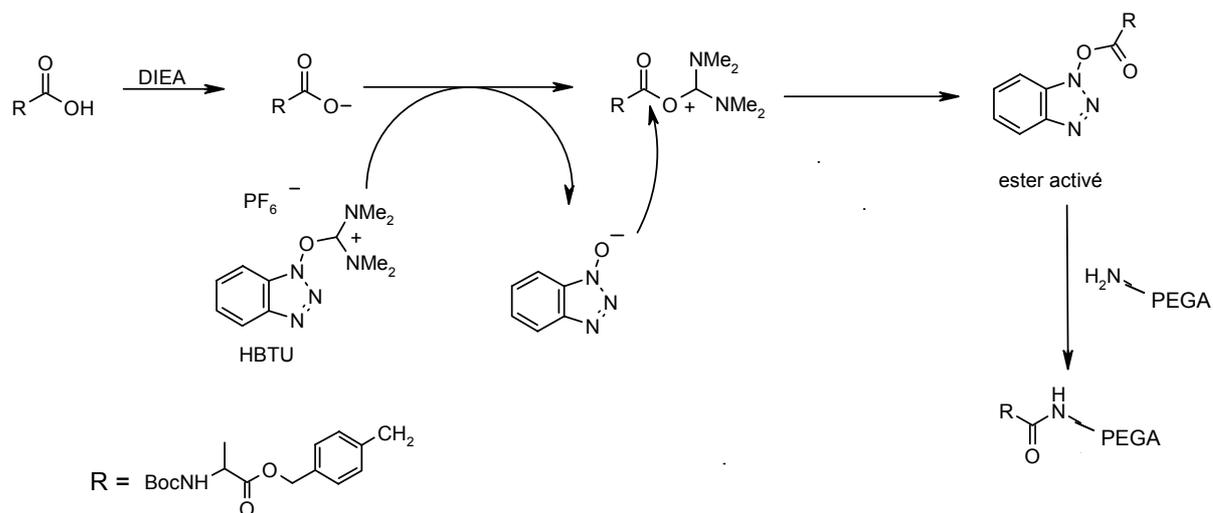


Figure 68 : Couplage peptidique de l'acide Boc-Ala-4-(oxyméthyl)phénylacétique sur la résine PEGA aminométhylée avec préactivation de la fonction acide

La vérification du couplage par le test de Kaiser (Kaiser *et al.* 1970) a révélé un couplage incomplet. Un double couplage avec des temps de réaction plus long permet cependant d'obtenir un couplage quasiment quantitatif.

- Un deuxième protocole utilisé est le protocole de « neutralisation in situ » décrit pour les couplages peptidiques en stratégie Fmoc (Alewood *et al.* 1997) et qui s'inspire du protocole de neutralisation in situ décrit pour la stratégie Boc (Nguyen *et al.* 1985 ; Schnölzer *et al.* 1992).

L'ajout de l'acide aminé va entraîner une protonation de la résine. On verse ensuite HBTU. L'addition de la DIEA va permettre la neutralisation de la résine in situ et la formation de l'ester activé. Le couplage sur la résine pourra se réaliser et conduire à la formation d'une liaison amide (Figure 69).

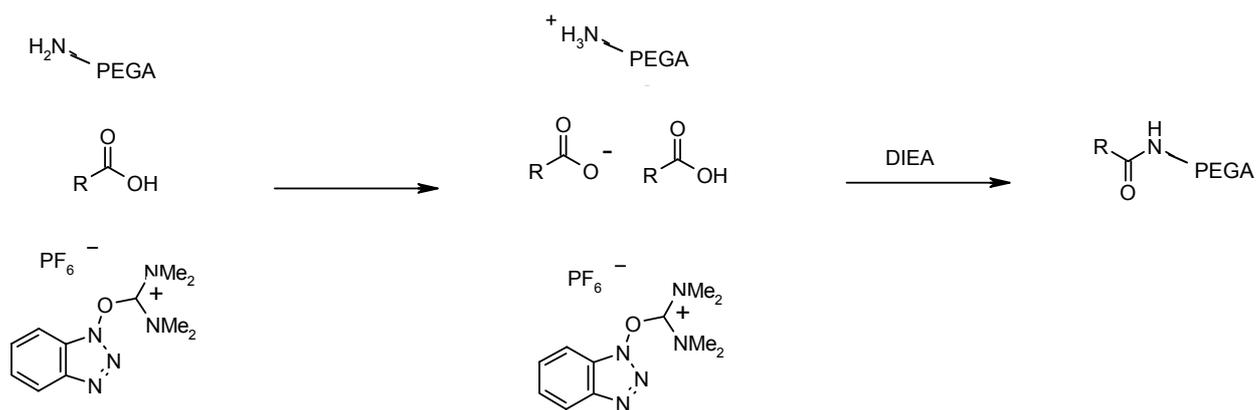


Figure 69 : Couplage peptidique en stratégie Fmoc selon la méthode de neutralisation *in situ*.

Ce protocole, appliqué au couplage de l'acide Boc-Ala-4-(oxyméthyl)phénylacétique sur la résine PEGA aminométhylée, a conduit à un rendement quantitatif dès le premier couplage et il a été appliqué durant la thèse. Le Boc a ensuite été éliminé par un traitement TFA suivi de la neutralisation par DIEA pour donner l'amino-acide-résine **12**.

L'élongation peptidique sur support solide a été effectuée en stratégie Fmoc/*t*Bu et suivie par dosage UV de l'adduit fluorénylméthyl-pipéridine généré lors de la déprotection du Fmoc. Le dérivé aminoxy **16** a été introduit en position N-terminale avec HATU/DIEA par la méthode de neutralisation *in situ* pour conduire au peptide résine **13**.

Les protections des chaînes latérales sont éliminées par un traitement au TFA. Cette réaction se déroule en présence de pièges à carbocations appelés « scavengers » comme le triisopropylsilane (TIS) (Pearson *et al.* 1989) l'éthane dithiole (EDT) ou encore le thioanisole. En effet, les carbocations (comme  $t\text{Bu}^+$  ou  $\text{Trt}^+$ ) issus des groupements protecteurs des chaînes latérales des divers acides aminés utilisés sont relargués au cours du traitement acide et constituent de potentiels agents alkylants. Les scavengers vont réagir avec ces entités électrophiles et empêcher la formation de réactions parasites.

Le peptide résine « nu » **14** a été traité avec l'acétaldéhyde diméthylacétal. Le peptide acétal **15** obtenu est purifié par HPLC semi-préparative, lyophilisé et traité

au TFA pour donner le fragment médian **5** avec un rendement global de 54% calculé à partir de la résine de départ (Figure 70).

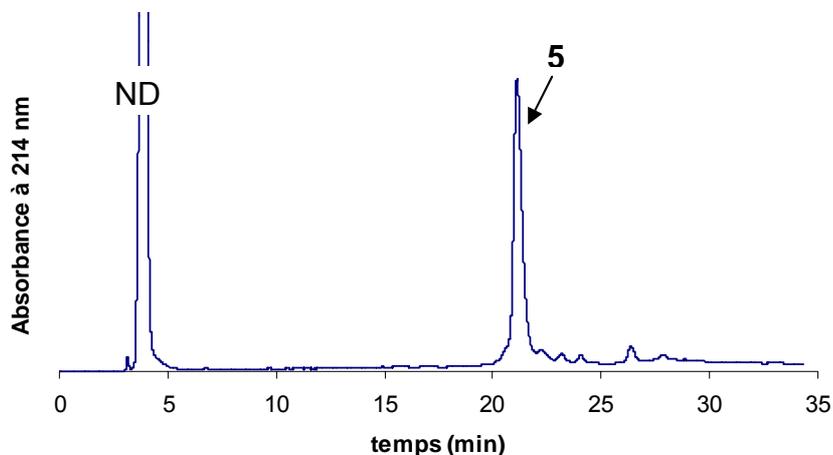


Figure 70: Chromatogramme HPLC analytique du fragment médian Aloc-Aoa-Muc<sub>a</sub>-CHO **5**.  
gradient : 3- 30 % de B en 30 mn

### III. 2. 2. Synthèse du peptide résine C-terminal **10**

Le décrochage de la molécule finale par acidolyse (TFA 95%) nous a conduit à choisir HMPA (acide 4-hydroxyméthylphénoxyacétique) (Sheppard *et al.* 1982) (Figure 71) comme bras pour relier le polyoxime au support.

En outre l'élaboration du composé **10** nous a permis de se familiariser avec les conditions de déprotection de Aloc en présence d'un aminoxy.

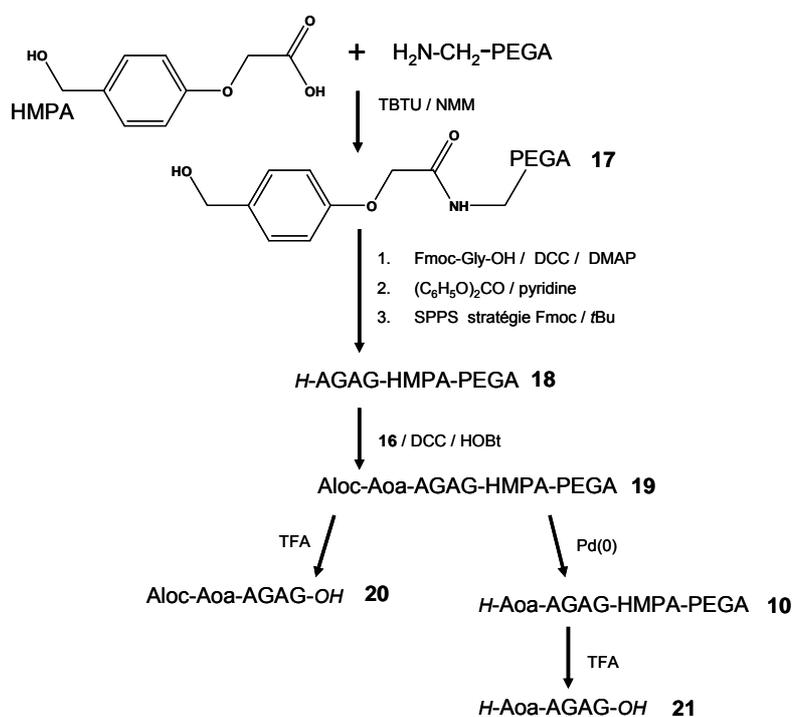


Figure 71: Synthèse du peptide résine **10**

### III. 2. 2. 1. Synthèse de Aloc-Aoa-AGAG-HMPA-PEGA **19**

Nous avons fixé le bras HMPA en présence de TBTU (Dourtoglou *et al.* 1978) et de *N*-méthylmorpholine (NMM) sur la résine **17**. Un traitement au TFA/H<sub>2</sub>O (95/5) pendant 1 heure permet de supprimer le double couplage du bras HMPA en coupant la liaison ester générée entre les deux bras (Albericio et Barany. 1985). Un test de Kaiser négatif révèle que la réaction est quantitative. L'introduction de Fmoc-Gly-OH par estérification est une étape délicate. En dépit de divers modes opératoires, nous n'avons pas pu obtenir une répétabilité satisfaisante. Néanmoins, le couplage est quantifié par le dosage du Fmoc libéré après un traitement à la pipéridine (rendement de 85%). Les éventuelles fonctions alcool libres susceptibles de donner des sous-produits durant l'élongation peptidique sont bloquées par benzylation.

L'élongation peptidique a été réalisée en stratégie Fmoc/*t*Bu pour donner le composé **18**. Aloc-Aoa-OH a été couplé manuellement avec HBTU/DIEA dans le DMF, pour donner **19**. Le test de Kaiser est négatif. Après un traitement TFA/H<sub>2</sub>O (95/5) d'un aliquote de **19**, l'analyse HPLC du pentapeptide **20** (figure 72A) fait apparaître un produit secondaire à hauteur de 40% (**19'**) correspondant à une augmentation de masse par rapport au produit attendu de  $\Delta m = +157$  attribué à un peptide bis-acylé sur l'azote de l'aminooxy (figure 72B).

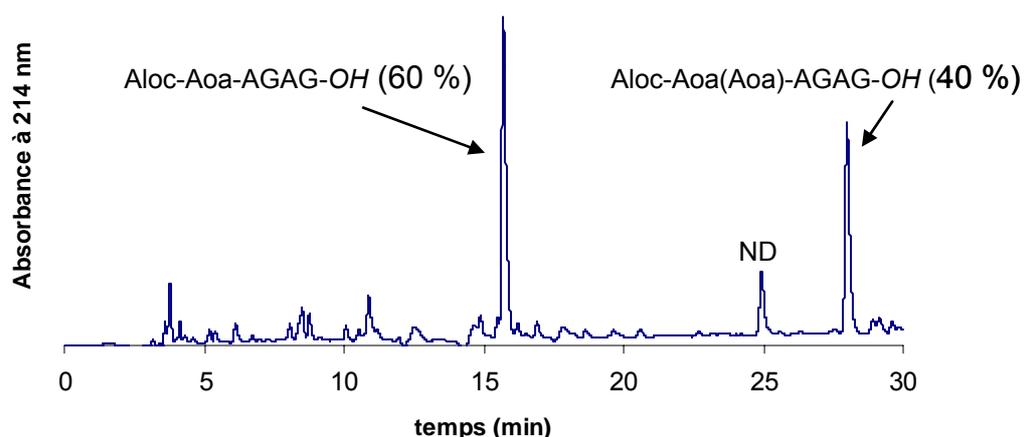


Figure 72A: Chromatogramme HPLC de **20** après couplage de Aloc-Aoa-OH avec HBTU (4 eq) / DIEA (10 eq) - gradient: 3-30% B en 30 min.

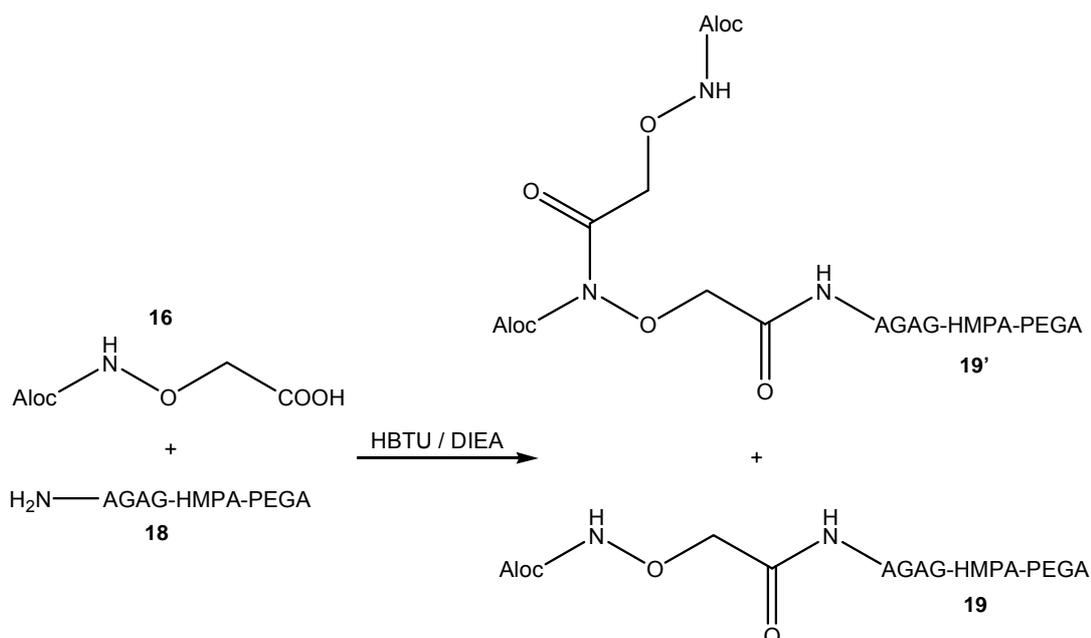


Figure 72B : Couplage de **16** sur le peptide résine **18** en présence de HBTU/DIEA.

### III. 2. 2. 2. Etude du phénomène de bis-acylation

Ce phénomène de bis-acylation (addition d'une deuxième molécule de Aloc-Aoa-OH sur l'azote de l'aminooxy) a déjà été observé lors de l'introduction du groupe aminooxy (Meienhofer, 1979). Il peut être supprimé grâce à l'utilisation de (Boc)<sub>2</sub>-Aoa-OH (Brask *et al.* 2000), de Trityl-Aoa-OH (Wahl *et al.* 1996) d'un phtaloyle (Lee *et al.* 2003) ou récemment par l'emploi d'un éthoxyéthylidène (Duléry *et al.* 2007, Foillard *et al.* 2008).

Afin de minimiser la formation de ce produit secondaire lors de l'introduction de Aloc-Aoa-OH **16**, nous avons entrepris une étude de cette réaction de bis-acylation. Vraisemblablement, l'effet  $\alpha$  de l'atome d'oxygène affecte non seulement la nucléophilie mais également le caractère acido-basique de la fonction amine adjacente avec une augmentation de son caractère acide. Nous avons supposé que les conditions basiques appliquées lors du couplage de Aloc-Aoa-OH **16**, devaient augmenter le processus de bis-acylation. Le but de notre étude étant de déterminer des conditions permettant de générer un couplage quantitatif de Aloc-Aoa-OH **16** sans bis-acylation, des paramètres comme la nature de l'agent de couplage, leur concentration, le temps de réaction et la présence ou non de bases ont été abordés et sont résumés dans la Figure 73.

	Aloc-Aoa-OH	Réactif de couplage	Base	Temps (mn)	% H <sub>2</sub> N~ 18	% Aloc-Aoa-NH~ 19	% Aloc-Aoa(Aloc-Aoa)-NH~ 19'
<i>Simple couplage</i>							
1	4 eq	HBTU 4 eq	DIEA 10 eq	30	0	60	40
2	4 eq	HBTU 4 eq	DIEA 5 eq	30	5	71	24
3	4 eq	HBTU 4 eq	Collidine 5 eq	30	17	83	0
4	4 eq	HBTU 4 eq	Collidine 10 eq	30	6	94	0
<i>Double couplage</i>							
5	4 eq	HBTU 4 eq	DIEA 10 eq	30	0	58	42
	+ 4 eq	+ HBTU 4 eq	+ DIEA 10 eq	30	0	60	40

Figure 73 : Acylation du peptide résine H-AGAG-HMPA-PEGA avec Aloc-Aoa-OH en utilisant HBTU comme réactif de couplage.  
Le pourcentage de chaque produit est estimé par l'intégration des pics HPLC à 214 nm.

Lorsque l'on utilise 4 équivalents d'HBTU avec 2,5 excès de DIEA (soit 10 eq) pendant trente minutes, la réaction est quantitative mais accompagnée de 40% du produit bis-acylé (figure 73: entrée 1). Avec un excès de base plus faible (1,25 excès), la forme bis-acylée ne représente plus que 24% (entrée 2). Afin de démontrer l'effet de la base, la DIEA ( $pK_a$  à 10.1) a été remplacée par la collidine ou 2,4,6-triméthylpyridine ( $pK_a$  à 7.4). Quelque soit l'excès de collidine employé (entrées 3-4), on n'observe plus de produit bis-acylé mais la réaction de couplage n'est pas totale. Ce résultat est en accord avec le fait que l'activation de la fonction carboxylique d'un acide aminé par un sel d'ammonium est plus efficace en présence d'une base plus forte que la collidine (Albericio *et al.* 1998).

La bis-acylation peut se produire, soit en solution au moment de l'activation de Aloc-Aoa-OH **16** et générer Aloc-Aoa(Aloc-Aoa)-OBt pouvant se fixer sur le peptide résine H-AGAG-HMPA-PEGA **18**, soit **16** peut acyler l'azote -NH-O- du peptide résine Aloc-Aoa-AGAG-HMPA-PEGA. Un double couplage effectué avec 4 équivalents d'HBTU et 10 équivalents de DIEA pendant 30 minutes n'a pas augmenté le pourcentage du produit secondaire (entrée 5). Ce résultat suggère que le produit Aloc-Aoa(Aloc-Aoa)-OBt se serait formé en solution et réagirait, d'une manière compétitive avec Aloc-Aoa-OBt, pour la réaction d'acylation du peptide-résine **18**. Cette hypothèse a été confirmée par la présence de Aloc-Aoa(Aloc-Aoa)-OBt caractérisé dans le mélange réactionnel par HPLC, SM (Figure 74A) et par la présence de Aloc-Aoa(Aloc-Aoa)-OH dans le mélange réactionnel soumis à un traitement à la soude (Figure 74B). Durant l'activation du carboxyle sous forme d'ester d'OBt, le proton du -NH-O- de

l'Aloc-Aoa-OBt deviendrait plus labile au point d'être arraché lors de l'augmentation de la basicité du milieu réactionnel.

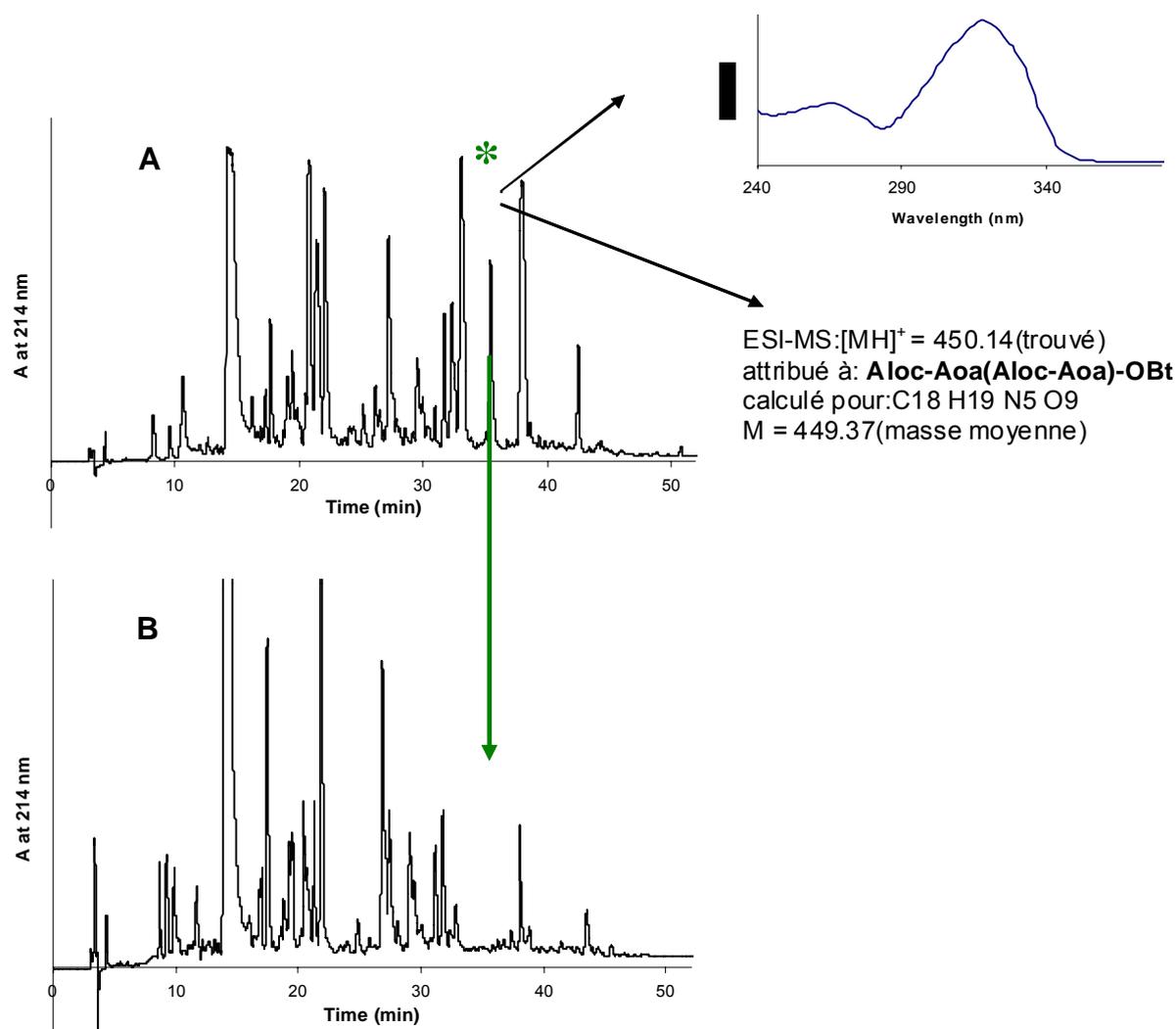


Figure 74 : Mélange réactionnel d'activation de Aloc-NH-O-CH<sub>2</sub>-COOH (4 eq) en présence d'HBTU (4 eq) et DIEA (10 eq) pendant 30 minutes. Gradient : 3-48% de B en 50 min  
 A: aliquote issu du mélange réactionnel; B: aliquote issu du mélange réactionnel après un traitement à la soude 0,1M pendant 20 mn

#### Conclusion :

La nucléophilie de l'azote -NH- du composé Aloc-Aoa-R varie selon R (R = OBt ou peptide). Ceci expliquerait probablement la raison pour laquelle on n'observe pas de bis-acylation avec des acides aminés contenant une oxyamine sur la chaîne latérale (Lang *et al.* 1998 ; Spetzler *et al.* 1999).

Deux voies peuvent être envisagées pour réduire la bis-acylation : la première consiste à coupler le plus rapidement possible l'Aloc-Aoa-OH sur le peptide résine H-AGAG-HMPA-PEGA et la seconde à diminuer la basicité du mélange réactionnel. Notons que ces deux approches peuvent être utilisées conjointement ou séparément.

Pour augmenter la vitesse de réaction de couplage, nous avons utilisé l'HATU (Carpino.1993), sel d'aminium efficace, pour activer le groupe carboxyle de Aloc-Aoa-OH et l'HCTU (Marder *et al.* 2002) (Figure 75).

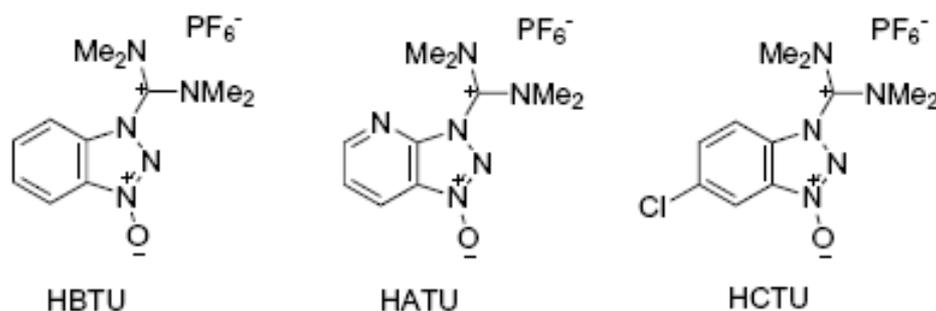


Figure 75 : Formule chimique des différents sels d'aminium

Les résultats sont répertoriés Figure 76.

	Aloc-Aoa-OH	Réactif de couplage	Base	Temps (mn)	% H <sub>2</sub> N~ 18	% Aloc-Aoa-NH~ 19	% Aloc-Aoa(Aloc-Aoa)-NH~ 19'
1	4 eq	HCTU 4 eq	DIEA 10 eq	30	0	65	35
2	4 eq	HATU 4 eq	DIEA 10 eq	30	0	81	19
3	4 eq	HATU 4 eq	Collidine 5 eq	30	4	96	0
4	4 eq	HATU 4 eq	Collidine 10 eq	30	5	95	0
5	4 eq	HATU 4 eq	Collidine 5 eq	60	3	97	0

Figure 76: Acylation du peptide résine H-AGAG-HMPA-PEGA avec Aloc-Aoa-OH en utilisant HCTU et HATU comme réactifs de couplage.  
Le pourcentage de chaque produit est estimé par l'intégration des pics HPLC à 214 nm.

Globalement, HCTU conduit à un pourcentage de bis-acylation (35 %) (Figure 76: entrée 1) semblable à celui d'HBTU (Figure 73: entrée 1) en présence de 10 équivalents de DIEA alors qu'avec HATU, dans les mêmes conditions, le pourcentage de produit bis-acylé est deux fois moindre (entrée 2).

Les meilleurs résultats, en terme d'absence de bis-acylation, obtenus avec HATU sont vraisemblablement dus à une augmentation de la vitesse de formation de la liaison amide grâce à l'assistance anchimérique de l'azote pyridinique de l'azabenzotriazole (Carpino. 1993) avec un hydrogène de la fonction  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de l'acide aminé à acyler (Figure 77).

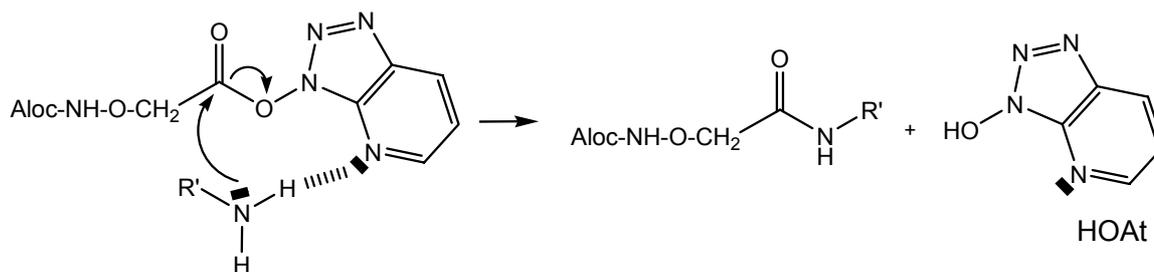


Figure 77 : Assistance anchimérique lors de la formation d'une liaison amide

Au regard de la figure 76 (entrées 3, 4 et 5), le meilleur compromis (acylation efficace et minimisation de la bis-acylation) est obtenu avec HATU et 5 équivalents de collidine sans formation de produit bis-acylé en 60 minutes. Le pourcentage de peptide non-acylé (3 %) est acceptable car il sera facilement éliminé lors de l'étape finale de purification. Une augmentation du temps de réaction et/ou un double couplage aurait vraisemblablement conduit à une acylation quantitative et à l'absence de produit bis-acylé.

La seconde voie visant à diminuer la basicité du milieu réactionnel a été testée grâce à l'utilisation de la dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et de l'HOBt, un mélange de réactifs de couplage ne nécessitant pas l'emploi d'une base tertiaire (DeTar. *et al.* 1966) (Figure 78).

La fonction  $\alpha$ -COOH de l'acide aminé à coupler est activée par la dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et forme une O-acylisourée, entité très réactive qui réagit en présence du 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) pour donner un ester d'OBt. Ce dernier subira l'attaque de la fonction  $\alpha$ -aminée d'un peptide en cours d'élongation et conduira à une liaison amide. En outre, l'utilisation du 1-hydroxybenzotriazole prévient des éventuelles réactions secondaires rencontrées comme la formation de N-acylée

ou la racémisation en présence de l'amine (réaction basocatalysée) avec la formation d'un intermédiaire appelé oxazolone.

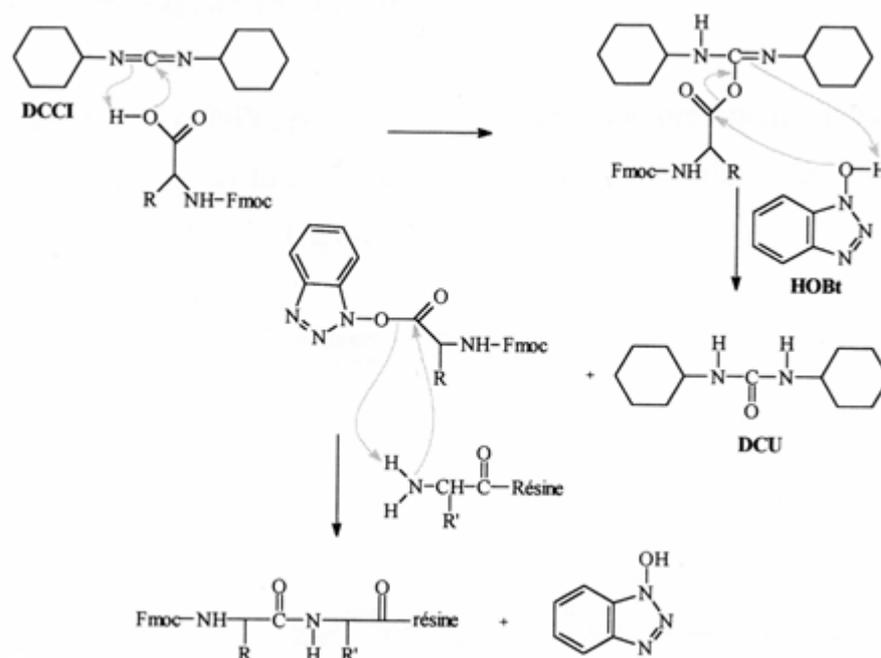


Figure 78 : Formation d'une liaison amide par activation DCC/HOBt

Malgré une cinétique d'acylation plus lente DCC/HOBt (Figure 79: entrée 2) comparée à l'utilisation de sels d'ammonium HATU ou HBTU en présence de DIEA (Figures 76: entrée 2 et 73:entrée 1), le pourcentage du produit bis-acylé est plus faible. Le meilleur résultat est obtenu avec 4 équivalents de DCC et 4 équivalents d'HOBt pendant 120 minutes (Figure 79:entrée 4 et Figure 80).

	Aloc-Aoa-OH	Réactif de couplage	Temps (mn)	% H <sub>2</sub> N~	% Aloc-Aoa-NH~	% Aloc-Aoa(Aloc-Aoa)-NH~
				18	19	19'
<i>Simple couplage</i>						
1	5 eq	DCC/HOBt 5 eq	60	24	73	3
2	5 eq	DCC/HOBt 5 eq	120	2	94	4
3	5 eq	DCC/HOBt 5 eq	150	1	94	5
4	4 eq	DCC/HOBt 4 eq	120	4	96	0
5	10eq	DCC/HOBt 10 eq	120	2	94	4
<i>Double couplage</i>						
6	5 eq	DCC/HOBt 5 eq	60	24	73	3
	+ 3 eq	+ DCC/HOBt 3 eq	+ 60	4	93	3

Figure 79: Acylation du peptide résine H-AGAG-HMPA-PEGA avec Aloc-Aoa-OH en utilisant DCC/HOBt comme réactif de couplage. Le pourcentage est estimé par l'intégration des pics HPLC à 214 nm.

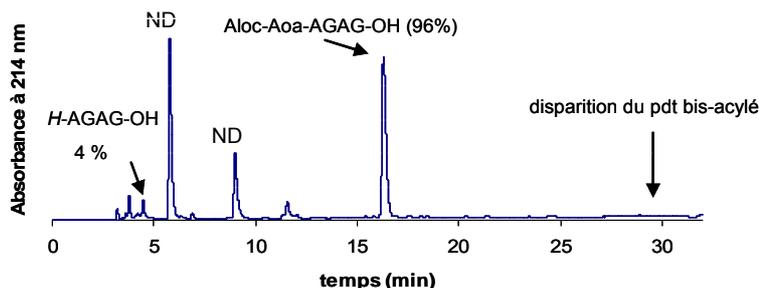


Figure 80: Couplage de **16** sur **18** avec DCC (4 eq)/HOBt (4 eq) pendant 120 minutes. Gradient: 3-30% de B en 30 min

Remarque: Des essais réalisés avec le mélange DCC/HOAt n'ont pas donné de meilleurs résultats, probablement du fait de l'instabilité d'HOAt (Bruckdorfer *et al.* 2004).

Suite à cette étude, publiée dans Tetrahedron Letters (Annexe 1: Decostaire *et al.* 2006), nous avons opté pour les réactifs de couplage DCC/HOBt pour l'obtention de notre composé **19**.

### III.2. 2. 3. Obtention de H-Aoa-AGAG-HMPA-PEGA **10**

Aloc-Aoa-AGAG-HMPA-PEGA **19**



H-Aoa-AGAG-HMPA-PEGA **10**

Figure 81: Obtention de **10** à partir de **19**.

La dernière étape pour obtenir le composé **10**, concerne l'élimination du groupe Aloc protégeant temporairement la fonction aminoxy du peptide-résine **19**. Elle repose sur l'utilisation de catalyseurs solubles à base de Pd(0) tel que le palladium tétrakis Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> en présence de nucléophiles capteurs de carbocations allyliques et d'une source de proton (Figure 82).

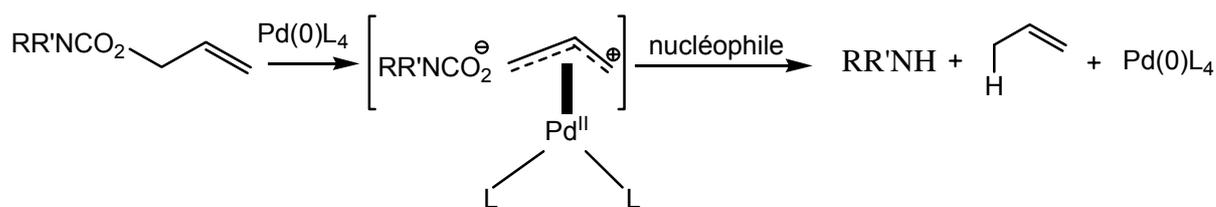


Figure 82: Mécanisme de déprotection du groupement Alloc en présence de Pd(0)/nucléophile

Le cycle catalytique de la réaction de Tsuji-Trost (Tsuji *et al.* 1965 ; Trost *et al.* 1978) comprend deux étapes principales. La première étape correspond à une addition oxydante du palladium sur la double liaison conduisant à la formation d'un complexe cationique  $\pi$ -allylique palladié électrophile. La deuxième étape est l'attaque du nucléophile sur ce même complexe cationique  $\pi$ -allylique palladié afin de capter le carbocation allylique. Le palladium est régénéré après élimination réductrice.

Le choix du nucléophile semble être crucial. Nous avons utilisé le complexe de diméthylamine borane (Gomez-Martinez *et al.* 1999). L'utilisation de ce complexe ne nécessite pas l'emploi d'une source de H<sup>+</sup>. L'hydruure du diméthylamine borane (Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub>) réagit avec le complexe cationique  $\pi$ -allylique palladié (PdII va agir comme groupe partant afin de retrouver son état d'oxydation 0) pour donner l'allyle et le Pd(0). Le carbamate va réagir avec le cation Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>2</sub><sup>+</sup> du complexe pour former le carbamate du bore puis après hydrolyse donner l'amine correspondante (Figure 83).

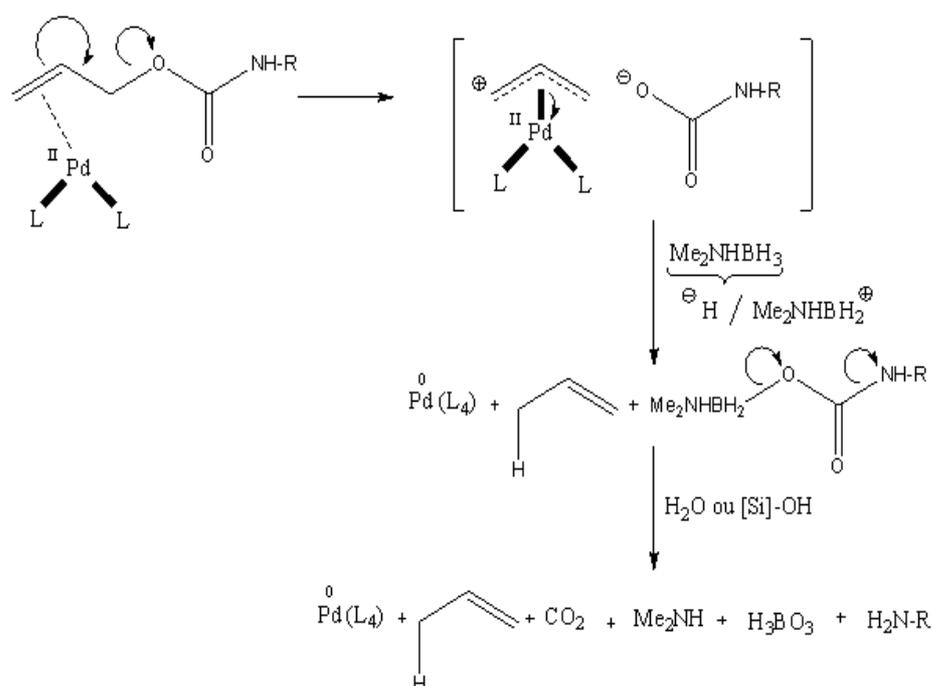


Figure 83 Mécanisme de déprotection des allylcarbamates catalysée par Pd(0) en présence de Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub>.

En utilisant des conditions similaires à celles de Gomez-Martinez *et al* (1999) (6eq de Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub> en présence de palladium tétrakis pendant 30 minutes), l'analyse HPLC effectuée après traitement acide du peptide-résine révèle une élimination complète du groupe Aloc et la présence de 3 produits supplémentaires possédant respectivement des  $\Delta m = -15$ ,  $+26$  et  $+12$  par rapport à la masse du produit attendu (Figure 84).

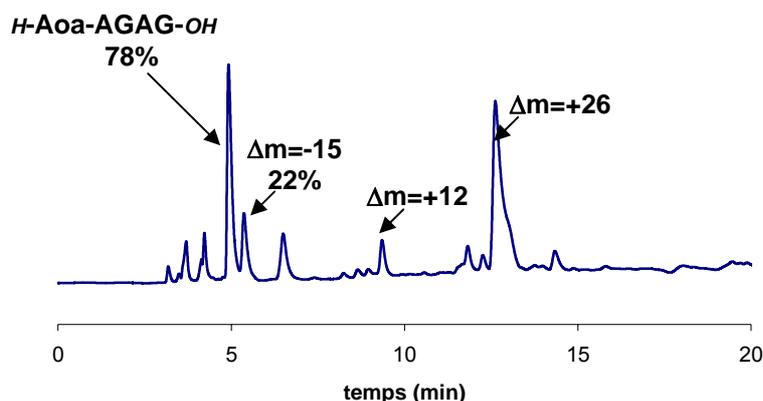


Figure 84 : Chromatogramme HPLC de H-Aoa-AGAG-OH **21** résultant de la déprotection de Aloc-Aoa-AGAG-HMPA-PEGA **19** en présence de 3 eq de Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub> / 0,2 eq de Pd(0) en 30 minutes puis coupure TFA - gradient : 3-30% B en 30 minutes.

Les deux produits avec une augmentation de masse  $\Delta m = +26$  et  $\Delta m = +12$  correspondent probablement aux adduits formés entre l'aminooxy libéré très réactif avec de l'acétaldéhyde d'une part et avec du formaldéhyde d'autre part présents dans les solvants utilisés et/ou de la verrerie mal lavée. Il est connu et bien caractérisé que les aldéhydes et cétones réagissent très rapidement avec Aoa déprotégé pour former des oximes (Buré *et al.* 2000). Une bonne pratique de laboratoire (solvants de bonne qualité, verrerie très bien nettoyée, Pd(0) « neuf », élimination de l'acétone du laboratoire) a permis d'éliminer ces deux réactions parasites.

La perte de masse avec un  $\Delta m = -15$  a été attribuée à la réduction de la fonction aminooxy en alcool **21'** (Figure 85) par le complexe diméthylamine borane. Cette réaction d'acidolyse réductrice a été décrite avec l'utilisation de dérivés O-alkylhydroxylamines (Leffler *et al.* 1951 ; Morgan *et al.* 1968 ; Hutchinson *et al.* 1973).

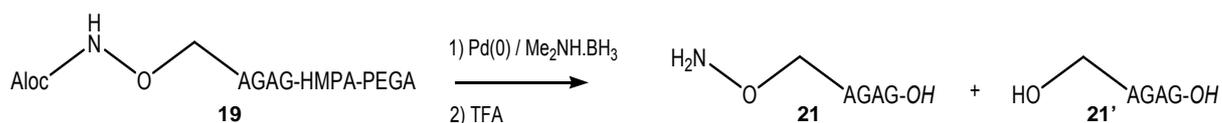


Figure 85 : Acidolyse réductrice de la fonction aminooxy

Dans le but de minimiser cette réaction secondaire, nous avons donc testé différentes conditions opératoires avec le complexe de diméthyl amine borane en présence de Pd(0) (Figure 86).

Me <sub>2</sub> NH.BH <sub>3</sub> (eq)	temps (mn)	% H <sub>2</sub> N~	% Aloc-Aoa-NH~	% OH~
6	30	65	0	35
3	30	78	0	22
1	30	30	57	13
2	30	61	25	19
3	10	98	0	2

Figure 86 : Conditions opératoires employées pour éliminer l'Aloc fixé sur un Aoa

Le meilleur résultat a été obtenu avec l'utilisation de 0,2 équivalent de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (fraîchement ouvert) et un temps de réaction de 10 minutes en présence de 3 équivalents de Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub> (Figure 86 : entrée 5) dans la NMP. Dans ces conditions, la forme réduite de l'Aoa est obtenue en quantité négligeable et sera facilement éliminé lors de la purification finale par HPLC.

### III. 2 .3. Multiligations sur support solide

La synthèse des fragments **5** et **10**, les conditions de stabilité de la liaison oxime en milieu aqueux acide et la coupure du peptide de son support nous permettent maintenant l'obtention des composés **23** et **24** (Figure 87).

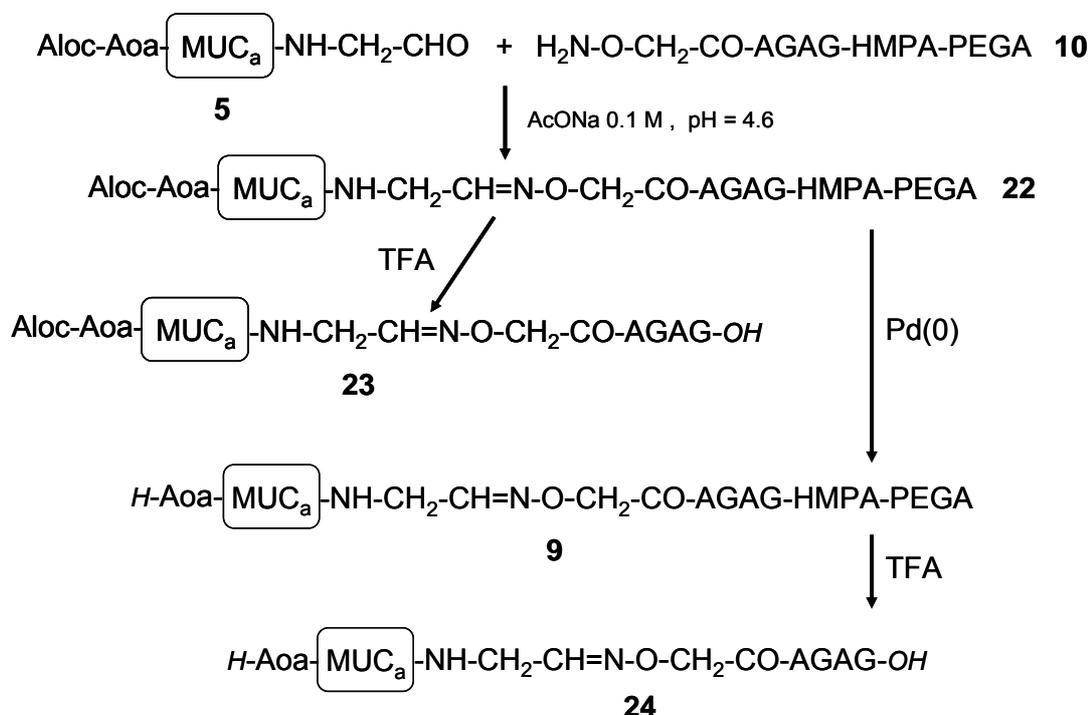


Figure 87 : Schéma de la première ligation: obtention de **22**

#### III. 2 .3. 1. Première ligation: obtention du peptide résine **22**

Le peptide résine **22** est obtenu par ligation oxime en utilisant 1,5 équivalents du synthon médian **5** par rapport à 1 équivalent de *H*-Aoa-AGAG-HMPA-PEGA **10** dans un tampon acétate de pH = 4,6. Pour évaluer la cinétique de la réaction, un aliquote du surnageant de réaction est régulièrement prélevé et analysé par HPLC pour suivre la disparition de **5**. Après 5 heures de réaction, la concentration de **5** ne diminue plus et l'analyse HPLC du peptide **23** obtenu par un traitement TFA d'un aliquote du peptide résine **22** (Figure 88) montre que la ligation est totale.

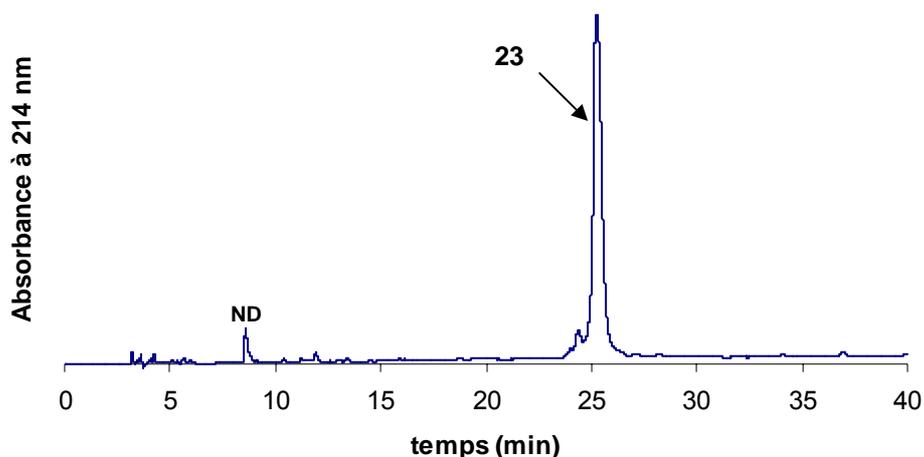


Figure 88: Chromatogramme HPLC du composé **23**.  
Gradient: 3-39% B en 40 minutes

### III. 2 .3. 2. Elimination du groupe Aloc après la première ligation oxime: obtention de **9**

Les conditions optimales définies précédemment sur le composé **19** (Aloc-Aoa-AGAG-HMPA-PEGA) pour déprotéger un Aloc avec Pd(0) en présence du complexe de diméthylborane ont été appliquées au peptide-résine **22** pour conduire au peptide-résine **9**. Le contrôle de la réaction se fait par HPLC après coupure au TFA d'un aliquote (Figure 89).

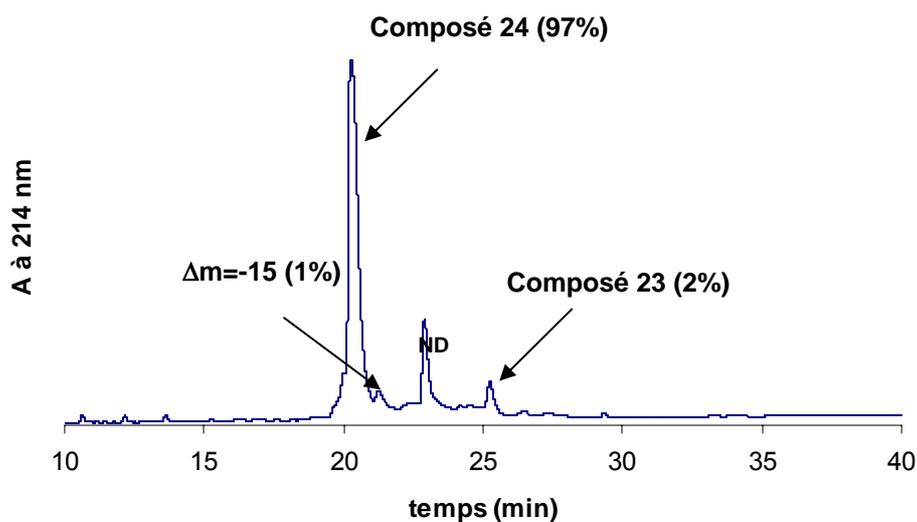


Figure 89: Chromatogramme HPLC de **24** après déprotection de l'Aloc de **23** -gradient : 3-39% B en 40 minutes.

La déprotection de l'Aloc a été obtenue avec un rendement satisfaisant de 97% et seulement 1% de peptide résultant de l'acidolyse réductrice de H<sub>2</sub>N-O-. Il faut noter que cette expérience valide une autre étape importante de notre stratégie : la stabilité de la liaison oxime dans les conditions d'élimination du groupe Aloc.

### III. 2 .3. 3. Seconde ligation et obtention du peptide-résine **8**

Le peptide-résine **9** est engagé pour une seconde ligation avec de nouveau un fragment médian **5** pour donner le composé **8** (Figure 90).

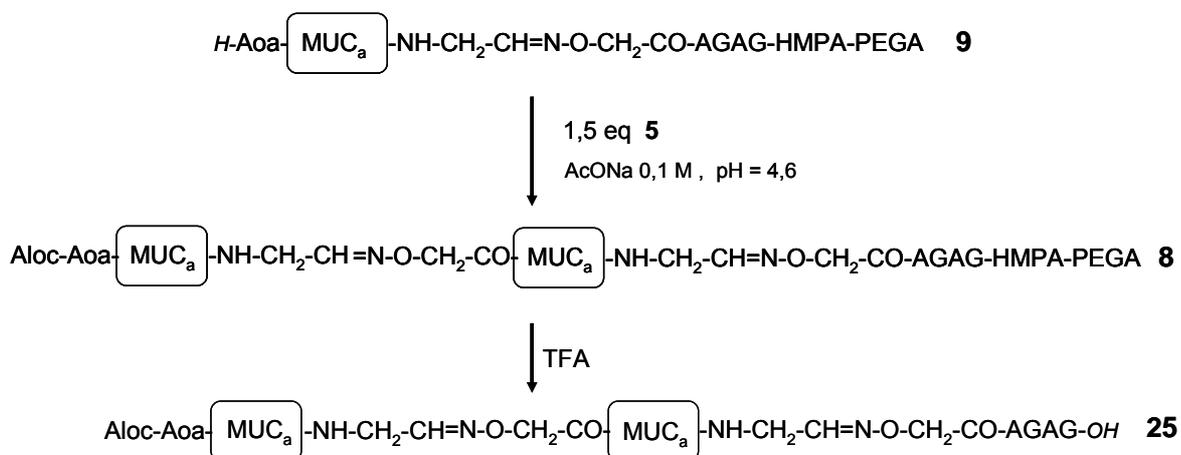


Figure 90 : Formation du peptide résine **8**

La seconde ligation a été réalisée dans des conditions identiques à la première. Des analyses par HPLC et spectrométrie masse effectuées sur un aliquote après coupure TFA montrent que **25** a été obtenu avec un très bon rendement de 97% à partir de la quantité d'amines initiale (Figure 91).

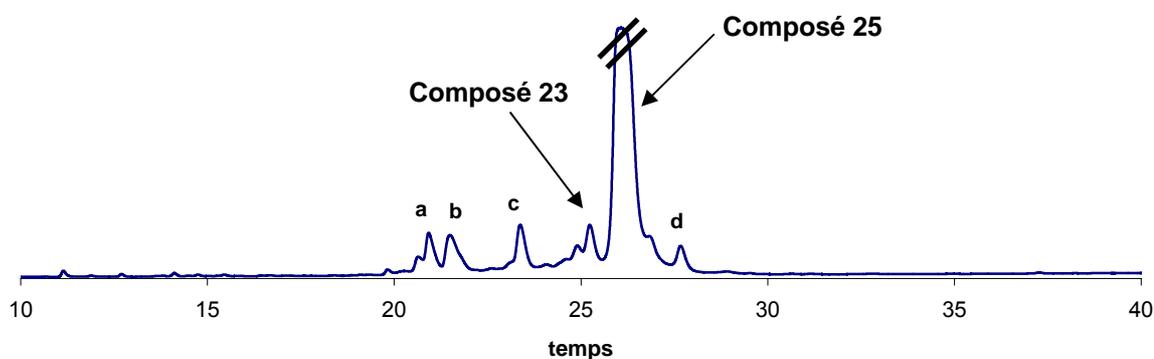


Figure 91: Chromatogramme HPLC du peptide polyoxime **25** après la deuxième ligation.  
 gradient : 3-39% B en 40 minutes.  
 Analyse MALDI [MH<sup>+</sup>]: a = 2345,2; b = 2316,4; c = 4303,9; d = 4399,9.

La concentration du composé **25** est volontairement saturée afin de déceler le composé  $H\text{-Aoa-MUC}_a\text{-CHO}$  ( $M = 2001$ ) qui témoignerait d'une réaction de transoximation.

### **Conclusion de cette étude**

L'étude sur des peptides modèles visant la préparation de polyMUC<sub>a</sub> linéaires via des liaisons oxime générées sur support solide a été menée. Les rendements d'oximation sur support solide sont quantitatifs. La stabilité de la liaison oxime aux conditions de ligation, de décrochage du peptide final de la résine ainsi qu'au traitement au Pd(0) s'est avérée très satisfaisante. Une mise au point des conditions de couplage (agent de couplage / temps de réaction) de Aloc-Aoa-OH a été nécessaire pour éliminer la réaction parasite de bis-acylation. La protection temporaire de l'aminooxy de l'acide aminooxyacétique a été réalisée via le groupement allyloxycarbonyle (Aloc) éliminé dans des conditions douces. Cette réaction de déprotection repose sur l'utilisation de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> en présence de nucléophiles capteurs d'allyle. Des conditions opératoires ont été optimisées afin de supprimer une réaction secondaire de l'acide aminooxyacétique déprotégé conduisant à l'alcool correspondant par acidolyse réductrice.

L'obtention du synthon médian **5** protégé Aloc-Aoa-MUC<sub>a</sub>-CHO s'est déroulé en deux étapes : la première consiste en la synthèse récurrente du peptide Aloc-Aoa-MUC<sub>a</sub> sur la résine PAM-PEGA en stratégie Fmoc/*t*Bu ; la deuxième permet l'installation d'une fonction aldéhyde masquée sur l'extrémité C-terminale par une méthodologie originale développée au sein du laboratoire.

Ainsi le développement d'une stratégie de protection-déprotection afin de coupler plusieurs motifs MUC<sub>a</sub> par ligation chimique sur support solide a permis de valider le concept proposé. Les résultats obtenus permettent d'envisager la synthèse des molécules **1** et **2**.

#### IV. Vers la synthèse de $MUC_a = MUC_a = MUC_a$ 1 et $PADREMUC_a = MUC_a = MUC_a$ 2

Afin d'éviter la synthèse par SPPS, la purification puis l'accrochage sur une résine du fragment situé en C-terminal (Canne *et al.* 1999 ; Brik *et al.* 2000), nous avons entrepris de développer une stratégie de type Fmoc / déprotection des chaînes latérales pour obtenir un peptide non protégé sur les chaînes latérales et fixé sur une résine compatible en milieu aqueux via un bras déprotégeable dans des conditions acides non drastiques. Cette méthodologie permettrait d'augmenter le rendement global de la synthèse et serait également très utile pour effectuer de la ligation chimique native sur support solide. La rétrosynthèse de **1** et **2** est rappelée Figure 92.

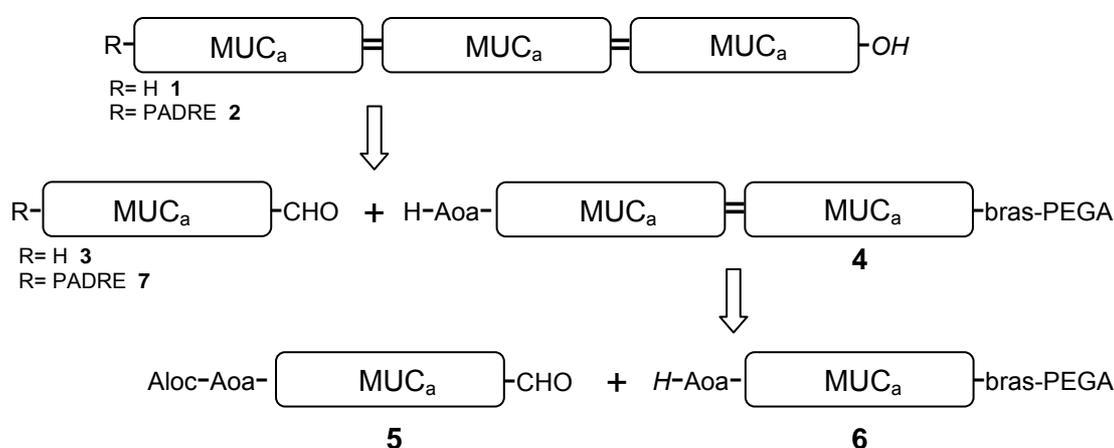


Figure 92 : Rétrosynthèse de **1** et **2**

La synthèse du fragment médian **5** a été décrite dans le chapitre précédent. Cependant, au regard du phénomène de bis-acylation observé sur le peptide modèle **19**, l'insertion de Aloc-Aoa-OH du fragment **5** se fera désormais par activation de la fonction carboxyle en présence de DCC / HOBt.

Dans les paragraphes suivants, je m'attacherai à décrire les essais que nous avons effectués pour préparer le peptide-résine **6** et les difficultés que nous avons rencontrées avec la protection de l'arginine. Ainsi, nous avons été amené à choisir la séquence PPAHGVTS<sub>a</sub> = MUC<sub>b</sub> à la place de PPAHGVTSAPDTRPAPGST<sub>a</sub> = MUC<sub>a</sub> pour le synthon en position C-terminale. Après la description de la synthèse des fragments N-terminaux **3** et **7**, ce chapitre se terminera par les étapes de ligation oxime.

#### IV. 1 Synthèse du fragment C-terminal *H*-Aoa-MUC<sub>a</sub>-HMPA-PEGA 6.

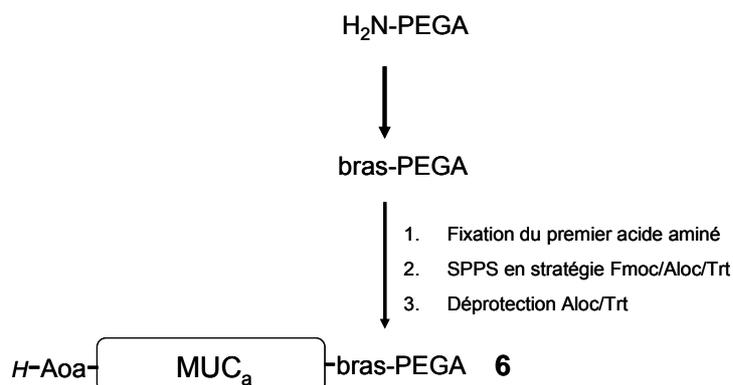


Figure 93 : Synthèse du peptide résine 6

En SPPS, pour obtenir un peptide acide en position C-terminale, le peptide est généralement relié au support solide *via* un ester benzylique substitué en *ortho* et/ou *para*. L'efficacité de l'acidolyse de l'ester benzylique dépend de ses substituants qui stabilisent plus ou moins le carbocation formé. Dans notre stratégie, nous avons opté pour des protections des chaînes latérales de type trityl très acido-labiles et un bras de type Wang stable à un faible pourcentage de TFA nécessaire à la déprotection de ces groupes trityl. Pour optimiser cette orthogonalité (élimination des chaînes latérales / stabilité du bras), nous avons entrepris de comparer la stabilité en présence de TFA de différents bras p. alkoxybenzyl alcool susceptibles d'être utilisés dans nos expériences futures de ligation sur support. Les bras HMPA et MPPA (acide méthylphénoxypropionique) ont été étudiés et comparés à la résine de Wang (Figure 94).

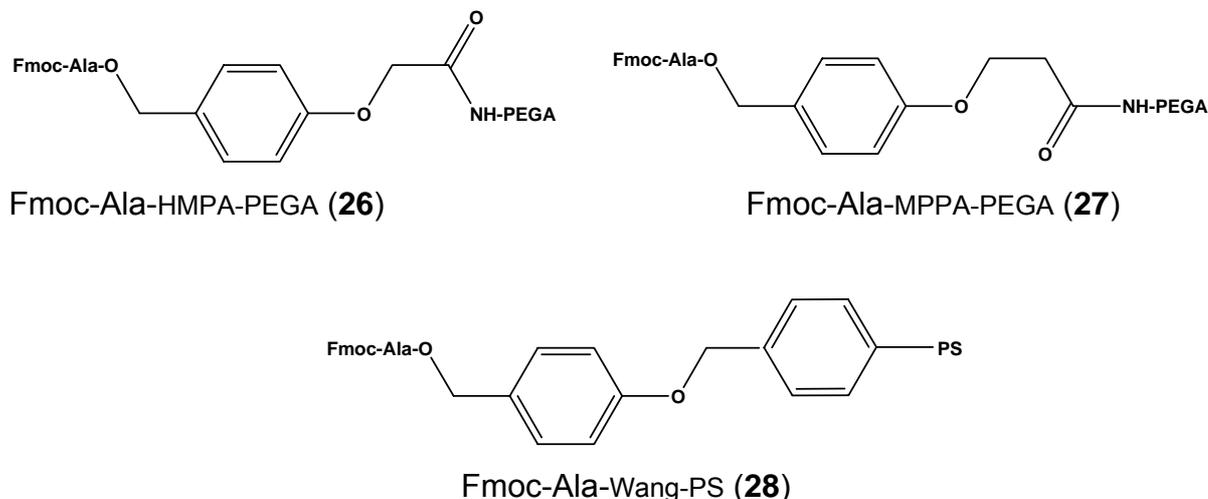


Figure 94 : Schéma des résines 26, 27 et 28

#### IV. 1. 1. Préparation des acides aminés-résines **26**, **27** et **28**

Fmoc-Ala-Wang-PS **28** est commercial. La préparation de Fmoc-Ala-HMPA-PEGA **26** est décrite dans le chapitre précédent. Fmoc-Ala-MPPA-PEGA **27** a été obtenu par couplage peptidique entre Fmoc-Ala-O-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH **29** commercial et la résine PEGA amino méthylée en présence de HBTU/DIEA dans du DMF pendant 3 heures.

#### IV. 1. 2. Etude de la stabilité des bras p-alkoxybenzyl alcool en solution diluée de TFA

L'acide aminé résine est solvatée avec du DCM contenant une concentration de TFA déterminée. La réaction est réalisée dans un grand volume (20 ml) pour simuler une dilution infinie afin que la protonation éventuelle de la résine ne modifie pas sensiblement le pourcentage de TFA. Ce point est crucial avec la résine PEGA (polyéthylène glycol polyacrylamide) qui possède de nombreux sites de protonation. La coupure acide est suivie par mesure spectrophotométrique UV à 301 nm de Fmoc-Ala-OH libérée dans la solution.

Un premier essai a été effectué sur les trois types de bras avec 5% de TFA dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en présence de 2% de TIS nécessaires pour piéger les carbocations trityl (Kadereit *et al.* 2001). La figure 95 montre que le bras MPPA est plus sensible à l'acidolyse que le bras HMPA.

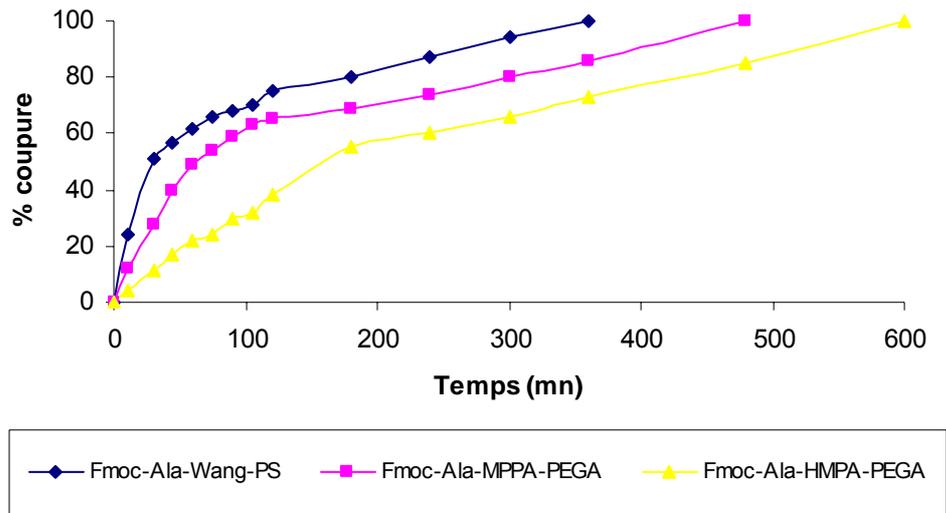


Figure 95 : Acidolyse des différents bras en présence de 5% de TFA

Nous avons également effectué une cinétique de l'acidolyse de la liaison ester avec 2 % de TFA dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en présence de 2% de TIS (Figure 96).

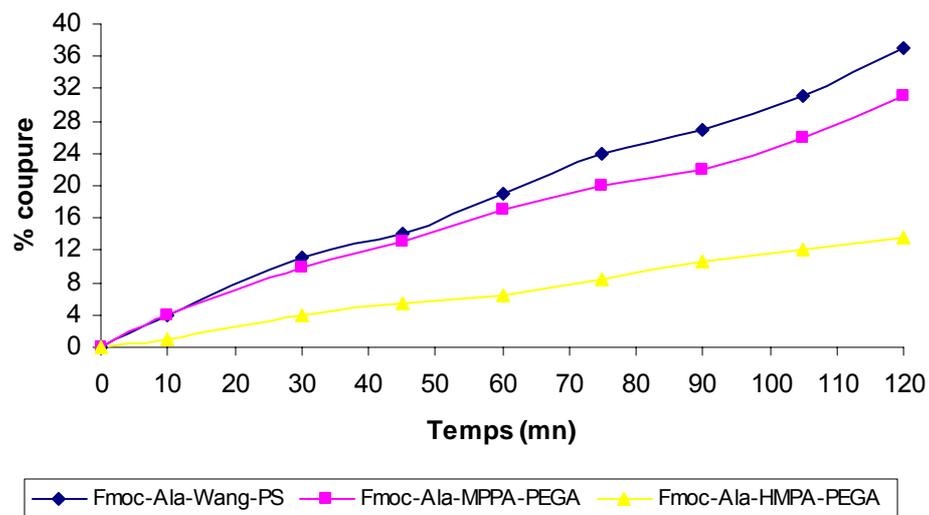


Figure 96 : Acidolyse des différents bras en présence de 2% de TFA

Le bras que nous avons choisi est l'HMPA, le plus stable à l'acidolyse. La déprotection des chaînes latérales tritylées avec 2 % de TFA dans 98% de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et en présence de 2% de TIS ne devrait pas générer de pertes significatives de peptide.

#### IV. 1. 3. Choix des groupements protecteurs des chaînes latérales de

##### MUC<sub>a</sub>

Il n'existe pas une panoplie complète de groupements protecteurs des chaînes latérales qui soient très acido-labiles pour tous les acides aminés. Pour Asp et Arg, nous avons choisi d'utiliser les dérivés commerciaux Fmoc-Asp(OAl)-OH et Fmoc-Arg[bis( $\omega$ ,  $\omega'$ )-Aloc]-OH (Figure 97) qui seront spécifiquement déprotégés en milieu neutre par un traitement classique avec Pd(0) [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>] en présence d'un donneur d'hydrure. Pour protéger la fonction guanidinium de l'arginine, nous avons la possibilité d'utiliser les groupes nitro (NO<sub>2</sub>) et Z qui peuvent être éliminés par hydrogénation (Vinogradova *et al.* 1970). Cependant, certains auteurs notent que le rendement de couplage peptidique avec une arginine protégée par NO<sub>2</sub> (Wender *et al.* 2001) où par Z (Schumann *et al.* 2000) n'est pas satisfaisant.

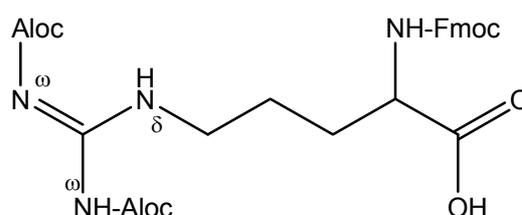


Figure 97 : Fmoc-Arg[bis( $\omega$ ,  $\omega'$ )-Aloc]-OH

Pour Ser, Thr et His, nous avons opté dans un premier temps pour les dérivés Fmoc-Ser(Trt)-OH, Fmoc-Thr(Trt)-OH et Fmoc-His(Trt)-OH.

L'élongation classique de MUC<sub>a</sub> a été réalisée sur le synthétiseur automatique en stratégie Fmoc/*t*Bu (Figure 98).

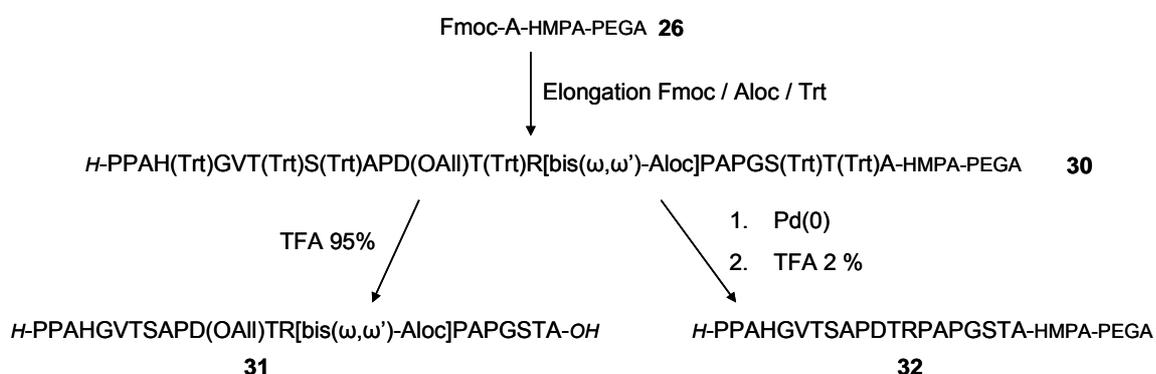


Figure 98 : Synthèse de MUC<sub>a</sub> sur support solide

L'histogramme (Figure 99 et 100) représentant le suivi de la déprotection du  $N^\alpha$  de chaque acide aminé par mesure spectrophotométrique de l'adduit fluorénylméthylpipéridine libéré à chaque traitement à la pipéridine met en évidence une augmentation anormale de l'absorbance à partir de la déprotection du Fmoc de l'acide aspartique 11.

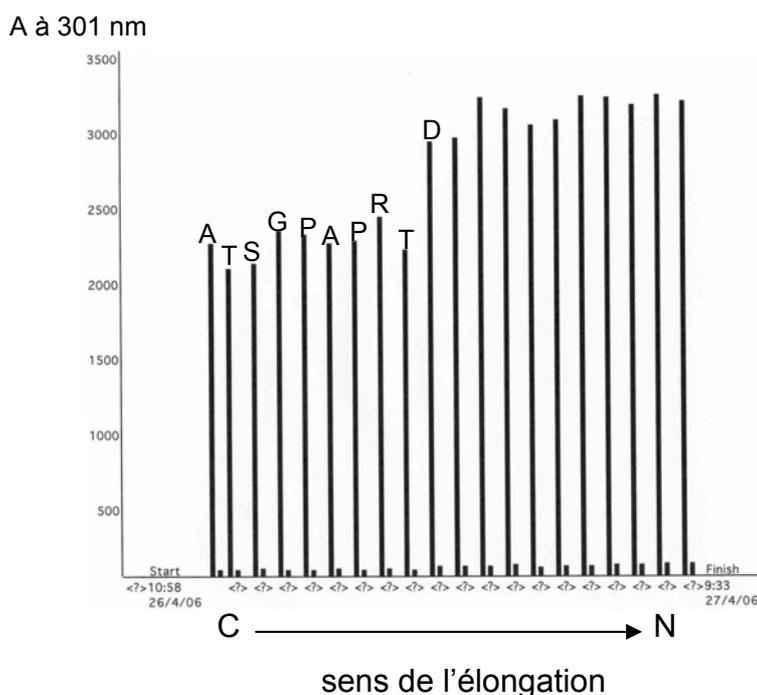


Figure 99 : Histogramme relatif au suivi UV des déprotections du lors de l'élongation de **30**

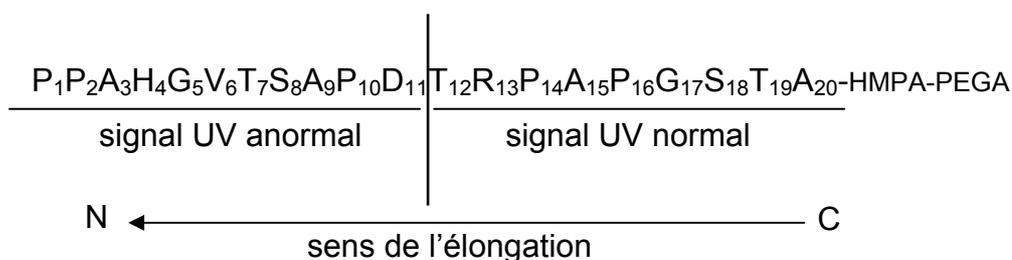


Figure 100 : Schéma représentant la séquence  $MUC_a$  au cours de l'élongation

L'analyse par HPLC et SM du peptide brut **31** après coupure de la résine par TFA confirme qu'il y a eu un problème lors de cette synthèse (Figure 101). Parmi les composés obtenus (Tr = 23'53,  $MH^+$  =2287,20; Tr = 24'04,  $MH^+$  =1982,00; Tr = 24'83,  $MH^+$  =2631,36; Tr = 25'36,  $MH^+$  =2799,50; Tr = 29'71,  $MH^+$  =2005,78), aucun ne possède la masse attendue de 2094, 94.

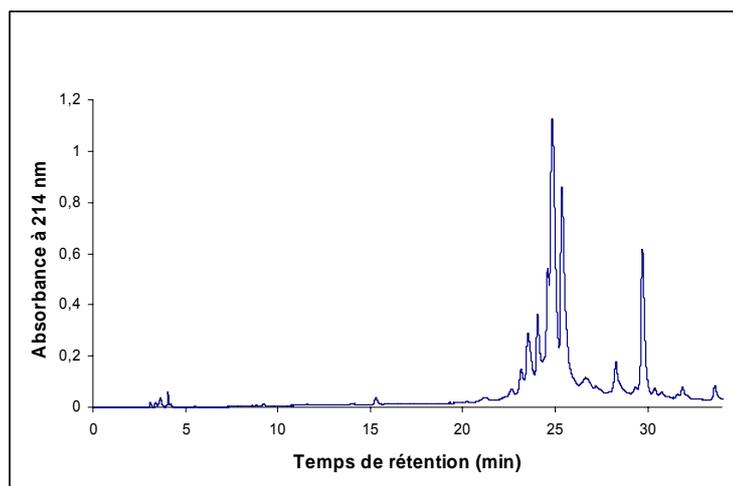


Figure 101: Chromatogramme de  $MUC_a[D_{11}(All), R_{13}[bis(\omega, \omega')-Aloc]-OH$  31  
Gradient : 3-30%B en 30 minutes

Le fait que de nombreux produits possèdent une masse nettement supérieure conduit à une hypothèse de structures branchées, notamment sur l'azote  $\delta$  du guanidinium. Le  $N^\delta$  du dérivé-Arg[bis( $\omega, \omega'$ )-Aloc]- serait suffisamment nucléophile pour être partiellement acylé par des acides aminés activés. En effet, la principale réaction parasite reportée dans la littérature avec l'arginine est une cyclisation intramoléculaire en milieu basique par attaque de l'azote  $\delta$  non protégé, sur le carboxyle activé pour conduire à un  $\delta$ -lactame (2-pipéridone) (Figure 102).

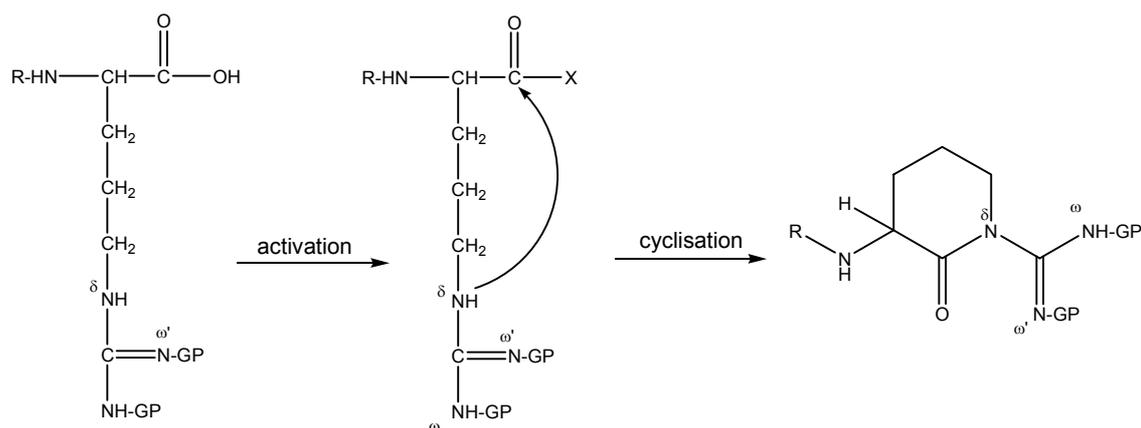


Figure 102 : Formation de  $\delta$ -lactame à partir de l'arginine  
GP: groupe protecteur; X: activation du carboxyle et R: chaîne peptidique

Pour documenter cette hypothèse, nous avons effectué la même synthèse avec le dérivé Fmoc-Arg[bis( $\delta, \omega$ )-Aloc]-OH (Figure 103), un dérivé de l'arginine où l'azote nucléophile  $\delta$  du guanidinium est protégé par un Aloc (voir ref 76-79 du livre Solid-

phase peptide synthesis. Paragraphe 2.2.2.2 arginine). Les résultats de l'élongation sont similaires à ceux obtenus précédemment. Les masses correspondantes aux nombreux pics HPLC ne nous ont pas permis d'identifier les produits formés.

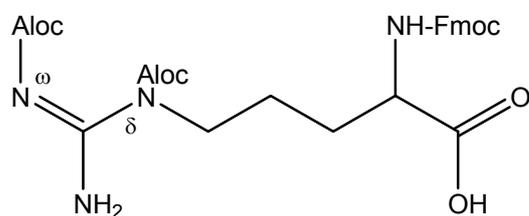


Figure 103: Fmoc-Arg[bis( $\delta$ ,  $\omega$ )-Aloc]-OH

Dans la littérature, peu de synthèses en chimie des peptides ont été décrites avec une arginine bis protégée par un Aloc en stratégie Fmoc/*t*Bu. Dans les conditions standards d'élongation peptidique et en présence de pipéridine, Boc-Arg(Aloc)<sub>2</sub>-OH perd un groupe Aloc pour donner Boc-Arg(Aloc)-OH lors du traitement à la pipéridine (Loffet et Zhang. 1993 ; Gothe *et al.* 1999).

L'histogramme (Figure 99) montre une augmentation du signal UV lors de l'élimination du groupe Fmoc de l'acide aspartique 11 en position n-2 par rapport à l'arginine 13. A ce stade de la synthèse, trois traitements à la pipéridine ont été effectués et un groupe Aloc a pu en être affecté. Un azote  $\delta$  du guanidinium devient par conséquent plus nucléophile et réagit alors avec l'acide aspartique activé. On génère ainsi une élongation parallèle sur la chaîne latérale de l'arginine et le signal UV s'élève et perdure jusqu'à la fin de la synthèse. La littérature ne mentionne pas de réaction secondaire de ce type.

Pour étudier une éventuelle influence de la nature des acides aminés en position n-1 et n-2 de l'arginine 13, nous avons effectué la synthèse de 4 analogues avec le dérivé Fmoc-Arg[bis( $\delta$ ,  $\omega$ )-Aloc]-OH (Figure 104).



Figure 104: Analogues **33**<sub>T-A</sub>, **33**<sub>D-A</sub>, **33**<sub>TD-AA</sub>, élaborés à partir du composé **33**

Les histogrammes des quatre composés sont similaires et présentent une augmentation anormale du signal lors de l'élimination du groupe Fmoc du deuxième acide aminé (n-2) après R13. Les analyses HPLC de ces composés révèlent une multitude de pics caractéristiques d'une mauvaise synthèse. La nature des acides aminés en n-1 et n-2 de l'arginine 13 n'a donc pas d'effet sur la difficulté de synthétiser **30**.

La synthèse de MUC<sub>a</sub> effectuée avec Fmoc-Arg(Pbf) (Figure 105) s'est révélée satisfaisante.

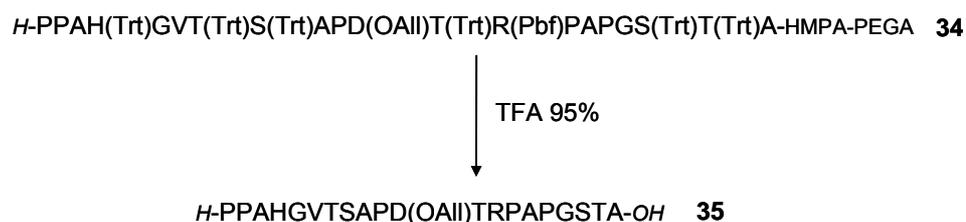


Figure 105: Synthèse de MUC<sub>a</sub>[D<sub>11</sub>(OAll),R<sub>13</sub>(Pbf)]-HMPA-PEGA **34**

L'histogramme (Figure 106) ne révèle aucune anomalie de synthèse et confirme que le problème provient de l'arginine bis-protégée dans nos conditions opératoires.

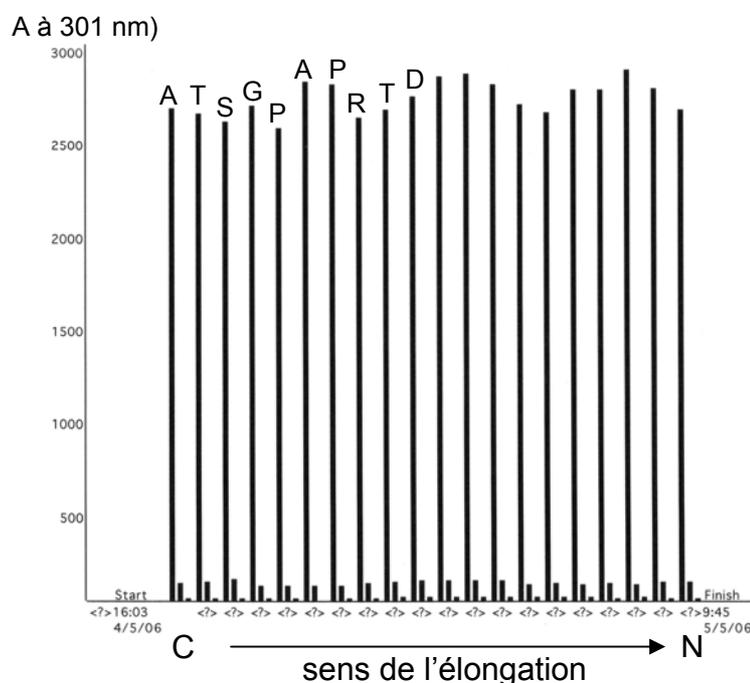


Figure 106: Histogramme relatif au suivi UV des déprotections du Fmoc de **34**

Une autre alternative consisterait à protéger l'arginine par un groupe SES [2-(triméthylsilyl)éthane sulfonyl] qui s'élimine dans des conditions douces en présence d'ion fluorure (Rivière *et al.* 2006). Cette hypothèse n'a pas été testée dans le cadre de cette thèse.

L'analyse par HPLC et SM du peptide **35** (Figure 107) a mis en évidence la présence d'un produit secondaire (10%) avec un  $\Delta m = -18$  ( $MH^+ = 1926,96$ ) probablement due à la formation d'aspartimide au cours de l'élongation du peptide (Lauer *et al.* 1994 ; Vigil-Cruz *et al.* 1999 ; Mergler *et al.* 2003 : deux articles a et b).

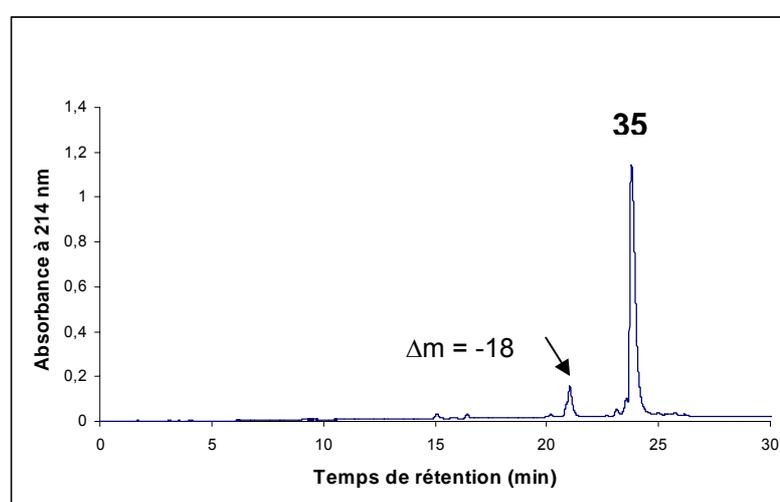


Figure 107: Profil HPLC de H-MUC<sub>a</sub>[D<sub>11</sub>(OAlI)]-OH **35** après une coupure au TFA  
Gradient : 3-30%B en 30 min

Cette réaction secondaire est particulièrement observée lors de l'utilisation de l'acide aspartique protégé sur sa chaîne latérale par un ester d'allyle (Flora *et al.* 2005) (figure 108).

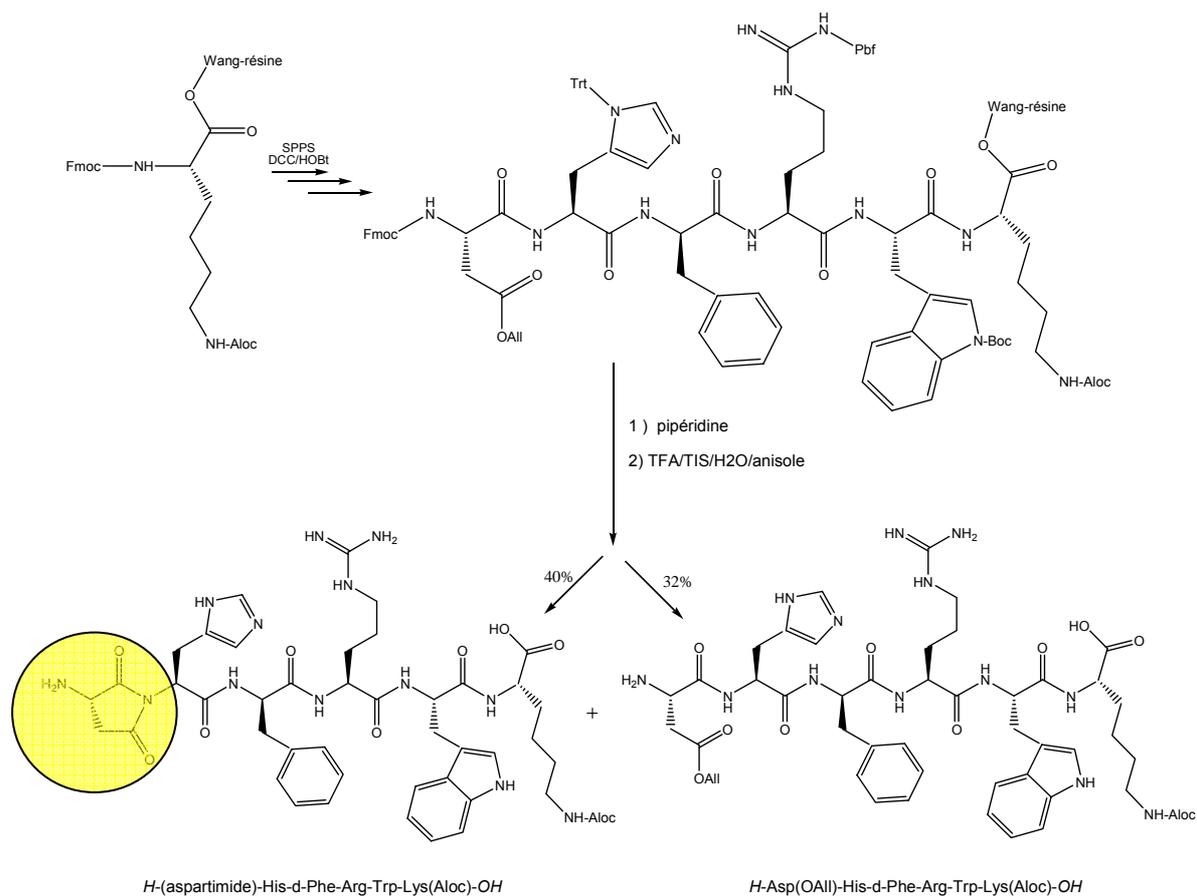


Figure 108 : Formation d'aspartimide sur support solide lors du traitement à la pipéridine.

La protection du carboxyle de la chaîne latérale de l'acide aspartique sous la forme d'un ester d'allyle est un bon groupe partant et favorise la formation d'aspartimide lors du traitement à la pipéridine. Une solution envisageable est l'utilisation d'un groupe protecteur très acido-labile sur l'acide aspartique comme le Fmoc-Asp(O-2-Ph/Pr)-OH (Figure 109), qui est déprotégé avec 1% de TFA (Gea *et al.* 2006). L'inconvénient principal de ce composé commercialisé récemment par Novabiochem est son prix !

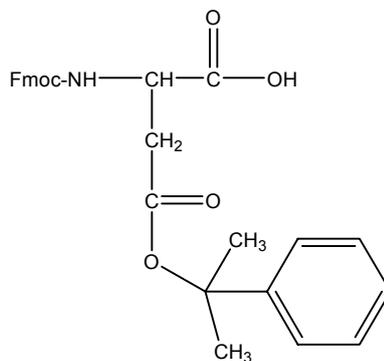


Figure 109: Schéma de la Fmoc-Asp(O-2-PhiPr)-OH

## Conclusion

Face à ces difficultés et avec l'objectif principal de synthétiser des analogues de la protéine MUC1 par ligation polyoxime sur support solide, nous avons décidé de substituer le peptide MUC<sub>a</sub> en position C-terminale par un peptide plus court PPAHGVTSa appelé MUC<sub>b</sub>. Nous avons donc poursuivi notre travail par la synthèse des molécules 1' et 2' (Figure 110).

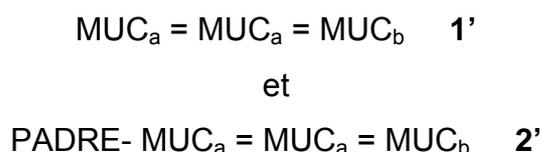


Figure 110 : Peptides 1' et 2'

### IV. 2. Synthèse des molécules 1' et 2'

#### • Choix des groupes protecteurs de la séquence H-Aoa-MUC<sub>b</sub>-HMPA-PEGA 6':

La synthèse du peptide résine C-terminal 6' est envisagée selon le schéma présenté Figure 111.

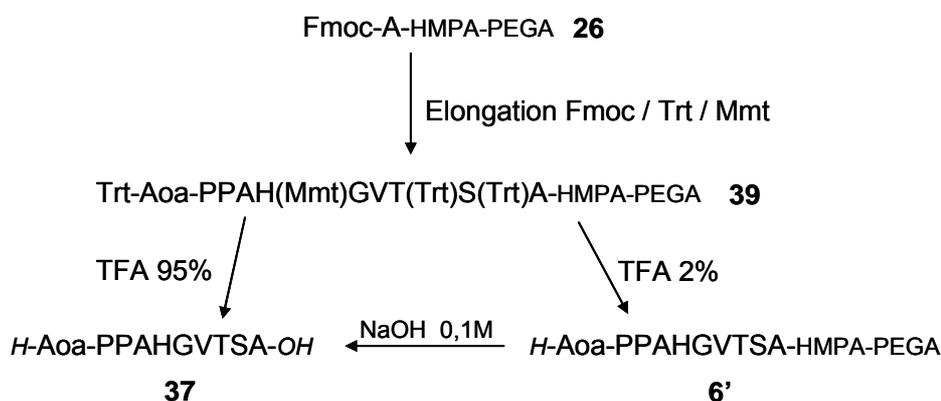


Figure 111: Obtention du peptide résine 6'

#### • Protection de Aoa

Dans le but d'effectuer en une seule étape, la déprotection des chaînes latérales et la libération de l'Aoa situé en position N-terminale, nous avons choisi d'introduire cet acide aminooxy protégé avec un trityl.

- Synthèse de Trt-Aoa-OH: Trt-Aoa-OH **38** n'est pas commercial. Il a été synthétisé au laboratoire selon le schéma de la Figure 112.

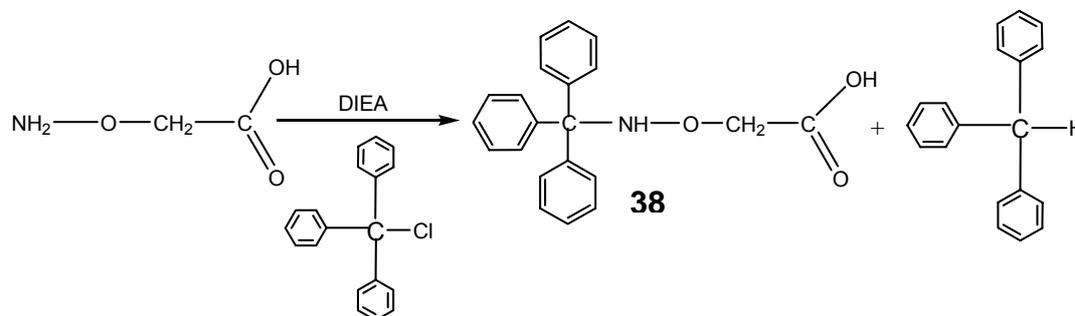


Figure 112: Synthèse du composé Trt-Aoa-OH **38**

L'acide aminoxy acétique (Aoa) a été dissout dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en présence de DIEA et de chlorure de trityl. Le suivi de la réaction par chromatographie sur couche mince (CCM) a permis de déceler un autre composé correspondant à la fixation d'un deuxième trityl (**38'**:Trt-Aoa-Trt) sur le composé **38** (Figure 113). La méthanolyse de **38'** suivie d'une purification par colonne de silice flash a permis d'obtenir le bon produit **38** avec un rendement de 80%.

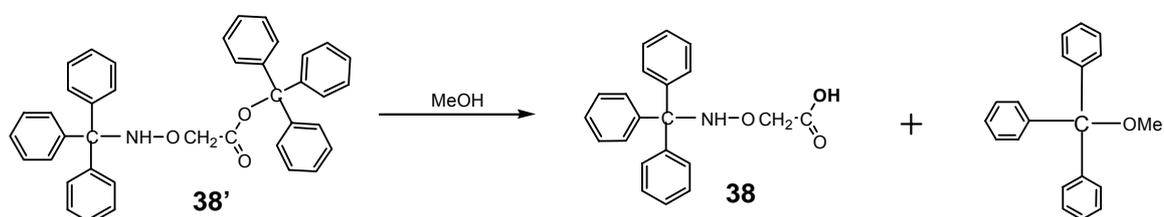


Figure 113: Schéma de méthanolyse du composé bis tritylé

- Déprotection du Trityl en solution diluée de TFA :

La déprotection du Trt par TFA, en présence de TIS, génère du triphénylméthane qui comme le Trt-Aoa-OH, absorbe à 254 nm (Figure 114).

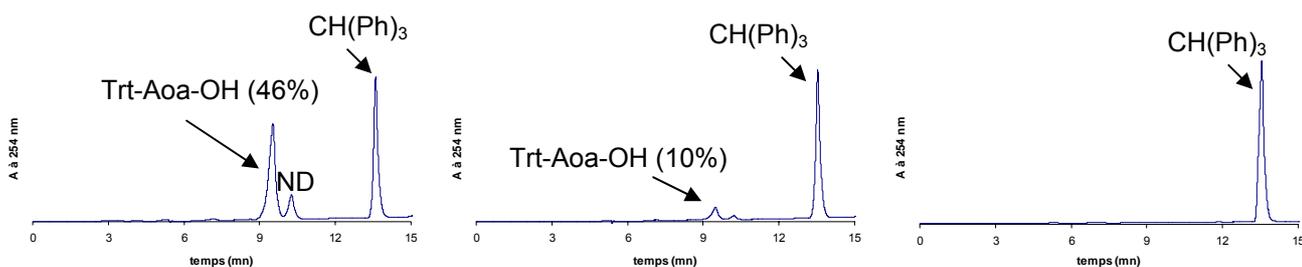


Figure 114: Analyse HPLC de Trt-Aoa-OH en solution 0,5 % de TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Les résultats obtenus montrent que 0,75 % de TFA suffisent à déprotéger de façon quantitative Trt-Aoa-OH et nous confortent dans le choix du traitement de déprotection envisagé (2% de TFA dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en présence de TIS) (Figure 115).

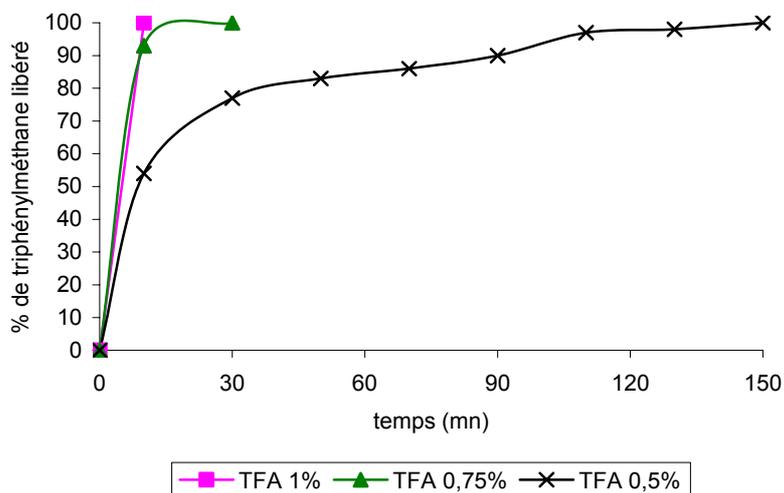


Figure 115: Effet du pourcentage de TFA sur la déprotection de Trt-Aoa-OH

### ● Protection de His

Concernant l'histidine, les travaux de Barlos (1991) sur différents groupes protecteurs (Trt/Mtt/Mmt) de l'histidine s'éliminant en fonction du pourcentage de TFA nous ont conduit à choisir le méthoxytrityl (Mmt), Trt étant stable à 2% de TFA (Figure 116).

temps (min)	Fmoc-His(Trt)-OH	Fmoc-His-OH
10	12	88
30	4	96
60	0	100

Figure 116: Déprotection de Fmoc-His(Trt)-OH restant en présence de 95% de TFA dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et en présence de TIS. La cinétique a été suivie par HPLC à 254 nm. Les % sont calculés après intégration des pics HPLC.

Fmoc-His(Mmt)-OH commercial a été analysé par HPLC (Figure 117). A côté du produit souhaité, on observe 25 % d'un produit secondaire identifié comme étant Fmoc-His-OH. Le profil de ce chromatogramme avec la présence d'un plateau entre les deux pics est caractéristique d'une dégradation du composé de départ pendant l'analyse HPLC (Aucagne *et al.* 1999 ; Oxelbark *et al.* 1999. La RMN du produit de départ a révélé également la présence de Fmoc-His-OH. Le produit commercial a donc été purifié avant utilisation.

Remarque : cette déprotection partielle peut conduire à des réactions secondaires (Hernandez *et al.* 1997).

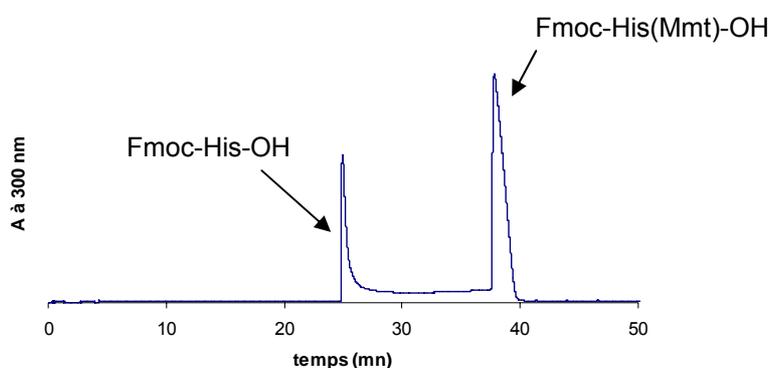


Figure 117 : Profil HPLC de Fmoc-His(Mmt)-OH ; Gradient HPLC : 3-90% B en 50 mn

La détritylation de Fmoc-His(Mmt)-OH par 1 % de TFA dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en présence de 2% de TIS a donc été suivie par CCM révélée par des vapeurs de TFA. Au bout de 10 minutes la déprotection est quantitative

#### IV. 2. 1. Synthèse du peptide C-terminal H-Aoa-MUC<sub>b</sub>-HMPA-PEGA 6'

L'élongation du composé **39** a été effectuée en stratégie Fmoc / Mmt / Trt. Le Trityl-Aoa-OH a été couplé manuellement avec HATU/DIEA pendant 2 heures. Notons que l'on n'observe pas de produit bis-acylé avec un Aoa protégé par un trityl. La déprotection des chaînes latérales et de l'Aoa a été réalisée en flux continu par 2% de TFA dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en présence de 2% de TIS. Le peptide-résine **6'** est alors obtenu. Le flux continu permet de minimiser la présence des carbocations très réactifs lors de la réaction. La disparition de la coloration jaune orangé (cations trityl et méthoxytrityl) indique que la réaction est terminée. Ceci a été confirmé par l'analyse HPLC et SM du

peptide **37** (Figure 118) obtenu après traitement à la soude 0,1N d'un aliquote du peptide-résine **6'**.

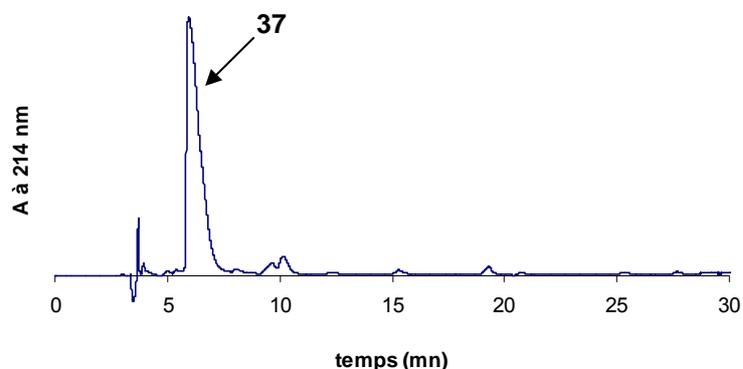


Figure 118: Analyse du peptide  $H\text{-Aoa-MUC}_b$  :  $H\text{-Aoa-PPAHGVTSA-OH}$  **37**  
gradient : 3-30% B en 30 mn

#### IV. 2. 2. Synthèse des fragments N-terminaux **3** et **7**

La synthèse du peptide aldéhyde **3** (Figure 119) a été effectuée dans les mêmes conditions que pour la synthèse du fragment médian  $\text{Aloc-Aoa-MUC}_a\text{-NH-CH}_2\text{-CHO}$  **5**.

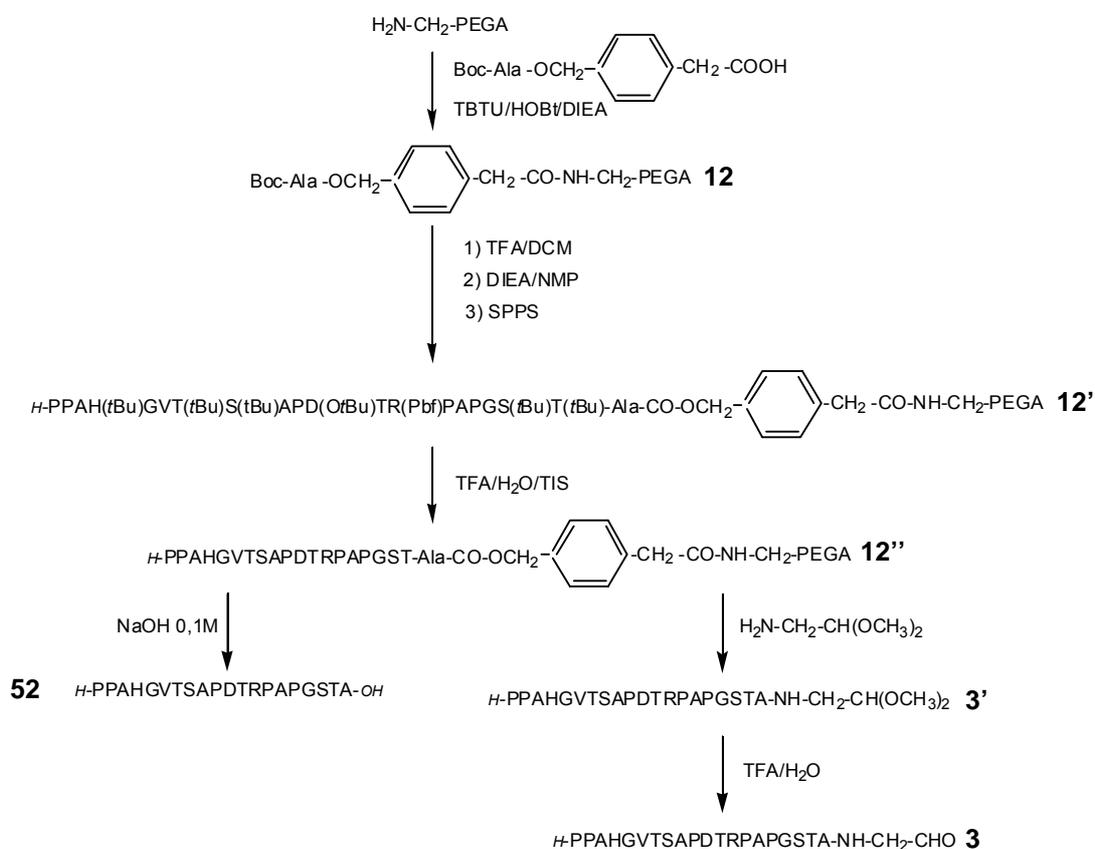


Figure 119: Synthèse du fragment N-terminal **3**

Lors de l'analyse par HPLC de  $H\text{-MUC}_a\text{-NH-CH}_2\text{-CH(OCH}_3)_2$  **3'** obtenu après 18 heures d'aminolyse à 40°C avec  $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(OCH}_3)_2$  dans du DMF (1:1), une impureté **3''** représentant 33% du produit attendu a été détectée (Figure 120).

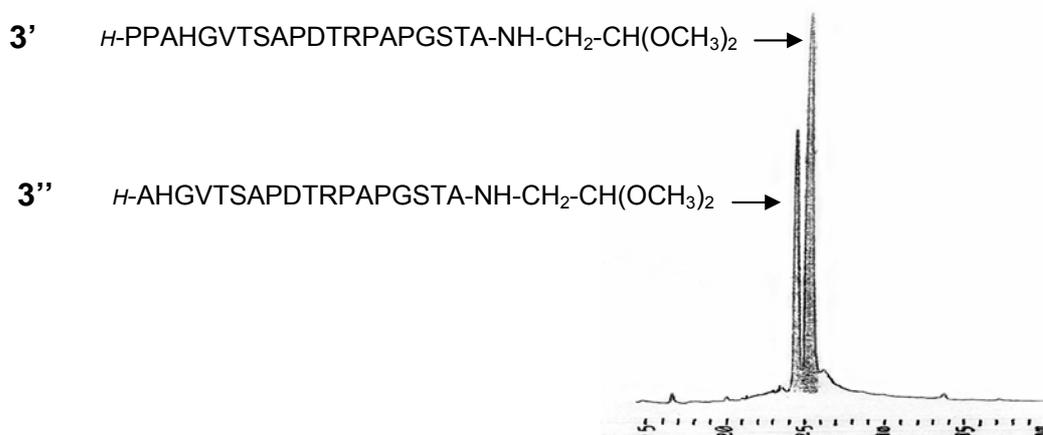


Figure 120 : Profil HPLC de **3'** après aminolyse ; gradient 3-30% de B en 30 mn

L'analyse par spectrométrie de masse de **3'** a permis de déceler un déficit de masse ( $\Delta m = -194$ ) probablement dû à l'absence des deux prolines N-terminales de  $\text{MUC}_a$ . Le contrôle *a posteriori* de l'élongation par le dosage spectrophotométrique UV de l'adduit dibenzofulvène-pipéridine, indique que ces deux prolines ont bien été couplées. Les caractérisations par spectrométrie de masse en tandem (détermination de la séquence primaire des acides aminés constitutifs par analyse des ions fragments Y et B) et le séquençage d'acides aminés d'Edman indiquent que l'acide aminé N-terminal de **3''** est une alanine et conforte notre hypothèse. En outre une coupure à la soude du peptide **12''** selon la procédure générale conduit au peptide **52** sans aucune délétion. Cette perte des deux acides aminés du côté N-terminal peut s'expliquer par formation d'une dicétopipérazine (DKP) c(Pro-Pro) lors de l'aminolyse.

La formation de DKP est une réaction secondaire classique qui résulte le plus souvent de la rupture par aminolyse intramoléculaire d'une liaison ester et plus rarement d'une liaison amide, conduisant à un dipeptide cyclique. Cette réaction secondaire qui peut se produire en milieu acide et basique est bien documentée en solution et en phase solide du côté C-terminal (c'est-à-dire quand elle résulte de la rupture d'une liaison ester) mais elle est rarement observée du côté N-terminal (c'est-à-dire quand elle résulte de la rupture d'une liaison amide) (Revue de Fischer.2003). Dans le but de prouver d'une part, l'hypothèse de formation de c(Pro-Pro) lors de

l'aminolyse et d'autre part de minimiser cette réaction secondaire, des expériences complémentaires ont été réalisées.

- Le temps de la réaction de l'aminolyse réduit à 6 h révèle (Figure 121) une diminution du peptide tronqué **3''** (10 %). On peut noter sur le chromatogramme HPLC, la présence du composé **3** probablement due à une hydrolyse partielle de l'acétal de **3'** en présence de 0.1 % de TFA dans les solvants HPLC.

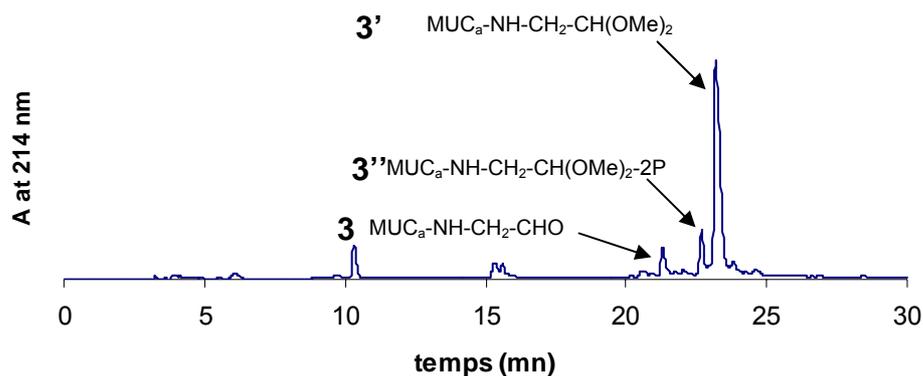


Figure 121: Profil HPLC du peptide **3'** après 6 heures d'aminolyse gradient : 3-30% B en 30 mn

- L'absence de charge sur c(Pro-Pro) ne permet pas sa caractérisation directe par spectrométrie de masse. Le dérivé **40** a donc été synthétisé, caractérisé par HPLC et RMN puis co-injecté avec les produits de la réaction issus de l'aminolyse. Le chromatogramme obtenu (Figure 122) montre clairement l'augmentation d'un pic observé vers 15 minutes. Notons que le pic adjacent a été identifié comme étant un sel de pipéridine.

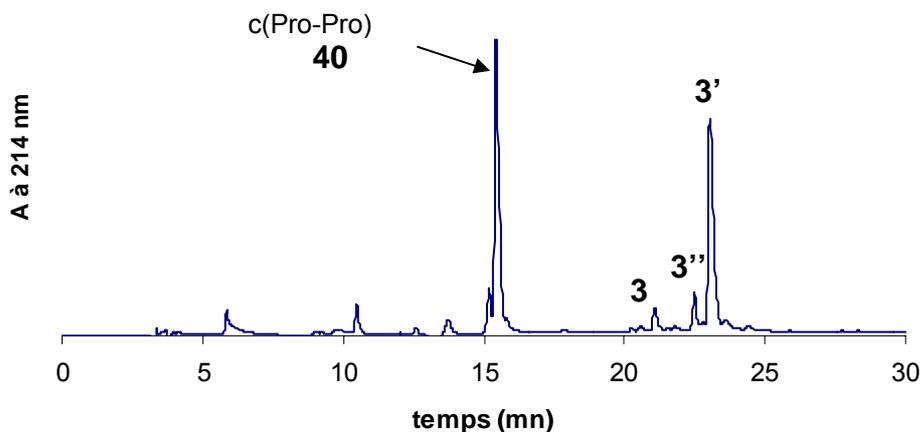


Figure 122: Co-injection des produits issus de l'aminolyse et de c(Pro-Pro) **40** gradient : 3-30% B en 30 mn

- Une acétylation effectuée en fin de synthèse sur le support de solide par de l'anhydride acétique et de la DIEA dans du DMF (2 :1 :2) suivie d'une aminolyse [aminoacétaldéhyde diméthylacétal  $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(OCH}_3)_2$  dans du DMF (1 :1)].ne génère que le produit attendu  $\text{Ac-MUC}_a\text{-NH-CH}_2\text{-CH(OCH}_3)_2$  **41**

- L'effet séquence :

Les travaux décrits dans la littérature concernant la nature des acides aminés favorisant la formation de DKP générée par aminolyse d'un ester, nous ont amené à préparer les analogues de  $\text{MUC}_a$  représentés sur la Figure 123. Seul, le composé **46** est contaminé par un peptide (4%) dont les 2 derniers acides aminés (**AP**) ont été délétés.

**APAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 42**

**GPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 43**

**PAAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 44**

**PGAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 45**

**APPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 46**

Figure 123: Séquences d'analogues de  $\text{MUC}_a\text{-NH-CH}_2\text{-CH(OCH}_3)_2$

La liaison planaire amide du squelette des polypeptides est principalement obtenue en conformation *trans*. Pour des isomères géométriques de liaison peptidique Xaa-Pro, la différence d'énergie entre les isomères *cis* et *trans* est très faible (0.5 kcal/mol) alors qu'en moyenne, dans les autres cas (quand Xaa est en N-terminal de n'importe quel acide aminé autre que Pro), elle est de 2.5 kcal/mol. De ce fait, le passage d'une forme *trans* à *cis* pour des composés de type Xaa-Pro est facilitée. Dans la nature, la conformation *cis* représente moins de 2% par rapport à la conformation *trans*. Des polypeptides ayant des enchaînements Xaa-Pro dans leur séquence ont un pourcentage de liaison *cis* amide qui peut varier de 10 à 30% (Stewart *et al.* 1990). Avec cette conformation, une attaque intramoléculaire d'une amine sur un carboxyle est alors possible en raison de leur proximité.

La structure du dipeptide Pro-Pro en position N-terminale de la séquence MUC<sub>a</sub>, occasionnerait une contrainte conformationnelle (liaison *cis* de Pro-Pro) et amènerait l'azote au voisinage du carbonyle, favorisant ainsi, dans les conditions basiques de coupure citées ci-dessus, une aminolyse intramoléculaire par action du doublet de l'azote de la dernière proline sur le carbonyle de l'avant dernière proline, conduisant ainsi à la formation puis à la libération d'une *c*(Pro-Pro). La présence des deux prolines semble donc être cruciale pour le départ des deux derniers acides aminés par formation de DKP (Figure 124).

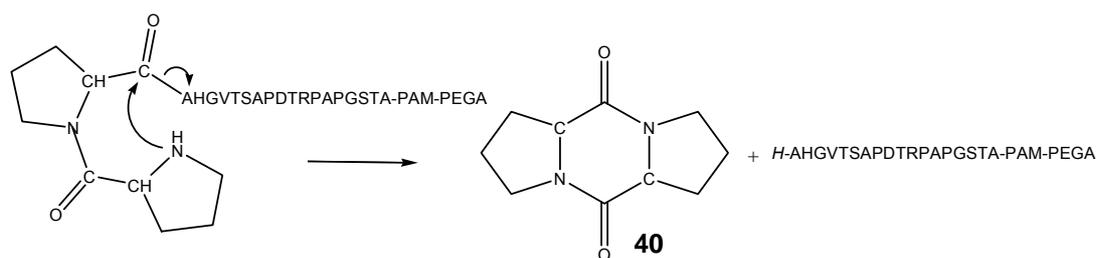


Figure 124 : Mécanisme de formation de *c*(Pro-Pro) **40** envisagé

Pour tenter de supprimer cette réaction secondaire nous avons essayé de protéger temporairement (pendant la réaction d'aminolyse) la proline située en position N-terminale par le groupe protecteur Aloc [**AlocPPAHGVT SAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 47**] (Figure 125).



Figure 125 : Synthèse du fragment N-terminal **3**

Pour ce faire, le dérivé Aloc-Pro-OH **48** a été introduit comme dernier acide aminé lors de l'élongation de MUC<sub>a</sub>-résine pour donner le peptide résine **49**. Aloc-Pro-OH **48**, non commercial, a été synthétisé selon une procédure analogue à celle suivie pour la synthèse de Aloc-Aoa-OH **16**. Après aminolyse de **49**, le peptide **47** a été traité par Pd(0) en milieu neutre pour éliminer le groupe Aloc et conduire au composé **3'**. Cette étape d'élimination de l'Aloc en milieu neutre et sur un peptide déprotégé s'est révélée difficile (déprotection d'une amine secondaire). Une étude plus détaillée décrite dans le paragraphe suivant a fait émerger les conditions opératoires en solution (0,2 eq Pd[P(Ph)<sub>3</sub>]<sub>4</sub> / 6 eq Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub> puis ajout de 6 eq H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> dans la NMP) nécessaires à une déprotection quantitative.

L'analyse du composé **3'** (Figure 126) par HPLC et SM confirme l'absence du peptide résultant de la délétion des deux dernières prolines. Le pic **3** (6%) correspond à la perte de l'acétal du composé **3'** en présence de TFA dans les solvants HPLC.

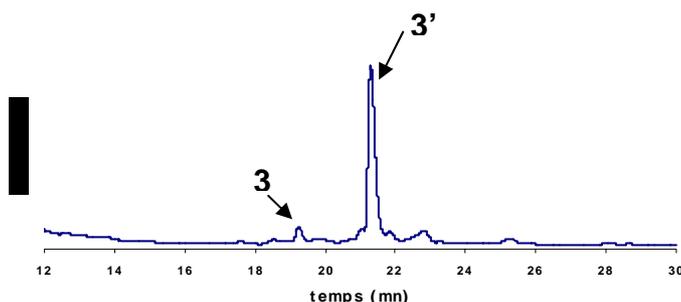


Figure 126 : Profil HPLC de **3'** brut ; gradient 3-30% de B en 30 mn

Le peptide aldéhyde **3** est finalement obtenu après traitement du peptide acétal **3'** par TFA/H<sub>2</sub>O (90/10) pendant 20 minutes (Figure 127). Le rendement global du composé **3** obtenu est de 68% à partir de la quantité initiale d'amines disponibles.

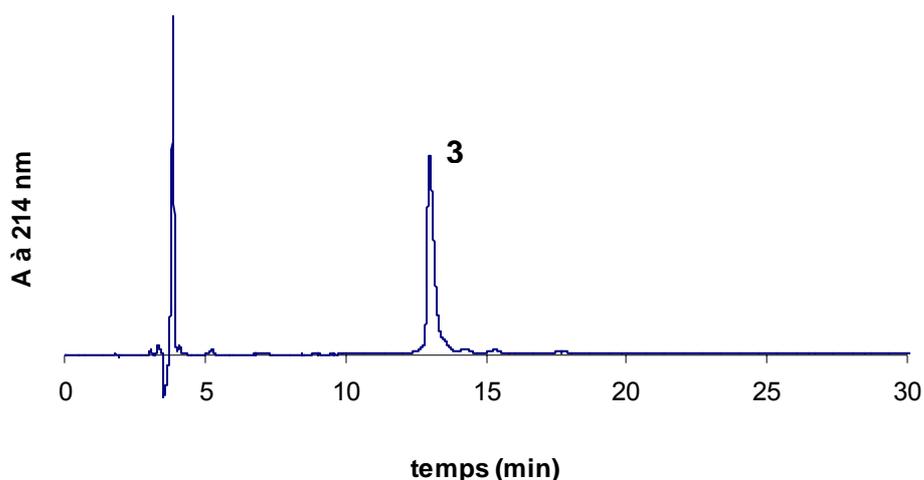


Figure 127: Profil HPLC de **3** H-MUC<sub>a</sub>-CHO après purification gradient de 10-41% de B en 50 minutes

#### IV. 2. 2. 1. Etude de l'élimination du groupe Alloc de **47**.

Tout d'abord, nous avons appliqué un mode opératoire classique [50 eq PhSiH<sub>3</sub>/ 0,2 eq Pd[P(Ph<sub>3</sub>)<sub>4</sub>], en solution, sur le composé **47** [**AllocPPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**] solubilisé dans le DMF mais sans aucun résultat. Pour faciliter l'analyse des résultats obtenus, nous avons décidé de travailler sur un analogue de **47** possédant une fonction carboxyle sur l'extrémité C-terminale. Le composé **50** [**AllocPPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-OH**] est obtenu par coupure à la soude 0,5M dans DMF/H<sub>2</sub>O du peptide resine **49**. Le DMF qui doit être distillé avant la réaction pour éliminer les traces d'amine. Il a été remplacé par un autre solvant aprotique polaire, la *N*-métyhl-2-pyrrolidinone (NMP) qui ne nécessite pas de distillation au préalable.

Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub> a été choisi à la place de PhSiH<sub>3</sub> en raison de sa plus grande efficacité lors de l'élimination d'Alloc d'amine secondaire (Gomez-Martinez *et al.* 1999). Dans ces conditions [100 équivalents de Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub> / 0,2 équivalent de Pd[P(Ph)<sub>3</sub>]<sub>4</sub>, la déprotection de **50** s'est avérée être quantitative mais on observe au bout de 90 minutes, 32% d'allylamine [**All-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-OH 50'**] en dépit de l'utilisation du nucléophile en large excès.

La formation d'allylamine peut s'opérer selon différents processus (revue de Guibé. 1998). La conversion du *N*-Aloc amine en *N*-Allyl amine implique une condensation décarboxylative intra-moléculaire (intra – paire d'ions) entre le complexe cationique  $\pi$ -allylique et le contre-anion carbamate (Merzouk *et al.* 1992) (Figure 128). L'amine déprotégée sous forme d'amidure peut être en compétition avec le nucléophile et réagir alors avec le complexe  $\pi$ -allylique.

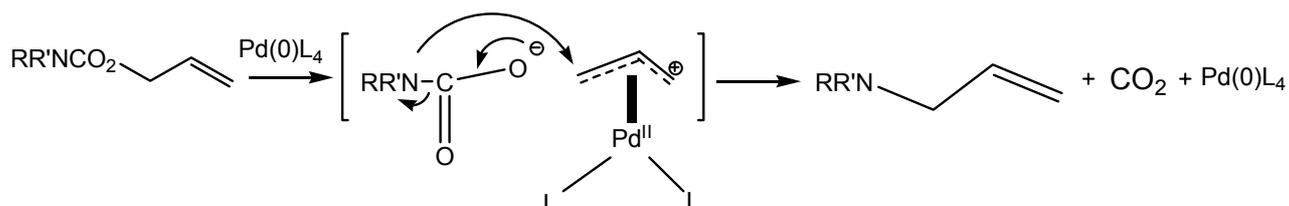


Figure 128: Formation d'allylamine par condensation décarboxylative

Les dérivés Aloc d'amines en présence du catalyseur Pd(0) et en absence de nucléophile sont connus pour leur capacité à former des allylamine après décarboxylation. De plus, la rapidité de cette réaction est fortement dépendante de la nature de l'amine ; en général, les amines secondaires, plus nucléophiles, se réarrangent plus vite que les amines primaires (Minami *et al.* 1985 ; Merzouk *et al.* 1992 ; Genêt *et al.* 1993).

Le peptide **51** (Aloc-APPAHGVTSPDTRPAPGSTA-OH) où l'Aloc est porté par une amine primaire a été synthétisé puis traité par Pd[P(Ph)<sub>3</sub>]<sub>4</sub> dans les mêmes conditions que **50**. L'élimination de l'Aloc est partielle mais sans formation d'allylamine (Figure 129).

composé	% NH~	% N-Allyl~	% N-Aloc~
<b>50</b>	68	32	0
<b>51</b>	50	0	50

Figure 129: Déprotection en solution de **50** et **51** en présence de 100 équivalents de Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub> / 0,2 équivalent de Pd[P(Ph)<sub>3</sub>]<sub>4</sub> / 90 minutes dans la NMP. Les pourcentages sont calculés après intégration des pics HPLC à 214 nm.

#### IV. 2. 2. 2. Modèle d'étude pour l'élimination de Alloc en milieu polaire: le peptide résine 49

Comme peu de travaux ont été réalisés en milieu polaire avec des peptides polaires déprotégés, nous avons entrepris une étude plus détaillée. Celle-ci a été réalisée sur support solide avec le peptide résine **49** (Alloc-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-PAM-PEGA) dans la mesure où les produits de la réaction sont éliminés avec une très grande facilité. Deux autres peptides résines **53** et **51'** compléteront l'étude [**53** : Alloc-PGR(Pbf)A-Wang-PS (amine secondaire) et **51'** : Alloc-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-PAM-PEGA (amine primaire)]. D'un point de vue pratique, après élimination de l'Alloc, la résine est rincée abondamment avec du diéthylthiocarbamate de sodium pour piéger le Pd[P(PH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>] puis le peptide est décroché de la matrice polymérique par un traitement basique à la soude 0,5M dans DMF/ H<sub>2</sub>O, puis caractérisé par HPLC et spectrométrie de masse MALDI.

Nous avons commencé par utiliser 6 équivalents de complexe diméthylamine borane (conditions de Gomez-Martinez. 1999) (Figure 130). La déprotection de l'Alloc est totale en 30 mn. En fonction du temps, le pic HPLC correspondant à l'allylamine **50'** disparaît au bout de 330 minutes au profit de l'amine secondaire désirée **52** (H-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-OH)

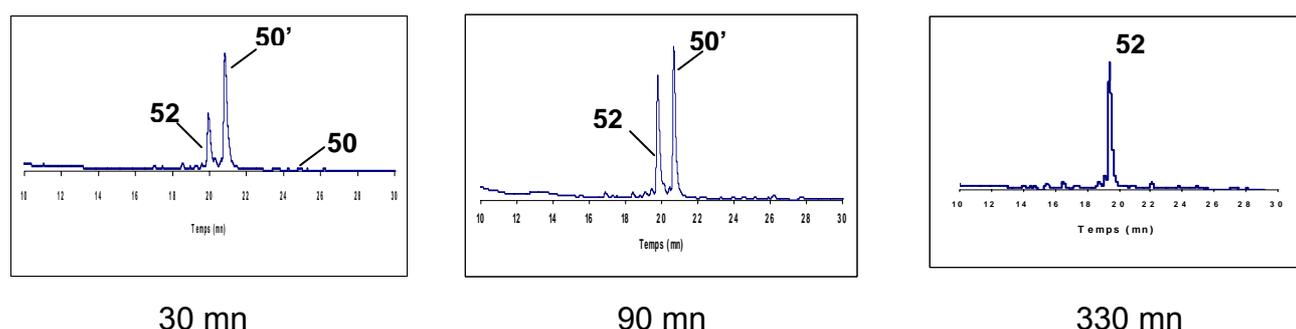


Figure 130: Suivi HPLC de la déprotection de **50** par Pd(0) (0.2 eq) en présence de Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub> (6 eq) dans la NMP. Gradient :3-30% B en 30 mn

Si on représente le pourcentage des différents produits au cours du temps (Figure 131), on constate que la formation d'allylamine est très rapide dès le début de la réaction et qu'après un plateau, une seconde réaction plus lente que la première,

permet d'obtenir l'amine dont le pourcentage augmente au fur et à mesure que le pourcentage de l'allylamine correspondante diminue.

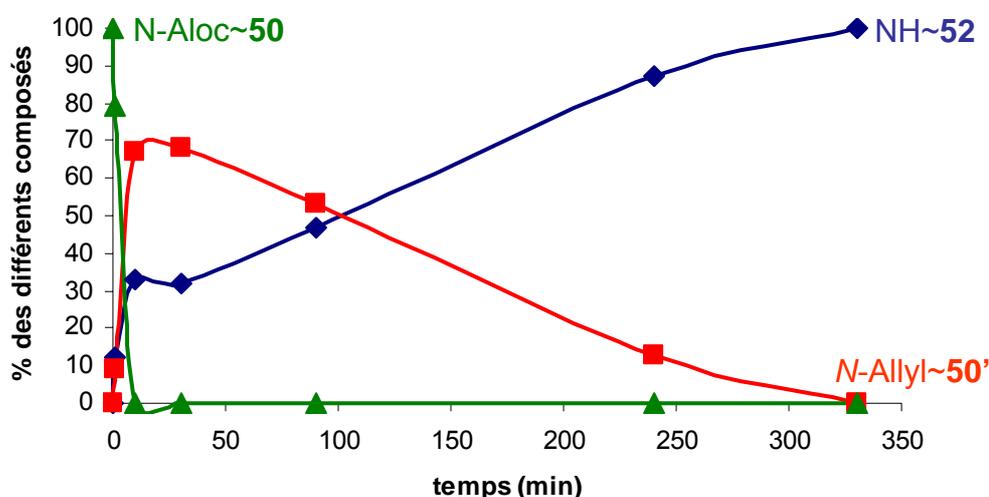


Figure 131: Cinétique de déprotection de **50** [Aloc-PPAHGVTSAPDTRPAPGSA-OH] avec 0.2 eq de Pd(0) et 6 eq de Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub>

On peut alors se demander si une augmentation de la concentration en Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub> au début de la réaction ne pourrait pas inhiber la formation d'allylamine. La réaction a été suivie à t=10 mn (Figure 132).

	Me <sub>2</sub> NH.BH <sub>3</sub> (eq)	temps (mn)	%H N~52	%N-Allyl~50'	%N-Aloc~50
1	6	10	32	68	0
2	40	10	78	22	0
3	100	10	84	16	0

Figure 132: Déprotection de **49** à t=10 mn en fonction de la concentration en Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub> avec 0,2 eq de Pd[P(Ph)<sub>3</sub>]<sub>4</sub> dans la NMP puis coupure à la soude 0,1M. Le peptide **50** généré après un traitement à la soude 0,1M est analysé par HPLC. Les pourcentages sont calculés après intégration des pics.

Effectivement le pourcentage d'allylamine formée diminue d'une manière conséquente avec l'utilisation de 100 équivalents du complexe diméthylamine borane mais la réaction n'est pas quantitative vraisemblablement due à une décarboxylation extrêmement rapide de l'anion carbamate. Normalement, l'utilisation de Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub> ne nécessite pas l'emploi d'une source de H<sup>+</sup> pour piéger l'anion formé dans la mesure où

le cation  $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{BH}_2^+$  va réagir pour former le carbamate du bore qui après hydrolyse donne l'amine correspondante (Gomez-Martinez *et al.* 1999) (Figure 133).

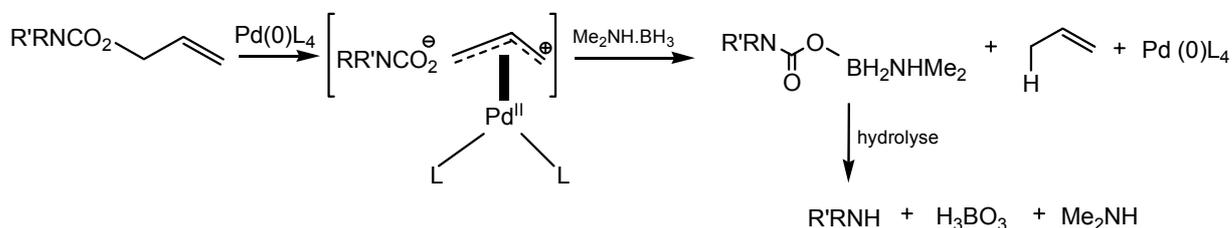


Figure 133: Mécanisme d'action du  $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{BH}_3$  sur l'Aloc

Dans la mesure où l'on en augmentant la concentration en  $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{BH}_3$ , on ne peut pas inhiber complètement la formation d'allylamine, peut-on accélérer son élimination ?

Pour cela, on choisit de suivre la réaction à  $t = 90$  minutes (Figure 134), temps où il n'y a plus de compétition entre la disparition du *N*-Aloc-**50** et la formation de *N*-Allyl-**50'**. Lorsque l'on augmente la concentration en diméthylamine borane le pourcentage d'allylamine diminue. L'amine secondaire est obtenue quantitativement avec 100 équivalents de diméthylamine borane (entrée 3).

	$\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{BH}_3$ (eq)	temps (mn)	%H N~52	%N-Allyl~50'	%N-Aloc~50
1	6	90	47	53	0
2	40	90	85	15	0
3	100	90	100	0	0

Figure 134: Déprotection de **49** à  $t = 90$  mn en fonction de la concentration en  $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{BH}_3$  avec 0,2 eq de  $\text{Pd}[\text{P}(\text{Ph})_3]_4$  dans la NMP puis coupure à la soude 0,1M. Le peptide **50** généré après un traitement à la soude 0,1M est analysé par HPLC. Les pourcentages sont calculés après intégration des pics.

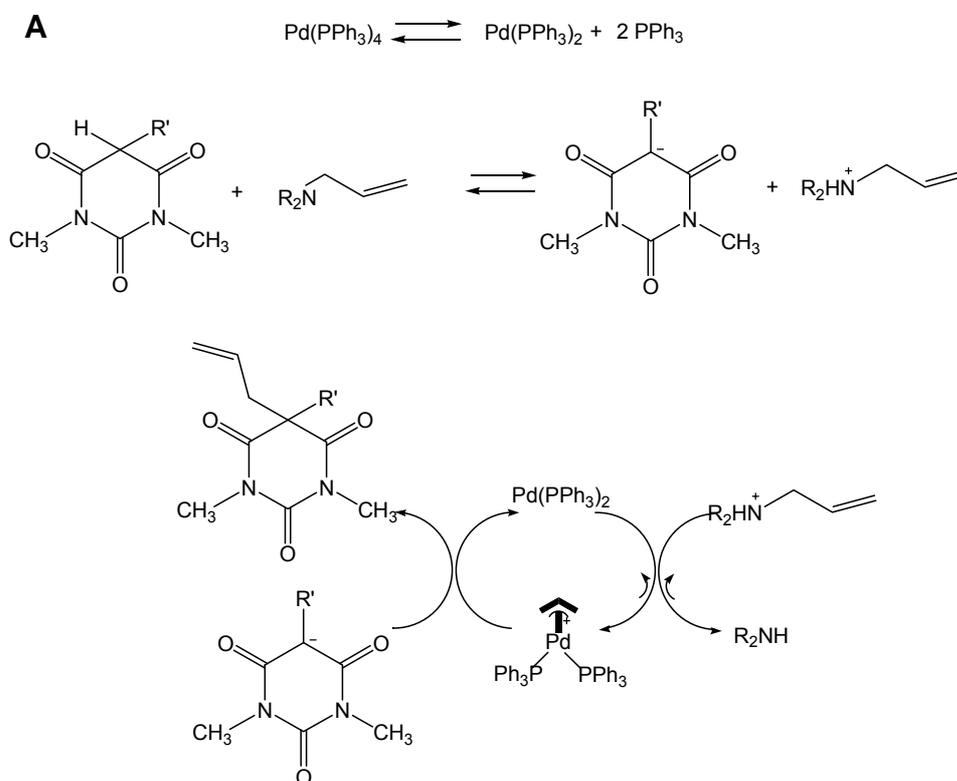
Cette réaction d'élimination de l'Aloc sur support solide a été adaptée en solution mais elle est bien moins efficace (Figure 134). Il faut augmenter le temps d'un facteur 4,5 environ (420 mn) pour aboutir à une déprotection totale. Ceci illustre ici le rôle joué par le support solide dans la cinétique de réaction. Le support solide peut

jouer un rôle important dans le succès de certaines réactions difficiles à réaliser en solution en agissant essentiellement comme co-solvant (Gilbertson *et al.* 2004).

composé	mode opératoire	temps (mn)	%H N~	%N-Allyl~	%N-Aloc~
<b>50</b>	solution	90	68	32	0
<b>49</b>	support solide	90	100	0	0

Figure 134: Déprotection de l'Aloc en solution (**50**) et sur support solide (**49**) avec 100 eq de  $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{BH}_3$ , 0,2 eq de  $\text{Pd}[\text{P}(\text{Ph}_3)]_4$  dans la NMP.

Concernant la déprotection de *N*-allylamine, les travaux de Garro-Helion (1993) et Lemaire-Audoire (1995) utilisent des pronucléophiles comme l'acide *N*-diméthyl barbiturique (NDMBA) ou l'acide thiosalicylique (TSA), espèces capables de piéger le carbocation allylique. Il y a déprotonation de NDMBA (Figure 135A) ou de TSA (Figure 135B) par l'azote de la *N*-allylamine qui devient alors suffisamment électrophile pour réagir alors avec le Pd(0) et générer ainsi le complexe cationique  $\pi$ -allylique palladié et libérer l'amine. Il y a ensuite transfert du carbocation allylique à l'énolate de l'acide barbiturique ou au thiolate de l'acide thiosalicylique lors de l'élimination réductrice du palladium.



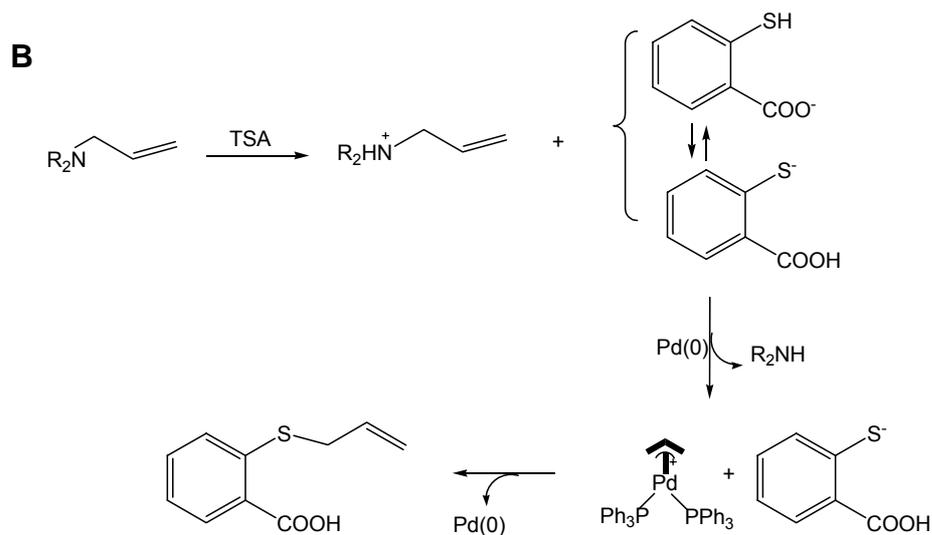


Figure 135: Déprotection d'allylamine en présence de NDMBA (A) et TSA (B)  
 A: d'après Garro-Helion et al., 1993; B: d'après Lemaire-Audoire et al., 1995.

L'utilisation du pronucléophile NDMBA (6eq) avec  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  dans la NMP, pendant 10 minutes n'a eu aucune incidence sur la déprotection de l'Aloc. Après 90 minutes de réaction, seulement 9 % d'Aloc ont été éliminés. Une augmentation de la concentration et du temps de réaction n'ont pas amélioré la déprotection.

Plus récemment, Tanaka *et al* (2006) ont mis au point un complexe catalytique à base de ruthénium  $[\text{CpRu}(\text{IV})(\pi\text{-C}_3\text{H}_5)(2\text{-quinolinecarboxylato})]\text{PF}_6$  susceptible, en présence d'acide trifluorométhanesulfonique, de déprotéger un *N*-allyloxycarbonyl-(*S*)-proline *tert*-butyl ester sans formation d'allylamine. Ils ont ajouté dans le milieu réactionnel un acide qui réagit avec l'amine déprotégée inhibant ainsi la basicité de cet amidure.

Le mécanisme d'action de  $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{BH}_3$  lors de la déprotection d'un Aloc par  $\text{Pd}(0)$  (Figure 133) fait apparaître  $\text{H}_3\text{BO}_3$  issu de la dégradation du nucléophile. Ce composé pourrait être une source potentielle de  $\text{H}^+$  nécessaire au processus de transformation de l'allylamine en amine correspondante.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous nous sommes mis dans les conditions les plus pénalisantes correspondant au pourcentage d'allylamine le plus important (Figure 136: entrée 1).

	Me <sub>2</sub> NH.BH <sub>3</sub> [eq] / Pd(0) [eq]	temps (mn)	temps additionnel avec H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	%HN~52	%N-Allyl~51'	%N-Aloc~50
1	6 / 0,2	30	/	32	68	0
2	6 / 0,2	90	/	47	53	0
3	6 / 0,2	30	60	100	0	0

Figure 136 : Incidence de l'acide borique sur la déprotection de **49**

Au bout de trente minutes de réaction, l'ajout de 6 équivalents d'acide borique pendant 60 minutes supplémentaires permet d'obtenir 100 % de l'amine souhaitée (entrée 3) sans observer d'allylamine (entrée 2).

La stabilité du complexe de diméthylamine borane et son implication directe dans le processus de transformation de l'allylamine en amine a été abordée par des expériences faisant varier la température. Nous avons pris comme référence l'expérience de déprotection avec 40 équivalents de diméthylamine borane, 0,2 équivalent de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> pendant 90 minutes dans la NMP (figure 137, entrée 1).

	Température (°C)	temps (mn)	%HN~52	%N-Allyl~50'	%N-Aloc~50
1	22	90	85	15	0
2	37	90	78	0	22
3	4	90	58	42	0

Figure 137: Déprotection de **49** en fonction de la température avec Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.2 eq) en présence de Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub> (40 eq) dans la NMP. Gradient :3-30% B en 30 mn.

A 37°C (entrée 2), la déprotection de l'Aloc est moins efficace qu'à température ambiante (entrée 1) mais il n'y a plus de réaction parasite tandis qu'à +4°C, la déprotection de l'Aloc est aussi efficace qu'à température ambiante mais la réaction parasite est importante (entrée 3). Ces résultats suggèrent qu'à +37°C, la dissociation de la paire d'ions serait plus lente puisqu'il reste du produit de départ et que parallèlement, une dissociation et une dégradation rapide du complexe Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub> libérerait plus facilement les hydrures (H<sup>-</sup>) et la source de protons (H<sup>+</sup>) nécessaire à la transformation de l'allylamine. Par contre, à +4°C, une dissociation rapide de la paire d'ions dont la proximité du carbocation allylique avec l'amidure du peptide résine 50'

favoriserait la formation d'allylamine. Parallèlement, une dissociation et une dégradation lente du complexe  $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{BH}_3$  libérerait moins d'hydrures ( $\text{H}^-$ ) et de protons ( $\text{H}^+$ ) dans le milieu réduisant alors leur efficacité sur le pourcentage d'allylamine obtenu (42%).

Le paramètre température ne nous a pas permis d'obtenir de meilleurs résultats qu'à température ambiante mais il aura tenté d'apporter une explication de l'activité synergique du complexe de diméthylamine borane.

#### IV. 2. 2. 3. Modèle d'étude pour l'élimination de Aloc en milieu polaire: le peptide résine **53**

Cette étude menée sur un peptide déprotégé et fixé sur une résine polaire a été étendue à un *N*-Aloc-d'amine secondaire de peptide protégé et fixé sur une résine apolaire [Aloc-PGR(Pbf)A-Wang-PS **53**] et un autre nucléophile couramment utilisé dans des conditions neutres :  $\text{PhSiH}_3$  dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (Figure 138).

	Solvant	temps (min)	temps suppl HCl	(%)		
				<i>N</i> -Aloc 53	NH -53	<i>N</i> -Allyl 53
1	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	90	/	24	57	19
2	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	120	/	0	65	35
3	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	300	/	0	100	0
4	NMP	90	/	65	30	5
5	NMP	300	/	14	58	28
6	NMP	600	/	0	55	45
7	NMP	1200	/	0	53	47
8	NMP	300	300	10	70	20
9	NMP	600	600	0	100	0

Figure 138: Déprotection de **53** avec  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0.2 eq) en présence de  $\text{PhSiH}_3$  (50 eq) dans différentes conditions en fonction du temps. Gradient : 3-30% B en 30 mn.

On constate encore la présence d'allylamine mais en fonction du temps, elle disparaît au profit de l'amine attendue (Figure 138 : entrées 1 à 3). On peut penser que des traces d'acide chlorhydrique (HCl) présent dans le dichlorométhane (Lloyd-Williams *et al.* 1991), peuvent être une autre source potentielle de  $\text{H}^+$  pour une éventuelle déallylation d'amine. Cette hypothèse a pu être étayée en utilisant dans les

mêmes conditions la NMP comme solvant (entrées 4 à 7). La conversion d'allylamine en amine correspondante ne se produit pas malgré un temps de réaction plus long (entrées 6 et 7). Si on ajoute 2 équivalents d'HCl anhydre dans la NMP, on obtient le résultat escompté. Notons que la réaction est plus longue dans la NMP (entrée 6) comparée au DCM (entrée 2) probablement due à une moins bonne solvataion de **53** où une cinétique du cycle catalytique du Pd(0) moins rapide dans la NMP. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans *Tetrahedron Letters* (Annexe 2 : Decostaire *et al.* 2007).

## **Conclusion**

En résumé, à un temps de réaction où il y a compétition entre l'élimination de l'Aloc et la formation d'allylamine, l'augmentation de la concentration en complexe diméthylamine borane va entraîner une présence plus importante d'hydrures (H<sup>-</sup>) qui vont piéger efficacement le carbocation allylique comparé à l'amidure de l'amine secondaire. La diminution du pourcentage d'allylamine est significative mais pas quantitative ; l'effet de proximité du carbocation allylique est certainement à prendre en considération.

En revanche, à un temps où il n'y a plus de compétition entre les deux réactions, la *N*-déallylation va pouvoir vraisemblablement être accélérée dans la mesure où l'augmentation de la concentration en diméthylamine borane va induire une libération plus importante d'un de ses produits de dégradation en l'occurrence l'acide borique qui peut être une source de protons (H<sup>+</sup>) indispensable au processus de transformation d'une allylamine en amine (Figure 139).

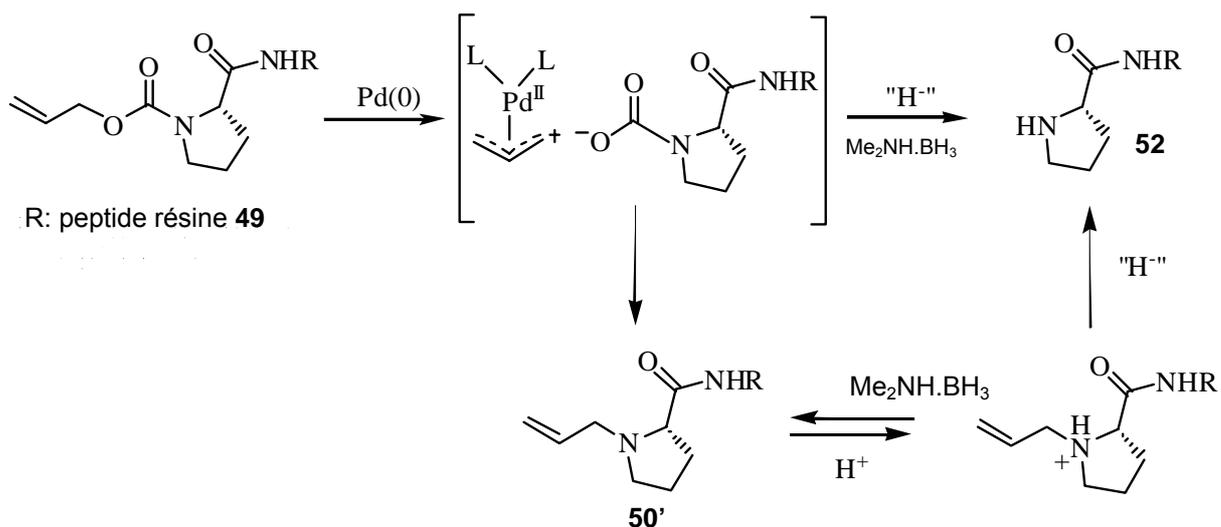


Figure 139: Activité synergique du complexe de diméthylamine borane

#### IV. 2. 3. Synthèse du composé PADRE-MUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CHO **7**

La séquence du PADRE (aKXVAAWTLKAa), peptide très hydrophobe est une « séquence difficile », phénomène décrit par Kent comme le problème le plus sérieux de la SPPS. Une méthodologie développée au laboratoire (Cremer, Hanane *et al.* 2006) montre qu'on améliore significativement le rendement d'élongation en combinant l'utilisation de la pseudoproline Fmoc-Trp(Boc)-Thr( $\Psi^{\text{Me, Me}}$ , pro)-OH (Figure 140) et une résine polaire (résine PEGA). La pseudo-proline a pour rôle de protéger l'amide en formant une oxazolidine stable au cours de l'élongation Fmoc/*t*Bu et de diminuer les capacités du peptide à former des structures secondaires en feuillet  $\beta$  stabilisés par des liaisons hydrogène. La thréonine sera régénérée en fin de synthèse lors du traitement au TFA.

Fmoc-Trp(Boc)-Thr( $\Psi^{\text{Me, Me}}$ , pro)-OH

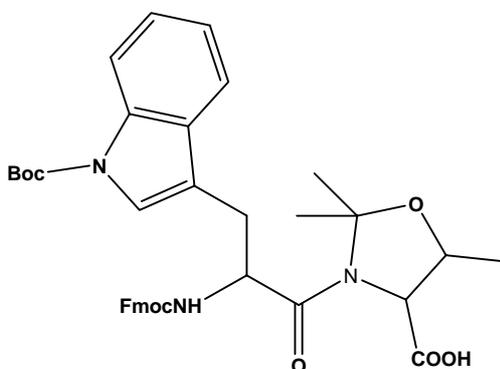


Figure 140: Pseudo-proline Fmoc-Trp(Boc)-Thr( $\Psi^{\text{Me, Me}}$ , pro)-OH

Après élongation en stratégie Fmoc/tBu à partir de *H*-Ala-PAM-PEGA, un protocole identique à celui décrit pour le peptide aldéhyde **5** a permis d'obtenir le composé attendu **7** caractérisé par HPLC et spectrométrie de masse MALDI avec un rendement d'environ 50 % (Figure 140bis).

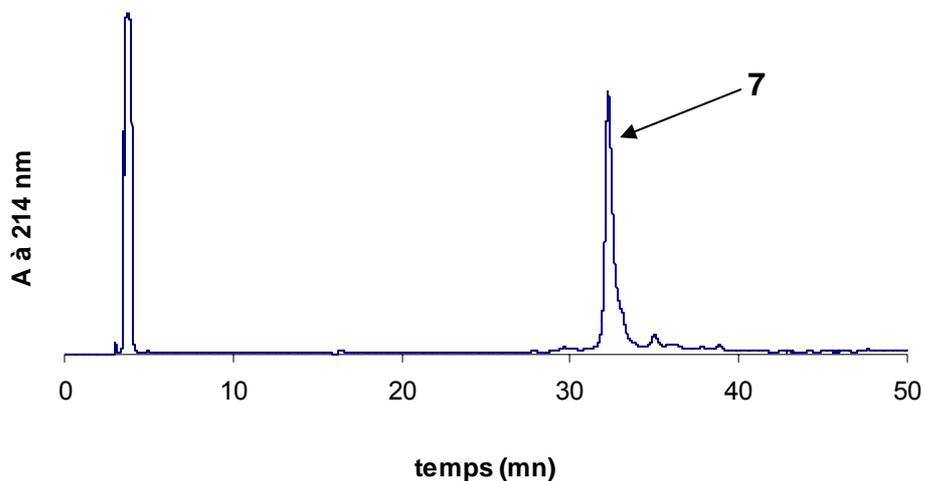


Figure 140bis: Obtention du composé **7**:PADRE-MUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CHO  
gradient : 10-41% B en 50 mn

#### IV. 2. 4. Synthèse de 1'

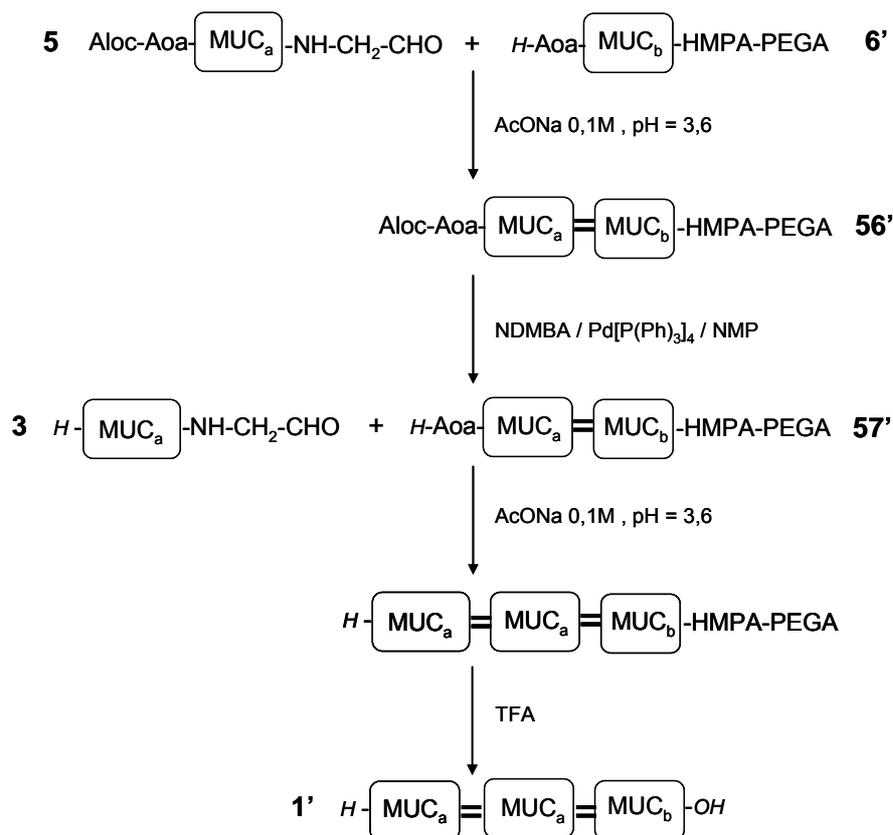


Figure 141: Synthèse de la molécule 1'

#### Première ligation

La ligation a lieu dans un tampon acétate 0,1M de pH = 3,6 avec 1,1 eq de **5** et 1 eq de **6'** pour accélérer la réaction et minimiser une éventuelle réaction de transoximation. Au cours de la réaction, un aliquote du surnageant (50µl) est régulièrement prélevé et analysé par HPLC pour suivre la disparition de Aloc-Aoa-MUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CHO. Après 3h30, la concentration de **5** ne diminue plus (Figure 142). Notons qu'à pH=4,6, la réaction durerait 5 heures.

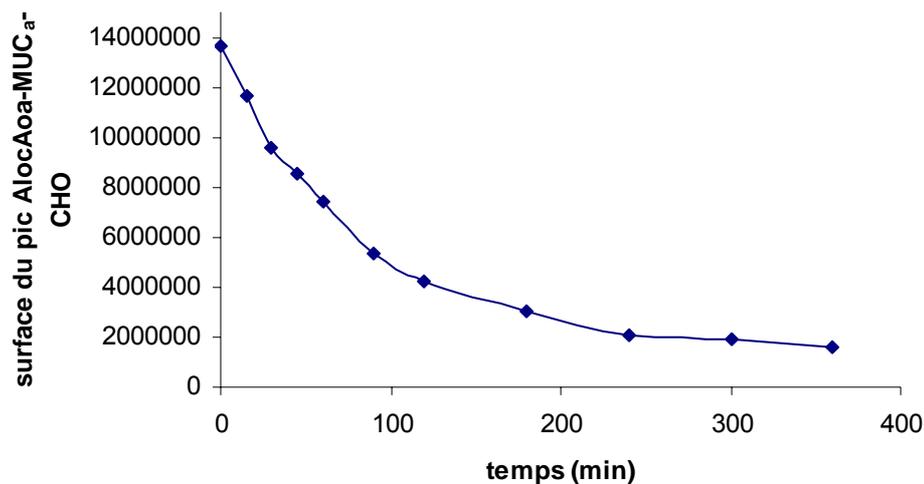


Figure 142: Suivi de la consommation du fragment **5** au cours de la première ligation oxime en fonction du temps

Le peptide-résine **56'** (Aloc-Aoa-MUC<sub>a</sub>=MUC<sub>b</sub>-HMPA-PEGA) est formé avec un rendement de l'ordre de 92%. La coupure d'un aliquote du peptide de son support par le TFA selon la procédure générale (composé **55**) permet de vérifier la qualité du produit dont la masse est confirmée par MALDI (Figure 143). Le composé **5** (0,1 éq) est récupéré dans le tampon et il pourra de nouveau être utilisé après vérification pour une ligation ultérieure.

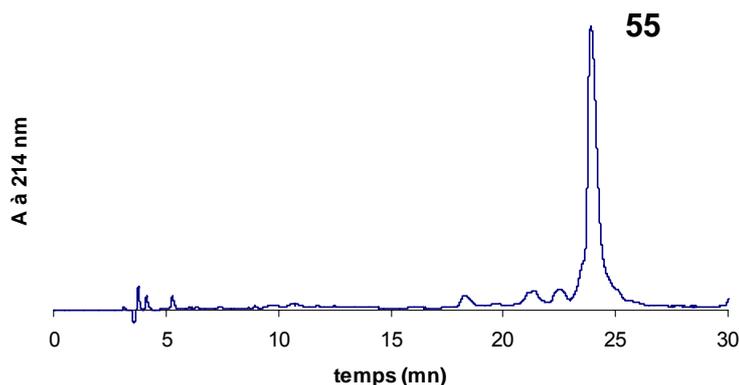


Figure 143: Obtention du composé **55**: Aloc-Aoa-MUC<sub>a</sub>=MUC<sub>b</sub>-OH  
gradient : 10-41% B en 50 mn

## Elimination de l'Aloc

Les résultats concernant l'optimisation de la déprotection d'un Aloc sur le peptide modèle **22** pour obtenir le peptide modèle **9** nous ont amené à utiliser 3 équivalents de  $\text{Me}_2\text{NH.BH}_3$ , 0,2 équivalent de  $\text{Pd}(0)$  pendant 10 minutes dans la NMP. A notre surprise, la déprotection ne s'est réalisée, qu'à 20% seulement. Plusieurs tentatives ont donné les mêmes résultats et une nouvelle étude a due être nécessaire avec le peptide-résine **14** (Aloc-Aoa-PPAHGVTSAPDTRPAGSTA-PAM-PEGA) (Figure 144). Après déprotection des chaînes latérales par TFA/TIS/ $\text{H}_2\text{O}$  (95/2,5/2,5) pendant deux heures, l'élimination de l'Aloc est entreprise. Une coupure à soude 0,1M selon la procédure générale puis une analyse HPLC permet d'analyser les résultats.

	Solvant	Nucléophile	$\text{Pd}(0)$ [eq]	Temps (mn)	% $\text{H}_2\text{N}\sim$	% Aloc-Aoa~	% $\text{HO}\sim$
1	DMF distillé	$\text{PhSiH}_3$ (50 eq)	0,2	30	56	0	44
2	NMP classique	$\text{Me}_2\text{NH.BH}_3$ (6 eq)	0,2	30	88	0	12
3	NMP classique	$\text{Me}_2\text{NH.BH}_3$ (6 eq)	0,2	15	44	54	2
4	NMP anhydre	$\text{Me}_2\text{NH.BH}_3$ (6 eq)	0,2	15	80	14	6
5	NMP anhydre	$\text{Me}_2\text{NH.BH}_3$ (6 eq)	2	15	86	0	14
6	NMP anhydre	$\text{Me}_2\text{NH.BH}_3$ (3 eq)	2	15	90	0	10
7	NMP anhydre	$\text{Me}_2\text{NH.BH}_3$ (1,5 eq)	2	15	92	0	8
8	NMP anhydre	NDMBA (6 eq)	2	30	100	0	0

Figure 144 : Optimisation des conditions de déprotection de Aloc-Aoa-MUC<sub>a</sub>-PAM-PEGA **14**.

Dans les conditions classiques (Figure 144:entrées 1 et 2), la déprotection de l'Aloc est effective mais elle s'accompagne d'une réaction d'acidolyse réductrice (44% pour l'entrée 1 et 12% pour l'entrée 2). En diminuant le temps d'analyse de la réaction (entrée 3), la déprotection est incomplète. Le recours à la NMP anhydre (entrée 4) et l'augmentation de la quantité de  $\text{Pd}(0)$  (entrée 5) permet de diviser le temps de réaction de moitié (par rapport à l'entrée 2). La diminution du nombre d'équivalents de  $\text{Me}_2\text{NH.BH}_3$  (entrées 6 et 7) ne nous a pas permis d'éliminer la réaction parasite. La fonction aminoxy étant extrêmement sensible en milieu acide réducteur, un nouveau protocole avec de la NMP anhydre et du NDMBA comme pronucléophile non réducteur (entrée 8) nous a permis d'atteindre notre objectif.

Ces conditions, proches de celles développées par Tsukamoto *et al.* (2003), génèrent une déprotection complète de l'Aoa sans acidolyse réductrice. Elles ont été appliquées à la déprotection de **56'**. La figure 89 montrant le composé  $H\text{-Aoa-MUC}_a\text{=MUC}_b\text{-OH}$  **57** est obtenue après élimination de l'Aloc et coupure d'un aliquote de la résine **57'**. A ce stade, la méthode générale de coupure d'un aliquote de peptide de la résine au TFA contenant 2,5% de TIS ne peut être utilisée. En effet, lorsque l'Aoa est libéré, la présence du TIS occasionne une réduction de la liaison -HN-O à hauteur de 15%. Par conséquent, une coupure par TFA/H<sub>2</sub>O (95/5) permet de pallier cet inconvénient et d'obtenir un rendement de déprotection quantitatif (Figure 145).

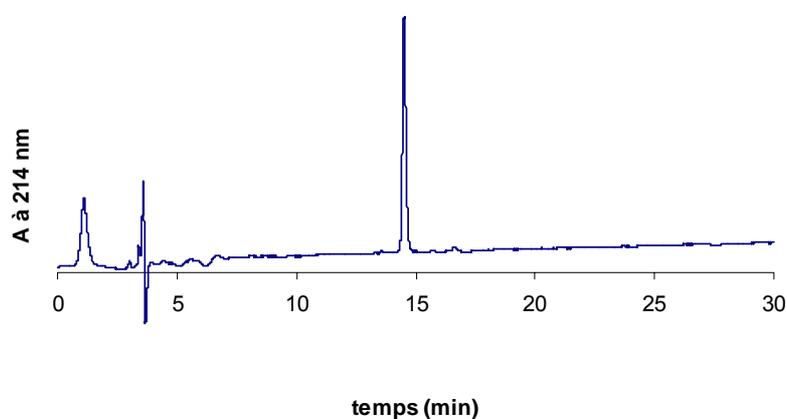


Figure 145:  $H\text{-Aoa-MUC}_a\text{=MUC}_b\text{-OH}$  avec 6 eq de NDMBA / 2 eq de  $\text{Pd}[\text{P}(\text{Ph})_3]_4$  / NMP anhydre / 30 minutes. Gradient : 10-41% B en 50 mn

### Deuxième ligation

Cette 2<sup>ème</sup> ligation oxime sur support solide est effectuée dans les mêmes conditions que la première. Dans un tampon acétate 0,1M de pH = 3,6, on utilise 1,1 eq de **3** ( $H\text{-MUC}_a\text{-NH-CH}_2\text{-CHO}$ ) en présence de 1 eq de **57'** ( $H\text{-Aoa-MUC}_a\text{=MUC}_b\text{-HMPA-PEGA}$ ). Pour suivre la cinétique de la réaction, un aliquote du surnageant de réaction est régulièrement prélevé et analysé par HPLC pour suivre la disparition de  $H\text{-MUC}_a\text{-NH-CH}_2\text{-CHO}$ . Après 3h30 de réaction, la concentration ne diminue plus (Figure 146).

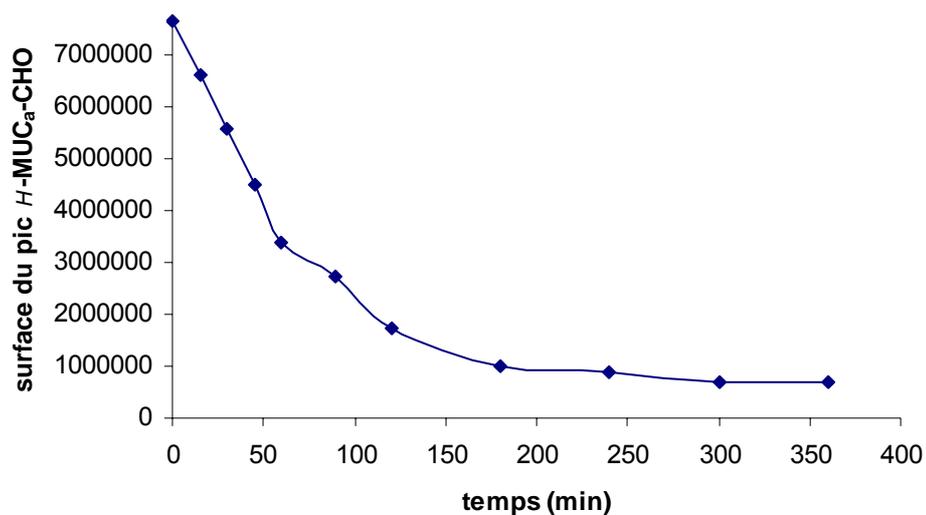
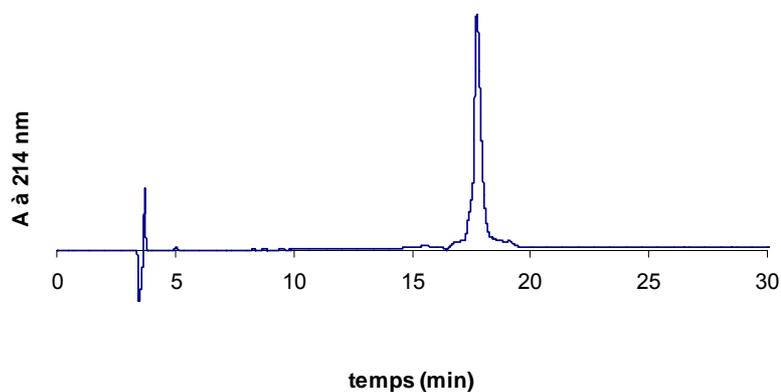


Figure 146: Suivi de la consommation du fragment **3** au cours de la seconde ligation oxime en fonction du temps

La coupure du peptide **1'** de son support par TFA selon la procédure générale puis une caractérisation par HPLC (Figure 147) et spectrométrie de masse MALDI permet d'obtenir le produit désiré avec un rendement de 52 %.



Figures 147: Chromatogramme du composé  $MUC_a=MUC_a=MUC_b-OH$  ; Gradient : 10-41% de B en 50 min

#### IV. 2. 4. Synthèse de 2'

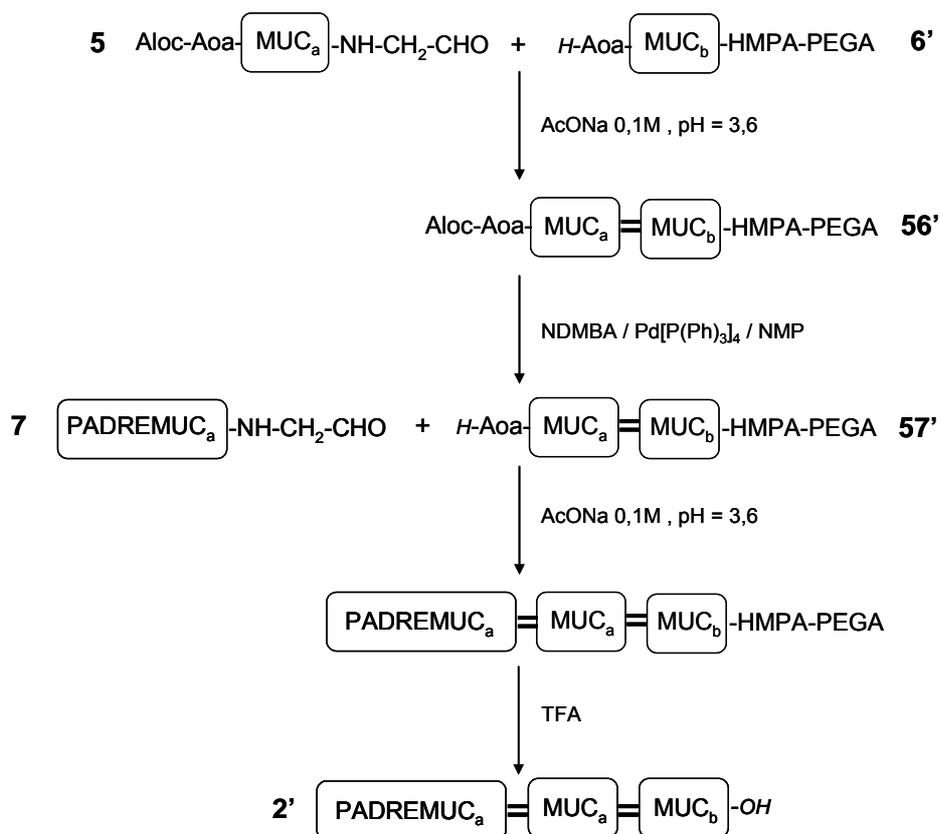


Figure 148: Synthèse de la molécule 2'

La première ligation puis l'élimination de l'Aloc conduisant au composé **57'** s'effectue exactement de la même manière que pour **1'**. La 2<sup>ème</sup> ligation oxime sur support solide est effectuée dans les mêmes conditions que la première. Dans un tampon acétate 0,1M de pH = 3,6, on utilise 1,1 eq de **7** (PADREMUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CHO) en présence de 1 eq de **57'** (H-Aoa-MUC<sub>a</sub>=MUC<sub>b</sub>-HMPA-PEGA). Pour suivre la cinétique de la réaction, un aliquote du surnageant de réaction est régulièrement prélevé et analysé par HPLC pour suivre la disparition de PADREMUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CHO. Après 3h30 de réaction, la concentration ne diminue plus. La coupure du peptide **2'** de son support par TFA selon la procédure générale puis une caractérisation par HPLC (Figure 149) et spectrométrie de masse MALDI permet d'obtenir le produit désiré avec un rendement de 33 %.

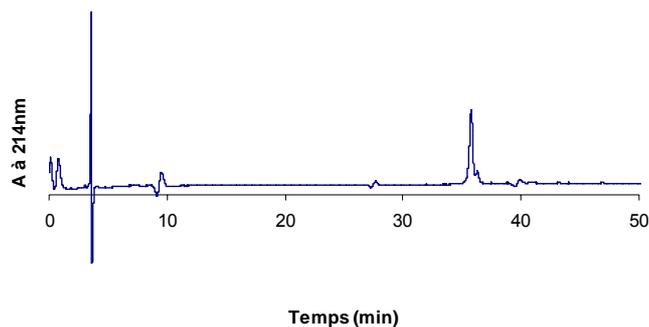


Figure 148: Chromatogramme HPLC du composé PADREMUC<sub>a</sub>=MUC<sub>a</sub>=MUC<sub>b</sub>-OH ; Gradient : 10-41% de B en 50 min

### **Conclusion générale**

Du fait de la répétitivité de la séquence peptidique MUC1 et de l'intérêt immunologique (résistance aux protéases) d'introduire des motifs chimiques « non » naturels dans les molécules visées, une stratégie de synthèse faisant intervenir la ligation chimique sur support solide a été élaborée au laboratoire.

Plusieurs unités répétitives MUC1 à partir de trois fragments déprotégés ont été couplées par ligation oxime dans le sens C vers N-terminal. La stratégie de synthèse repose sur une approche convergente basée sur la condensation par liaison oxime qui résulte d'une addition d'un aminoxy (Aoa) sur un aldéhyde. Un synthon hétérobifonctionnel, aldéhyde en C-terminal et aminoxy protégé en N-terminal, a été synthétisé et condensé sur un peptide nu fixé sur un polymère. Après ligation, le synthon bifonctionnel fixé sur la résine doit être déprotégé avant l'étape de ligation suivante. Le choix du groupement protecteur est donc crucial. Nous avons opté pour l'Aloc (allyloxycarbonyle) et avons montré que sa déprotection est compatible avec la présence de liaison oxime.

Des conditions expérimentales permettant d'avoir accès directement au premier segment déprotégé sur le support solide ont été obtenues. Nous nous sommes orientés vers une stratégie Fmoc / Mmt / Trt qui a nécessité un examen approfondi de la stabilité en milieu acide des différents groupes protecteurs des chaînes latérales des acides aminés constitutifs ainsi que les différents bras de type Wang. En outre la résine polaire PEGA a été choisie car elle autorise les réactions en milieux aqueux et elle est compatible avec la liaison oxime.

Une mise au point des conditions de couplage de l'Aloc-Aoa-OH sur le peptide-résine modèle a dû être nécessaire pour éliminer la réaction parasite d'overacylation. De plus, une étude méthodologique a été réalisée pour déterminer les meilleures conditions de déprotection de l'Aloc protégeant un Aoa sur résine en milieu polaire.

Le fragment médian contient, d'une part, une fonction aldéhyde en position C-terminale obtenue par une méthodologie développée au laboratoire et d'autre part, un aminooxy en N terminal protégé par un groupement (Aloc).

Lors de l'élaboration du synthon N-terminal **3**, le choix de l'Aloc comme groupe protecteur orthogonal du N<sup>α</sup> de la Proline située en position N-terminale a permis d'éliminer une réaction secondaire, séquence dépendante, aboutissant à la perte du dipeptide N terminal (Pro-Pro) par formation de dicétopipérazine lors de l'obtention de la fonction aldéhyde masquée sur la partie C-terminale. Néanmoins, une amine secondaire N<sup>α</sup>, plus nucléophile qu'une amine primaire N<sup>α</sup>, est sensible à la réaction d'alkylation allylique observée durant la déprotection de l'allylcarbamate et conduit à la formation non désirée d'allylamine. Une étude menée au laboratoire sur l'effet synergique de Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub>, composé pouvant être donneur d'hydrure et de proton, a permis de résoudre le problème.

En dépit des problèmes rencontrés avec l'arginine doublement protégés par un Aloc sur le guanidinium et la formation d'aspartimide lors de la synthèse de MUC<sub>a</sub> sur support solide, deux longs peptides « polyoxime » ont été obtenus avec une grande pureté et un rendement très satisfaisant. Des essais sont en cours pour augmenter le nombre de fragments médians et de liaisons oxime. La finalité de ce travail devrait aboutir à une publication.

## **V. GLYCOSYLATION**

### **INTRODUCTION**

Les résultats immunologiques disponibles obtenus avec MUC1 suggèrent que le nombre et l'emplacement des sites O-glycosylés sont des paramètres cruciaux pour l'amplitude et la qualité de la réponse immune mais aussi pour la reconnaissance sélective des cellules tumorales humaines par les anticorps produits.

Cependant, les difficultés rencontrées pour la synthèse de glycopeptides sont d'une part la stéréosélectivité des liaisons O-glycosidiques formées et d'autre part la polyfonctionnalité des peptides combinées à celle des entités saccharidiques qui nécessite l'emploi d'une large gamme de groupes protecteurs. Malgré de nombreux progrès faits dans ce domaine, la synthèse de tels glycopeptides à une échelle supérieure à 1 mmole reste difficile, l'étape limitante étant la préparation de l'acide aminé glycosylé correctement protégé. L'approche enzymatique consistant à glycosyler par réaction enzymatique un peptide déjà formé est une alternative qui permet de s'affranchir de ces difficultés (Gilsen *et al.* 1996).

### **VI. 1. Les différentes enzymes utilisées pour la glycosylation**

Il existe deux types d'enzymes pouvant être utilisées pour la synthèse de glycopeptides: les glycosidases et les glycosyltransférases.

#### **Les glycosydases**

In vivo, les glycosidases hydrolysent les liaisons glycosidiques. Sous certaines conditions, elles peuvent être utilisées pour catalyser la formation d'une liaison O-glycosidique. Il suffit d'introduire dans le milieu un accepteur de glycosyle nucléophile pour qu'il vienne piéger l'espèce intermédiaire avant que celle-ci ne soit hydrolysée par l'eau. Les donneurs de glycosyle pour une telle transglycosylation sont des di- ou oligosaccharides, des aryles de glycoside ou des fluorures de glycoside (Figure 149).

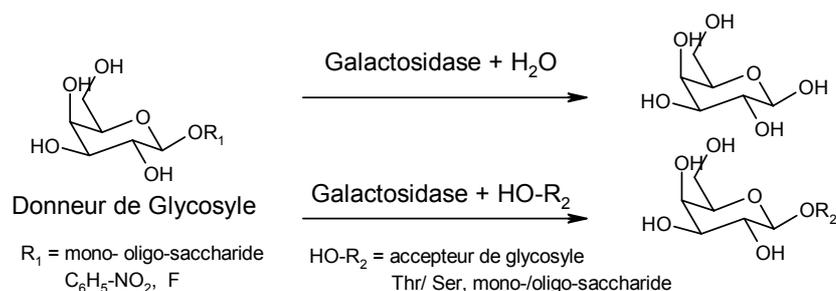


Figure 149: Synthèse d'une liaison O-glycosidique avec le galactose par une galactosidase (d'après Gilsen et al)

### Les glycosyltransférases

Les glycosyltransférases sont utilisées *in vivo* pour la biosynthèse des oligosaccharides. Il existe deux types de glycosyltransférases: les glycosyltransférases de type Leloir utilisent comme substrats donneurs de glycosyle des monosaccharides préalablement activés sous forme d'ester de nucléoside mono- ou di-phosphate, les autres utilisent des glycosyles phosphates.

Les glycosyltransférases de type Leloir sont responsables de la biosynthèse de la plupart des N- et O-glycoprotéines chez les mammifères. Du fait de leur haute sélectivité en terme de régio- et stéréo-chimie, leur utilisation en synthèse chimique est prometteuse. *In vivo*, la première étape de la glycosylation enzymatique commence par l'activation des monosaccharides sous forme de nucléosides mono-ou diphosphate (Figure 150) qui sont les substrats donneurs de glycosyle utilisés par les glycosyltransférases.

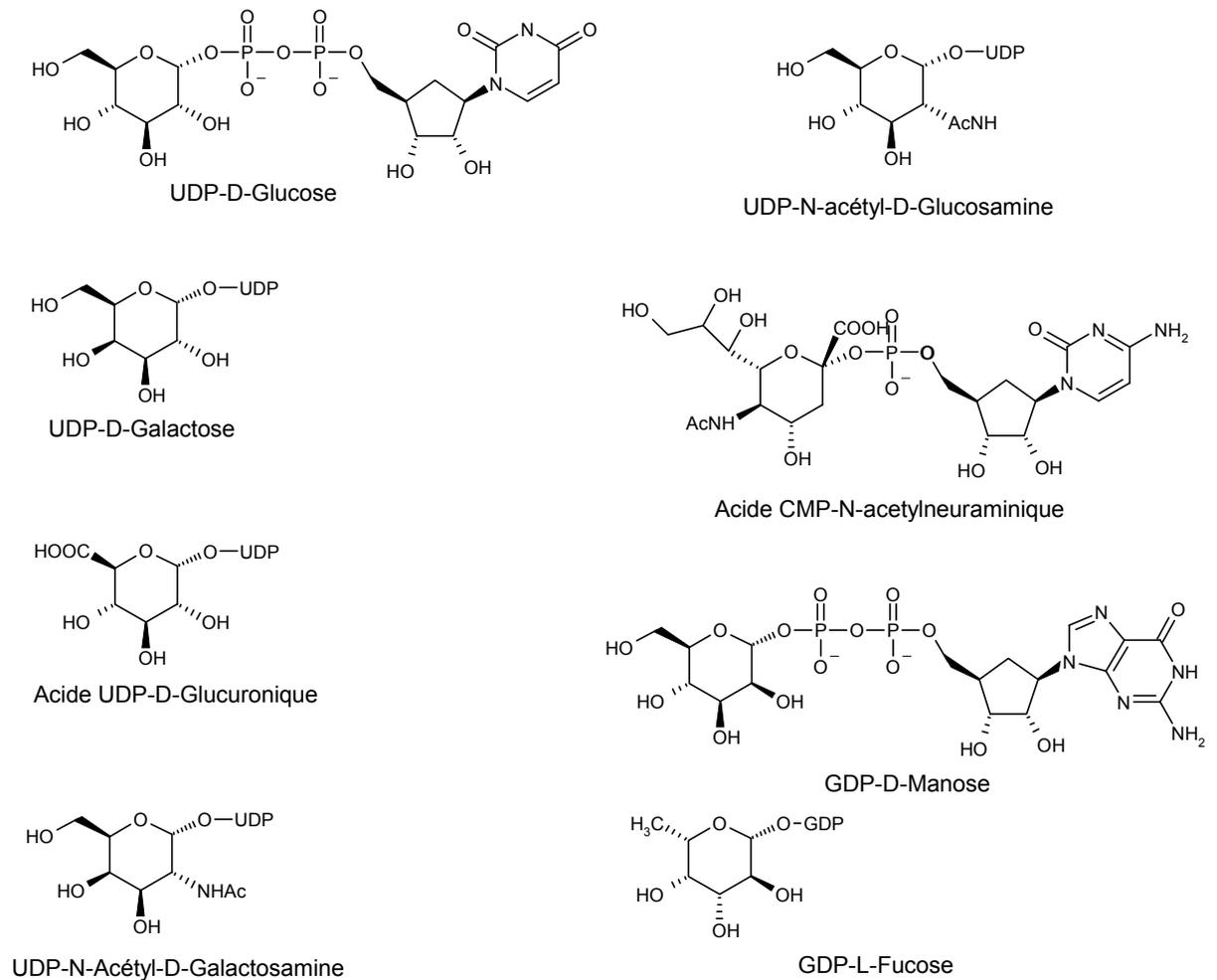


Figure 150: Donneurs de glycosyle utilisés pour la biosynthèse des oligosaccharides et glycoprotéines

Lors de la réaction de glycosylation, le glycosyle est transféré du substrat donneur au substrat accepteur avec libération du nucléoside phosphate (Figure 151). Les substrats précédemment décrits peuvent être utilisés par plusieurs enzymes. Les glycosyltransférases ont chacune leur spécificité vis à vis du substrat donneur, de la structure du substrat accepteur et de la position à glycosyler.



Figure 151: Réaction de O-glycosylation enzymatique

## V. 2. Exemples de glycosylation enzymatique

Récemment, la synthèse enzymatique *in vitro* de l'oligosaccharide sialyl-Lewis X sur un peptide correspondant à une portion de la séquence répétitive MUC1 a été réalisée en solution (Figure 152) (Gallego *et al.* 2003). Lors de cette synthèse, les monomères saccharidiques sont couplés les uns après les autres. A chaque étape, le peptide/glycopeptide est incubé avec la glycosyltransférase et le donneur de glycosyle adéquat dans un tampon dont le pH est ajusté en fonction de l'enzyme. Le glycopeptide est ensuite purifié avant d'être de nouveau glycosylé.

Un paramètre important est l'élimination des nucléosides mono- ou di-phosphate générés lors des réactions de glycosylation qui sont en fait des inhibiteurs de la réaction. Ceux-ci sont donc hydrolysés au fur et à mesure de leur production par la CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) ajoutée dans le milieu. On peut noter également l'utilisation d'une galactosidase à la place d'une  $\beta$ -1,3-galactosyltransférase non commerciale pour la fixation du deuxième monomère.

Cet exemple illustre parfaitement le potentiel qu'offre la glycosylation enzymatique. Cependant, dans la plupart des cas, il est difficile de glycosyler de façon homogène un peptide nu. La majorité des synthèses enzymatiques de glycopeptides consiste donc à réaliser par voie enzymatique l'élongation de la chaîne saccharidique d'un glycopeptide possédant déjà un résidu  $\alpha$ -GalNAc, ce glycopeptide pouvant être synthétisé sur support solide. Cette approche avait déjà été utilisée par Leppänen et ses collaborateurs (1999) pour la synthèse d'un glycopeptide correspondant à la « P-selectin-glycoprotein ligand-1 » (PSGL-1) et portant un groupement sialyl-LewisX. A partir du peptide glycosylé avec le résidu  $\alpha$ -GalNAc, la synthèse enzymatique du sialyl-Lewis X a été réalisée selon la même séquence que celle décrite dans l'exemple ci-dessus. La glycosylation enzymatique est particulièrement intéressante pour la synthèse de glycopeptides sialylés, difficile à préparer par voie chimique.

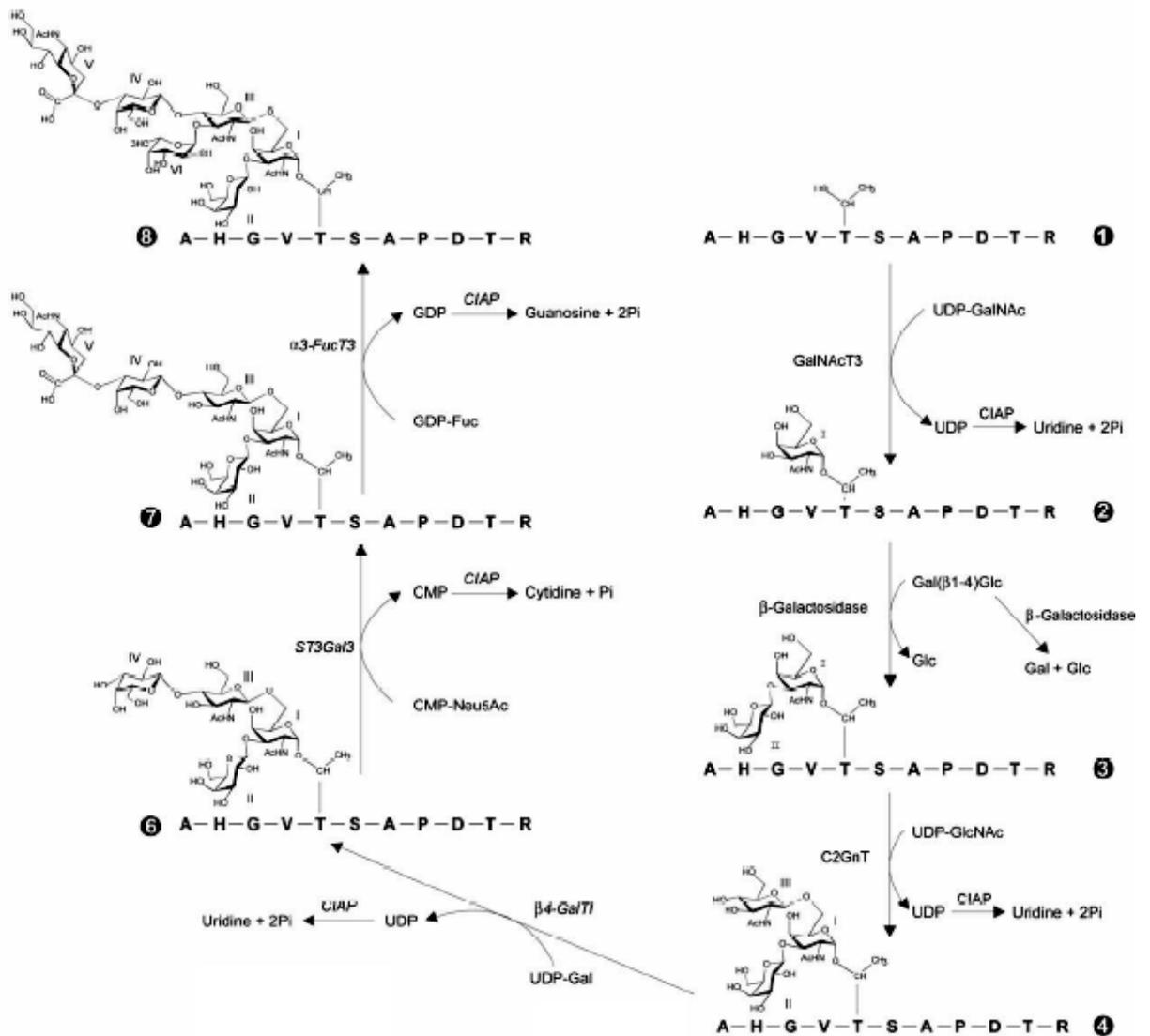


Figure 152: Synthèse d'un glycopeptide sialyl-Lewis X par glycosylation enzymatique (Gallego et al)

### V.3. Etude de la glycosylation

Pour la synthèse enzymatique de nos polymères linéaires glycopeptidiques, plusieurs possibilités sont envisageables. L'installation de l'unité saccharidique peut se faire soit directement sur le peptide encore fixé sur la résine hydrophile utilisée, et alors le décrochage chimique entre le peptide et la résine doit être compatible avec la présence d' $\alpha$ GalNAc sur la chaîne peptidique, soit la fixation de GalNAc par le biais l' $\alpha$ -GalNAc transférase T1 (E.C.2.4.1.41) peut se faire sur le peptide libéré de la résine, avant ou après l'oligomérisation via une liaison oxime.

Nous avons opté pour la deuxième solution et après oligomérisation afin de tester la contribution de la liaison oxime lors de la glycosylation enzymatique. Pour cela,

j'ai entrepris une étude préliminaire en collaboration avec Véronique et Friedrich Piller (équipe de biologie cellulaire et moléculaire de la glycosylation, CBM). Un axe de leur recherche concerne l'étude de la relation structure/fonction d'une enzyme de la famille des polypeptides alpha GalNAc transférases impliquées dans la première étape de la O-glycosylation de type mucine. Ils ont synthétisé un analogue de l'UDP-GalNAc permettant un transfert de ce sucre spécifiquement sur une thréonine et de réaliser ainsi une investigation du site actif de ce type d'enzymes (Bourgeaux *et al.* 2005 ; Bourgeaux *et al.* 2007) (Figure 153).

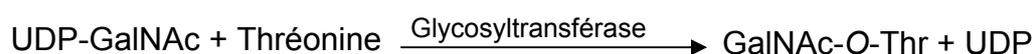


Figure 153: Transfert de GalNAc sur une thréonine par la T1

L'enzyme  $\alpha$ -GalNAc transférase T1 (E.C.2.4.1.41) d'origine bovine a été clonée et exprimée sous forme sécrétée hautement active dans un système d'expression eucaryote de cellules d'insectes en culture infectées par des baculovirus recombinants. Dans ce système d'expression performant, plusieurs milligrammes d'enzyme ont été produits, avec une activité spécifique de transfert d'une  $\mu$ mole de GalNAc par min et par mg de protéine, en prenant pour accepteur un peptide de synthèse de type MUC. L'enzyme est stable et il en faut 2  $\mu$ g pour glycosyler complètement en 24 h une  $\mu$ mole de peptide de synthèse (résultats non publiés).

Le protocole expérimental est le suivant (Figure 154):

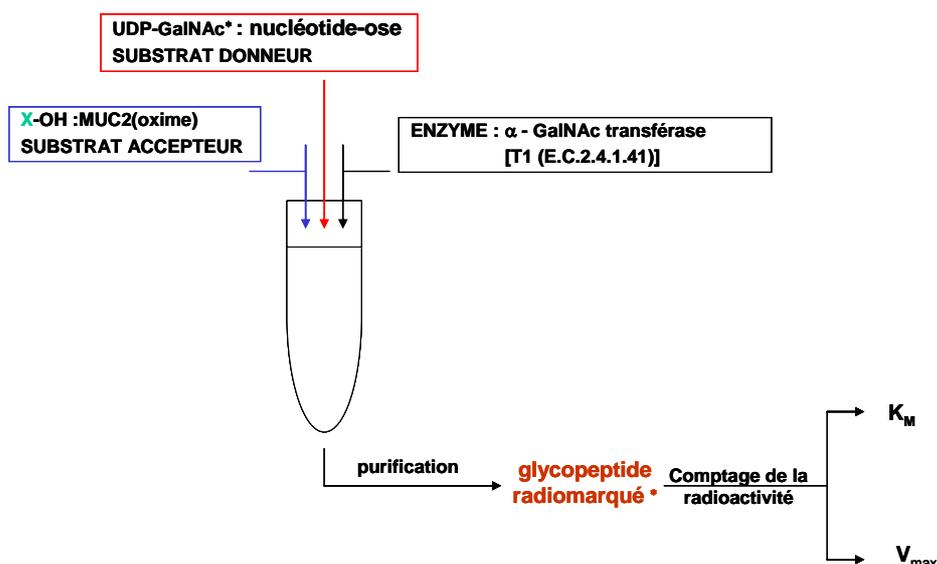


Figure 154: Principe de glycosylation enzymatique sur MUC2(oxime)

La caractérisation a été réalisée à l'aide de nucléotide-sucres radioactifs, présentant une faible activité spécifique (environ 1000 cpm / nmole de GalNAc), ce qui permet de déterminer avec précision le taux de substitution des thréonines et des sérines. Le degré d'hétérogénéité a été déterminé par HPLC analytique, et par spectrométrie de masse. Les différentes glycoformes peuvent être aisément séparées par chromatographie d'affinité sur colonnes de lectines immobilisées (Piller *et al.* 1986). La position exacte d'incorporation de GalNAc sur les thréonines et sérines potentiellement glycosylables de l'unité répétitive de MUC1 a été déterminée uniquement par microséquençage-d'Edman.

### V. 3. 1. Détermination du nombre de sucre incorporé sur les monomères

Dans un premier temps, une étude a été réalisée pour déterminer le nombre de sucre incorporé sur MUC1 en fonction de la substitution en C-terminal. Pour des soucis de clarté nous appellerons dans cette étude MUC1 en spécifiant sa partie C-terminale. Cinq sites potentiels de glycosylation apparaissent sur la séquence MUC1(COOH) (Figure 155).

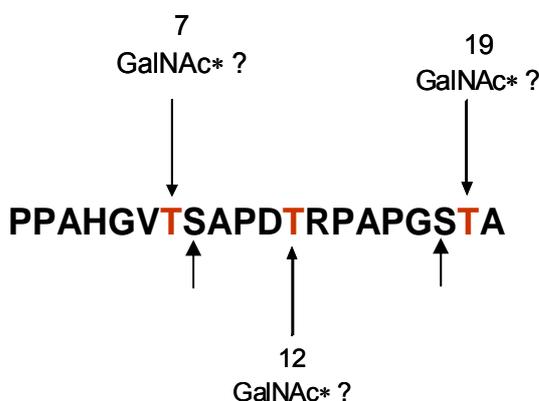


Figure 155: Sites potentiels de glycosylation sur la séquence MUC1(COOH)

L'analyse du produit glycosylé effectuée par spectrométrie de masse et par une dégradation d'Edman MUC1 a permis de localiser la glycosylation au niveau de la thréonine située en position 7 (Figure 156).



Figure 156: Localisation de la glycosylation sur la séquence MUC1(COOH)

La non glycosylation des thréonines 12 et 19 serait due à la présence d'un résidu adjacent chargé et serait en accord avec les résultats décrits dans la littérature. En effet la thréonine 12 est située au niveau du déterminant DTR et les deux résidus adjacents sont chargés. La thréonine 19 est à proximité de la charge du carboxylate de l'alanine adjacente. Pour vérifier l'hypothèse sur la thréonine 19, nous avons synthétisé MUC1 sur une résine Rink afin d'obtenir un peptide possédant une extrémité amide en C-terminal [MUC1(CONH<sub>2</sub>)]. Les analyses similaires à celles utilisées pour MUC1(COOH) mentionnent 75% de produit diglycosylés et 25% de produit monoglycosylé (Figure 157).



*Figure 157: Localisation de la glycosylation sur la séquence MUC1(CONH<sub>2</sub>)*

Au regard du résultat obtenu, on confirme l'importance d'une charge située à proximité du site de fixation de l'enzyme et qu'il y a une absence de glycosylation lorsque la Thréonine :

- est adjacente à un résidu chargé comme c'est le cas pour le déterminant DTR
- se situe à proximité de la partie C-terminale du peptide

Notre stratégie envisage notamment la glycosylation du fragment médian. Nous avons réalisé les mêmes expériences avec MUC1 possédant un acétal et noté MUC1[NH-CH<sub>2</sub>-CH(OMe)<sub>2</sub>]. Le résultat obtenu est similaire à MUC1(CONH<sub>2</sub>) avec 70% de produit diglycosylés et 30% de produit monoglycosylé.

### V. 3. 2. Influence d'une liaison oxime au niveau du squelette peptidique

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une étude avec des dimères composés de 2 séquences MUC1. Deux dimères ont été préparés et caractérisés: *MUC2(oxime)* où les 2 copies de l'unité répétitive de MUC1 sont reliées par une liaison oxime via un monomère aldéhyde et un aminoxy-monomère. Un autre dimère, *MUC2(cystéine)*, a été réalisé par oxydation de 2 unités répétitives de MUC1 possédant une cystéine en position N terminale et conduisant à un pont disulfure. Ces deux analogues ont été alors comparés au dimère naturel *MUC2(amide)* obtenue par synthèse récurrente sur support solide. Le transfert d'unités GalNac sur les thréonines du dimère natif *MUC2(amide)* et des dimères modifiés, *MUC2(oxime)* et *MUC2(cystéine)*, a été catalysé par l' $\alpha$ -GalNac transférase T1 (E.C.2.4.1.41)

Le transfert d'une N-acétyl D-galactosamine (GalNac) est mesuré par radioactivité. Les constantes michaeliennes, Km et Vmax montrent que les produits synthétisés malgré un Km nettement supérieur pour les dimères *MUC2(oxime)* et *MUC2(cystéine)* sont de bons substrats accepteurs (Figure 158).

COMPOSES	[C] en mg/ml	Km	V max en mmol/h
MUC1(COOH)	0,125	66 $\mu$ M	1,1
MUC2(amide)	0,125	66 $\mu$ M eq MUC1(COOH)	1,1
MUC2(cystéine)	1	528 $\mu$ M eq MUC1(COOH)	3
MUC2(oxime)	0,5	264 $\mu$ M eq MUC1(COOH)	3

Figure 158: Km et Vmax en fonction des concentrations

Si on compare le dimère natif MUC2(amide) au dimère MUC2(oxime) dans les mêmes conditions [ $C=0,5\text{mg/ml}$  ;  $K_m=250\ \mu\text{M}$  ;  $V_{\text{max}}=2\ \text{nmol/h}$ ], le résultat est très comparable et la liaison oxime permet toujours la glycosylation (Figure 159).

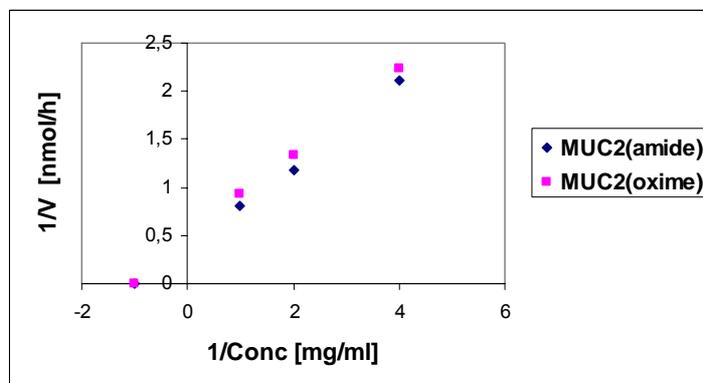


Figure 159: comparaison entre MUC2(amide) et MUC2(oxime)

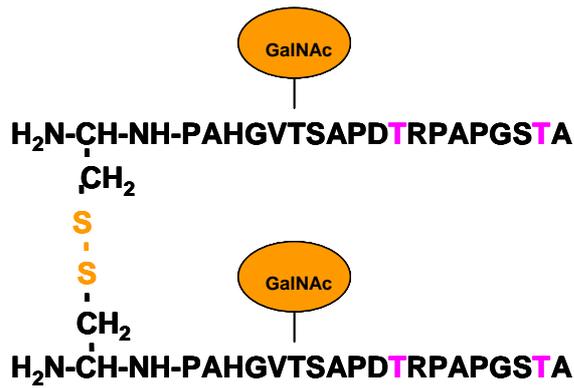
Les caractérisations par LC-MS et par dégradation d'Edman des trois dimères indiquent un nombre de glycosylation égal à trois pour le dimère naturel MUC2(amide) et de deux pour le dimère MUC2(cystéine). Pour le dimère MUC2(oxime), la proportion serait comprise entre deux et trois sites glycosylés (Figure 160).

D'après les résultats obtenus sur le monomère MUC1 et les hypothèses émises, le nombre de sucre incorporés sur chaque dimère, et en raison de la spécificité de la glycosylation enzymatique de la thréonine avec cette  $\alpha$ -GalNAc transférase, on suppose que les sucres se sont fixés sur les thréonines mentionnées Figure 160.



Glycosylation potentielle en position 7, 19 et 27 de MUC2(amide)

MUC2(amide) glycosylé	Pourcentage (%)
mono	4
di	18
tri	78



*Glycosylation potentielle en position 7 de chaque monomère de MUC2(cystéine)*

MUC2(cystéine) glycosylé	Pourcentage (%)
mono	2
di	98



*Glycosylation potentielle en position 7, 19 et 27 de MUC2(oxime)*

MUC2(oxime) glycosylé	Pourcentage (%)
mono	7
di	36
tri	57

*Figure 160: Représentation des différents dimères glycosylés*

Revenons sur le dimère MUC2(oxime). Une estimation du pourcentage de glycosylation par ES-MS en comparant la somme des intensités des pics des ions multichargés correspondant à chaque espèce nous indique une proportion de 40% du composé di-glycosylés et 60% de tri-glycosylés (Figure 161).

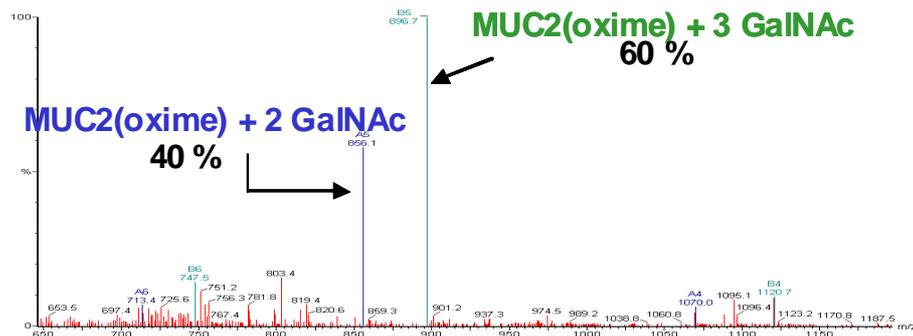


Figure 161: Spectre de masse du composé MUC2(oxime) glycosylé

Il est tentant de penser que la configuration *cis* ou *trans* de la liaison oxime qui perturbe partiellement l'accessibilité de la thréonine située à proximité. L'analyse par résonance magnétique nucléaire nous a permis de déterminer et de quantifier les deux configurations présentes à hauteur de 38 % pour la forme *cis* et de 62 % pour la forme *trans*. Par conséquent, au regard du pourcentage du dimère MUC2(oxime) di-glycosylé et tri-glycosylé, on peut penser que la forme *cis* serait di-glycosylée et que la forme *trans* serait tri-glycosylée. Ce résultat serait en accord avec les informations connues au sujet de l'affinité de cette enzyme T1 transférase pour les formes étendues (Vanderesse *et al.* 2003 : forme *trans* étendue et forme *cis* à structure  $\beta$  turn like).

### Conclusion de l'étude sur la glycosylation :

Les résultats obtenus confirment que la glycosyltransférase T1 ne glycosyle pas lorsque la thréonine est insérée entre deux résidus chargés négativement et lorsque qu'elle se trouve à proximité de la partie terminale chargée du peptide. De plus, un facteur topologique pourrait expliquer l'absence de glycosylation. La modification du squelette peptidique par une liaison oxime permet toujours mais dans une moindre proportion une glycosylation enzymatique.

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

L'objectif général de ce projet est l'obtention de candidats vaccins à base de glycopeptides ciblant les adénocarcinomes humains surexprimant des formes incomplètement glycosylées de la protéine transmembranaire MUC1 (cancer du sein, du poumon, du pancreas, de l'ovaire). Le choix du modèle MUC1 nous a semblé rationnel du fait de l'importance des données disponibles concernant l'influence du nombre et de l'emplacement des sites de glycosylation immunodominants, comparativement aux autres mucines. Nos structures-cibles, candidats vaccins, sont des structures chimériques composées de plusieurs sous-unités distinctes de MUC1 et d'un épitope T-auxiliaire.

Dans ce contexte, le travail présenté dans cette thèse a été la mise au point d'une méthode robuste de synthèse de longs peptides sur support solide. Nous avons obtenus des analogues linéaires de MUC1 par ligation chimique oxime comportant d'une part, deux unités et demi de répétition de la protéine MUC1 et d'autre part, de deux unités et demi de répétition de la protéine MUC1 associées à l'épitope T-auxiliaire universel PADRE liés par des liaisons oxime. L'étude préliminaire de la glycosylation enzymatique sur des peptides modèles nous permet d'envisager, *In fine*, des constructions contenant des épitopes saccharidiques T et/ou T<sub>n</sub> capables d'induire une réponse humorale contre MUC1 tumorale. Ces chimères seront alors comparées aux analogues branchées (thèse de G.A. Cremer au laboratoire) pour essayer de déterminer le rôle joué par l'orientation des épitopes, le nombre d'unités MUC<sub>a</sub> nécessaires ou la géométrie nécessaires à une construction qui soit la plus immunogène possible.

Le criblage d'anticorps anti-MUC1 produits naturellement par des patients atteints de cancer épithéliaux a mis en évidence l'immunodominance de la séquence APDTRPA, qui est cryptique à la surface des cellules normales. De plus, il a été montré que nombre d'anticorps générés chez la souris à partir de MUC1 extrait de tumeurs humaines reconnaissent mieux un petit peptide contenant cette séquence quand il était glycosylé sur la thréonine DTR que le peptide nu. Un fort consensus semble s'être établi récemment pour affirmer qu'une construction vaccinale efficace doit être glycosylée à cet emplacement. D'autre part, il semble que des glycanes additionnels

sont bénéfiques en terme d'intensité de la réponse immunitaire. Dans la mesure où il n'est pas possible de glycosyler la thréonine DTR par voie enzymatique avec la glycosyltransférase T1, la voie chimique sera envisagée.

Des saccharides plus complexes pourront être introduits dans les chimères. Les antigènes tumoraux étant souvent sialylés, l'introduction d'un tel groupement saccharidique dans une construction immunogène semble particulièrement séduisante. Si l'approche utilisant des thréonines glycosylées est limitée à des groupements saccharidiques simples, des groupements saccharidiques supplémentaires pourraient être greffés sur les premiers saccharidiques par voie enzymatique. Ainsi, la voie chimio-enzymatique pourrait être une voie prometteuse pour comprendre plus en détail le rôle de ces épitopes saccharidiques sur l'immunogénicité de nos chimères et la spécificité des anticorps produits. Ces résultats pourraient enrichir les connaissances sur la réponse immunitaire induites par les glycopeptides.

Le choix de la méthode de ligation est crucial pour l'obtention rapide et efficace des conjugués vaccinaux. Malgré une avancée remarquable dans la synthèse de glycoprotéines mimes de MUC1 assemblées par le biais de liaisons oxime ou native, plusieurs difficultés persistent notamment la grande réactivité des synthons partenaires aldéhyde et aminoxy (ligation oxime), thioester et 2-amino thiol (ligation native). La substitution de la liaison oxime par une liaison triazole (thèse d'Ibaï Valverde en cours au laboratoire), mime potentiel de la liaison amide et présentant les avantages d'être très stable dans une large gamme de pH et dépourvue d'isomères semble être une voie de recherche prometteuse pour l'obtention d'analogues de glycopeptides ou de petites protéines par multiligations sur support solide.

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

## **I. Méthodes générales**

### **I.1. Provenance des produits**

Les solvants (Ether diéthylique, NMP, MeOH, CH<sub>3</sub>CN, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) proviennent de chez Carlo Erba ou SDS. Le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, utilisé pour les réactions effectuées en milieu anhydre a été distillé sur CaCl<sub>2</sub> ou Mg. L'éther diéthylique utilisé pour la précipitation des peptides aminooxy est celui de meilleure qualité (> 99.5) de chez Acros. Le DMF et HATU proviennent d'Applied Biosystems. DIEA, TFA et la pipéridine sont de chez SDS. Ac<sub>2</sub>O et HOBt sont de chez Fluka. HBTU, les bras acide 4-hydroxyméthylphénoxy-acétique (HMPA) et méthylphénoxy-propionique (MPPA) et les différentes résines proviennent de chez Novabiochem. Le bras acide Boc-Ala-4-(oxyméthyl)-phenylacétique provient de chez NéoMPS. Les acides aminés protégés sont de chez Novabiochem ou Senn Chemicals. Le Boc-Aoa-OH a été préparé selon le mode opératoire décrit par Offord *et al.* (1997) à partir de l'Aoa qui provient de chez Acros. Les autres réactifs proviennent de chez Acros ou Aldrich. Les colonnes Sep-Pak® C18 proviennent de chez Waters. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

### **I. 2. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)**

Les analyses et les purifications CLHP ont été effectuées en phase inverse avec une chaîne Merck-Hitachi L7100 comprenant une pompe, un détecteur à barrette de diode L-7455 et une interface D-7000. L'analyse est effectuée avec une colonne C18 (nucléosil, 300 Å, 5 µm, 250 x 4,6 mm) et on injecte 50 µl d'une solution aqueuse contenant environ 1 mg/ml de peptide. Le débit d'élution est de 1 ml/mn. Pour la purification semi-préparative, on a recours à une colonne Lichrosorb 100 RP-18 (granulométrie de 7 µm ; 250 x 10,5 mm) avec une injection de 1,5 ml d'une solution aqueuse contenant environ 4 mg/ml de peptide. Le débit d'élution est de 3 ml/mn. Les peptides ont été élués avec un gradient linéaire de solvants A et B qui contiennent respectivement de l'eau avec 0,1% de TFA et de l'acétonitrile avec 0,1% de TFA.

### **I. 3. Spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse est une méthode de mesure de la masse moléculaire d'un composé par transformation des molécules des composés en ions gazeux. Deux méthodes d'ionisation, Electrospray (ESI-MS) et MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation), sont utilisées ; dans les deux cas, les ions formés sont triés en fonction de leur rapport masse sur charge  $m/z$  dans un analyseur.

#### I. 3. 1. Electrospray (ESI-MS)

Cette technique ne demande pas beaucoup de préparation. Il suffit d'injecter 20 $\mu$ l d'un pic HPLC récolté de concentration  $1 \cdot 10^{-5}$ M. La température à laquelle se fait la mesure est de 70°C. Le débit est de 10 $\mu$ l/min, ce qui nous permet de faire l'acquisition de 7 spectres en 1'30'' avec une valeur de cône de 35V. Les analyses de spectrométrie de masse par électro spray (ESI) ont été effectuées sur un triple quadripôle (Quatro II, Micro mass, Manchester, UK). La masse indiquée est la masse moyenne recalculée à partir des ions multichargés grâce au logiciel Masslynx.

#### I. 3. 2. MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation)

Cette technique nécessite contrairement à la technique de l'Electrospray une préparation d'échantillons. Elle s'étudie couramment en biochimie. Les spectres des peptides sont obtenus en mode réflectron avec une accélération de 20kV. Chaque spectre est enregistré après 60 tirs laser. La calibration externe est réalisée en utilisant l'Angiotensine II (1045.542 Da), la Substance P (1346,736 Da), la bombésine (1618.823 Da) et l'A.C.T.H. (fragment 18-39 2464.199 Da). La matrice utilisée est l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) à saturation dans l'acétonitrile et le TFA (0,1%) (50/50). 0,8  $\mu$ l de matrice et 0,8  $\mu$ l de notre peptide sont mélangés sur la cible. La cristallisation est effectuée à température ambiante puis l'analyse est réalisée sur un appareil Autoflex (Bruker) en mode positif. La masse indiquée est la masse monoisotopique.

### **I. 4. Dégradation d'Edman**

Le composé H-AHGVTSAPDTRPAGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 3'', a été soumis à la réaction de dégradation d'Edman. Cette réaction automatisable a été réalisée à l'aide d'un Applied Biosystems 492 Protein Sequencer« Procise ».

## **I. 5. Résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker 500 MHz AMX. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont donnés en partie par millions (ppm) par rapport à un à un témoin interne comme le tétraméthylsilane (TMS). Le déplacement chimique est donné par le rapport entre la fréquence séparant le proton du composé au tétraméthylsilane et la fréquence du spectromètre en mégahertz. Les constantes de couplage (J) sont données en Hertz (Hz).

## **I. 6. Procédure générale pour la synthèse peptidique en phase solide automatisée**

Les synthèses peptidiques en phase solide ont été réalisées avec un synthétiseur 433A (Applied Biosystems) par la méthode « Small Scale Fmoc Chemistry ». Cette dernière utilise la stratégie Fmoc/*t*Bu sur une échelle de 0,1 mmole avec 10 équivalents d'HBTU/HOBt comme agent de couplage, 10 équivalents de Fmoc-aminoacides et 12 équivalents de base. Chaque étape de couplage est suivie d'un traitement à l'anhydride acétique pour acyler les fonctions amines restantes. Les groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés varieront en fonction de la stratégie adoptée pour obtenir le peptide souhaité. Ils seront donc décrits pour chaque synthèse ultérieurement. Le suivi de l'élongation s'effectue par spectroscopie UV ( $\lambda = 301$  nm,  $\varepsilon = 7800$  mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>) de l'adduit fluorénylméthyl-piperidine formé lors de l'élimination du Fmoc du premier et dernier acide aminé. Un rendement d'élongation est alors calculé en partant de la quantité initiale d'amines disponible.

## **I. 7. Procédure générale pour les couplages manuels**

La résine est lavée successivement avec CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et le solvant de la réaction (DMF ou NMP). Les couplages manuels ont été effectués selon la méthode de neutralisation in situ décrite pour la stratégie Fmoc (Alewood *et al.* 1997). L'acide qui doit être activé (5 équivalents) et l'agent d'activation (5 équivalents) sont dissous dans le solvant approprié. La solution est transférée sur la résine (1 équivalent) placée dans une seringue équipée d'un fritté. Après 5 min d'agitation, 6 équivalents de DIEA sont

ajoutés. Après 2h d'agitation, les réactifs sont éliminés par filtration et la résine est rincée avec le solvant de la réaction.

### I. 8. Procédure générale pour l'aminolyse d'un peptide-résine par $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(OCH}_3)_2$

Le peptide-résine est mis en présence d'aminocétaldéhyde-diméthylacetal (1 ml) dans DMF (1 ml) et soumis à une agitation douce pendant 18 heures à 40°C. Le mélange réactionnel est filtré et le peptide est extrait avec  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2x), TFE (3x) et HFIP (3x). Les solvants sont ensuite évaporés et le produit analysé en HPLC et SM.

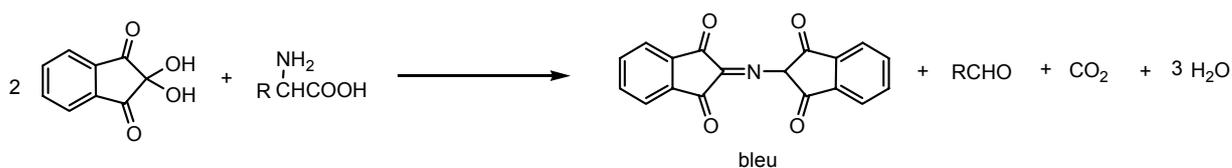
### I. 9. Contrôle de la réaction de couplage

#### I.9.1. Méthode qualitative

##### Test coloré de Kaiser : (Kaiser et al. 1970)

A quelques grains de résine sont ajoutés :

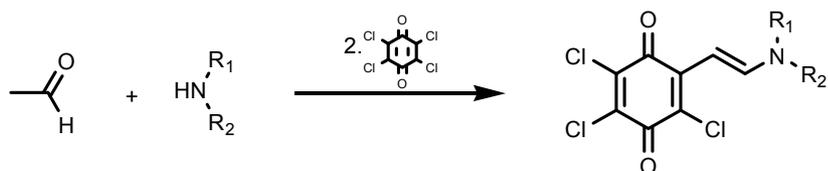
*i-* 40  $\mu\text{l}$  d'une solution de phénol liquide (80g) dans l'éthanol (20ml), *ii-* 40  $\mu\text{l}$  d'un mélange KCN [ $10^{-3}\text{M}$ ] dans  $\text{H}_2\text{O}$  / pyridine (2 : 98) et *iii-* 40  $\mu\text{l}$  d'une solution de ninhydrine (5g) dans l'éthanol (100ml). Ce mélange est porté à 100°C pendant 5 minutes. Le test est positif lorsque la couleur vire du jaune au bleu-violet (bleu de Ruhemann) indiquant une réaction entre la ninhydrine et une amine. Le couplage est quantitatif s'il n'y a pas de coloration bleue.



Formation du bleu de Ruhemann

##### Test coloré de Vojkovsky : (1995)

Ce test est caractéristique des amines secondaires. Sur quelques grains de peptide-résine on verse une goutte d'acétaldéhyde puis on ajoute une goutte de tétrachlorobenzoquinone (chloranil). Le mélange est laissé à température ambiante pendant 5 minutes. Ce test est positif lorsque la solution vire du jaune au bleu indiquant une réaction entre le chloranil et une enamine.



Mécanisme de la réaction des amines secondaires avec du chloranil/acétaldéhyde

### I.9.2. Méthode quantitative

Le groupement Fmoc d'un composé (10mg) est déprotégé en milieu basique (pipéridine à 30% dans la CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 3x3 min) par β-élimination. Le sous-produit de la réaction, le dibenzofulvène, réagit avec la pipéridine pour former le fluorénylméthyl-pipéridine dosable par spectrophotométrie UV à 301nm.

La concentration des peptides est déterminée par dosage UV selon la loi de Beer-Lambert:

$$DO = \epsilon \cdot l \cdot c.$$

DO = densité optique

$\epsilon$  = le coefficient d'absorption à une longueur d'onde donnée

l = la longueur du trajet optique

c = la concentration

Les coefficients d'absorption ont été calculés selon Wetlaufer (1962).

Nous avons utilisé  $\epsilon_{301} = 7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

## **I. 10. Préparation d'échantillon pour analyse par HPLC**

### Traitement au TFA.

Un aliquote de peptide-résine (10 mg) est soumis à un traitement par TFA/H<sub>2</sub>O/TIS 90/5/5 (v/v) pendant 30 minutes. Le filtrat est recueilli dans l'éther froid, lavé (x3) et le peptide est isolé par centrifugation (5000 tours/min pendant 5 min à 4°C). Le peptide est séché sous vide puis analysé par (RP-HPLC) et SM.

### Traitement à la soude.

Un aliquote de peptide-résine (10 mg) est traité par NaOH 0,1M/DMF 1:1 (1ml) pendant 20 minutes. On prélève 100 µl du surnageant puis on ajoute HCl 0,45N (100µl). Une dilution par deux de ce mélange avec H<sub>2</sub>O permet d'une part d'obtenir une

concentration de peptide à analyser de l'ordre de 1mg/ml et d'autre part de diminuer le signal d'absorption du DMF lors des injections HPLC. Dans certains cas une purification sur une colonne Sep-Pak-C18 avant injection HPLC a permis d'éliminer considérablement le DMF.

### I. 11. Procédure de purification sur colonne Sep-Pak-C18

La colonne Sep-Pak-C18 est préalablement conditionnée par un lavage avec CH<sub>3</sub>CN et H<sub>2</sub>O. Elle est ensuite abondamment lavée à l'eau avant élution du peptide avec un mélange H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (50/50).

## II. Mode opératoire des composés synthétisés

### II. 1. Synthèse des fragments N-terminaux 3 et 7

#### II. 1. 1. *H*-MUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CHO **3**

[Rappel : **MUC<sub>a</sub>** = PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA]



## Boc-Ala-PAM-PEGA 12

L'acide Boc-Ala-4-(oxyméthyl)phénylacétique (Boc-Ala-PAM-COOH) (5 eq, 168,7 mg ; 0,5 mmoles) et TBTU (5 eq, 189,7 mg, 0,5 mmol) sont dissouts dans 5 ml de DMF puis versés sur la résine aminométhyl-PEGA (250 mg de résine sèche ; substitution à 0,4 mmoles/g) contenue dans une seringue équipée d'un fritté. L'ensemble est agité pendant 5 minutes puis on additionne la DIEA (6 eq, 0,6 mmol, 104,5  $\mu$ l). Après 3 heures de réaction, le mélange est lavé par DMF (3x), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x) / MeOH (3x) / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x) puis un test de Kaiser est réalisé sur un aliquote. La résine 12 a ensuite été acétylée avec DMF/Ac<sub>2</sub>O/DIEA 2:2:1 (3 ml), 2 x 10 min, puis rincée avec CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x) / MeOH (3x) / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x).

## Aloc-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-PAM-PEGA 49

Elongation de la séquence :

Le **12** est traité avec TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50 :50 pendant 30 min puis neutralisé avec DIEA/NMP, 5 :95 (3 x 1 min). Le test de Kaiser positif indique que la déprotection du Boc a été réalisée. L'amino-résine ainsi obtenue a été introduite dans un réacteur pour synthèse en phase solide. L'élongation de la séquence MUC<sub>a</sub> a alors été conduite comme décrit dans la procédure générale avec les acides aminés suivants :

Fmoc-Pro-OH ; Fmoc-Ala-OH ; Fmoc-His(Trt)-OH ; Fmoc-Gly-OH ; Fmoc-Val-OH  
Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH ; Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH ; Fmoc-Asp(O*t*Bu)-OH ; Fmoc-Arg(Pbf)-OH

L'adduit fluorénylméthyl-pipéridine formé lors de l'élimination du Fmoc du deuxième acide aminé a été dosé par spectroscopie UV ( $\lambda = 301$  nm,  $\epsilon = 7800$  mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>) pour donner la quantité initiale d'amines disponibles (0,1 mmoles). A la fin de la synthèse automatisée, le Fmoc du dernier acide aminé éliminé par un traitement 20% de pipéridine dans la NMP (3x5min) est récupéré dans une fiole jaugée contenant du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. L'absorbance de l'adduit fluorénylméthyl-pipéridine est de nouveau mesurée à 301 nm correspondant à une valeur de 0,09 mmoles. Le rendement total d'élongation est donc de 90% en partant de la quantité initiale d'amines (peptide-résine de poids sec 430 mg ; 0,09 mmoles).

### Aloc-Pro-OH 48

H-Pro-OH (2g, 17 mmol) sont dissous dans une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (43 ml, 34 mmol) à 9 % et refroidit dans la glace à 0°C. Une solution à 0.85M d'AlocOSu (2.88g, 14.45 mmol) est dissoute dans 100 ml de DMF puis ajoutée en une seule fois à 0 °C sous agitation à la solution H-Pro-OH / Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 9 % (apparition d'un précipité). L'agitation se poursuit ensuite à température ambiante pendant 30 min. Le précipité est dilué dans l'eau puis on réalise une extraction à l'Ether (3x) et à l'AcOEt (3x). La phase aqueuse (pH= 8) est refroidie à 0°C puis on additionne de l'acide citrique monohydraté à 5 % pour ramener le pH à 2. Une extraction à l'AcOEt (3x) permet de récupérer le composé en phase organique. Cette dernière est lavée par une solution aqueuse de NaCl saturée, par H<sub>2</sub>O puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'évaporation au Büchi, suivie d'une purification en HPLC semi-préparative et lyophilisation permet d'obtenir le composé sous la forme d'une huile (0,84 g) avec un rendement de 42%.

ESI-MS [MH<sup>+</sup>]: 200.20 ± 0,11 calculée pour C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub>N [M]= 199,10

CCM : CHCl<sub>3</sub>/EtOH/AcOH 85:10:5, rf: 0.5).

HPLC analytique : Tr = 22.42 min (3-30 % B en 30 min)

RMN DMSO-d<sub>6</sub> : δ (ppm): 12,6 (s, 1H, COOH); 5,9 (m, 1H, H<sub>2</sub>C=CH-CH<sub>2</sub>); 5,2-5,3 (dd, 2H, J<sub>trans</sub>=15,2 Hz, <sup>2</sup>J=1,5 Hz, j<sub>cis</sub>=9,29 Hz ; H<sub>2</sub>C=CH-CH<sub>2</sub>-O); 4,5 (d, 2H, J=5,54 Hz, H<sub>2</sub>C=CH-CH<sub>2</sub>-O); 4,2 (dd, H, N-CH<sub>α</sub>-COOH); 3,4 (m, 2H, N-CH<sub>2δ</sub>-); 1,85 (m, 2H, N-CH<sub>2β</sub>-); 1,8 (m, 2H, N-CH<sub>2γ</sub>-).

Aloc-Pro-OH (89,6mg, 0,45 mmol, 5eq) est dissout dans 5 ml de DMF puis on ajoute HBTU (170,6mg, 0,45 mmol, 5eq). Ce mélange est transféré sur la résine et après 5 minutes d'agitation, la DIEA (94µl, 0,54mmol, 6eq) est additionnée et le couplage s'effectue pendant 2 heures. Le contenu est ensuite rincé au DMF (3x) et au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x) est on obtient le composé **49**. Un test de Vojkovsky s'est avéré être négatif et par conséquent, nous n'avons pas réalisé d'acétylation. Le rendement d'élongation calculé à partir de la quantité d'amines initiale est de 88% (440mg de résine sèche, 0,088 mmol).

### Aloc-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-OH 50

Un aliquote de **49** (10mg) est traité par TFA/H<sub>2</sub>O/Tis (95/2,5/2,5 en v/v) pendant deux heures. Une neutralisation avec une solution à 5% de DIEA dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x2min) suivi d'un lavage au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x) permet d'obtenir le peptide « nu » encore fixé

à la résine. Un traitement à la soude selon la procédure standard conduit au composé **50** qui est caractérisé par HPLC et SM.

MALDI-MS [ $MH^+$ ] = 1969,75 calculée pour  $C_{84}H_{131}O_{30}N_{25}$  [ $M$ ]=1970,95  
HPLC analytique (gradient : 10% à 41%B en 50') : Tr = 20'45

Aloc-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> **47**

Le peptide résine protégé **49** (400mg, 0,08mmol) est traité par 5ml d'une solution de TFA/H<sub>2</sub>O/Tis (95/2,5/2,5 en v/v) pendant deux heures. Une neutralisation avec une solution à 5% de DIEA dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x2min) suivi d'un lavage au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x) permet d'obtenir le peptide « nu » encore fixé à la résine **49**. L'aminolyse avec 2 ml d'acétylaldéhyde-diméthylacétal (supérieur à 100 éq) dans 2 ml de DMF à 40°C se déroule pendant 18 heures sous agitation mécanique lente. Le mélange réactionnel est filtré, la résine est lavée au DMF (3x5min) et de l'eau (3x5min). L'ensemble des filtrats a été rassemblé et évaporé sous vide. Le composé **47** (1mg) a été solubilisé dans 1 ml d'eau puis acidifié à pH 5 avec une solution d'acide acétique à 10% avant d'être analysé en HPLC et SM.

MALDI-MS [ $MH^+$ ]= 2058,24 calculée pour  $C_{88}H_{140}O_{31}N_{26}$  [ $M$ ]=2057,01  
HPLC analytique: Tr = 23'2 (10% à 41%B en 50')

La quantité de produit brut obtenue est de 140mg, ce qui correspond à un rendement de 85%.

H-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> **3'**

Le composé **47** (140mg, 0,07mmol, 1eq) a été dissout dans 20 ml de NMP puis on ajoute Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub> (24,7mg, 0,42 mmol, 6eq) et Pd[P(Ph)<sub>3</sub>]<sub>4</sub> (16,17mg, 0,014mmol, 0,2eq). La réaction se déroule sous argon et après 60 minutes de réaction, on additionne H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (26mg, 0,42mmol, 6eq) pendant 120 minutes. Le mélange réactionnel est filtré et le peptide est extrait avec CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2x), TFE (3x) et HFIP (3x). Les solvants sont ensuite évaporés, le produit analysé en HPLC et SM puis purifié en HPLC semi-préparative. On obtient 105 mg de produit sous forme d'une poudre blanche.

ESI-MS [ $MH^+$ ]= 1973,31 ± 0,41 calculée pour  $C_{84}H_{136}O_{29}N_{26}$  [ $M$ ]=1974,00  
HPLC analytique: Tr = 15'8 (10% à 41%B en 50')

### H-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CHO 3

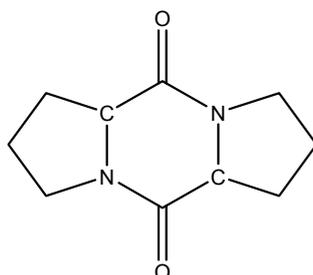
Le peptide **3'** est traité avec un mélange TFA/H<sub>2</sub>O (95/5) pendant 10 minutes. Après évaporation sous vide, un aliquote de **3** est repris dans l'eau puis analysé avant la réaction de ligation.

ESI-MS [MH<sup>+</sup>]: 1928.04 ± 0.32 calculée pour C<sub>82</sub>H<sub>130</sub>O<sub>28</sub>N<sub>26</sub> [M]= 1927.96  
HPLC analytique : Tr = 12'9 (10% à 41%B en 50')

**Le rendement global de la synthèse du fragment N-terminal 3 est de 68% à partir de la quantité initiale d'amines.**

#### II. 1. 1. 1. Composés synthétisés au cours de l'étude sur la formation de la DKP

##### Synthèse de la dicétopipérazine : c(Pro-Pro) 40



La résine commerciale Fmoc-L-Pro-Wang-résine (278 mg de résine sèche, 0,36 mmol/g) est traitée à la pipéridine à 20 % dans le DMF (3 X 3 min). Fmoc-Pro-OH (168,7 mg, 0,5 mmol) et HBTU (189,5 mg, 0,5 mmol) solubilisés dans DMF (3 ml) sont additionnés sur la résine. Après 5 min, on additionne de la DIEA (104,5 µl, 0,6 mmol). Le couplage s'effectue pendant 150 min puis la résine est lavée par DMF (3x) / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x) / MeOH (3x) / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x). Le peptide-résine est traité par la pipéridine dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20:80 (3 X 10 min). Après évaporation sous vide, le mélange est acidifié par une phase aqueuse contenant 0,1% of TFA puis une extraction au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x) permet d'obtenir c(Pro-Pro) **40** et l'adduit dibenzofulvène-pipéridine. Ces deux composés sont séparés par HPLC semi-préparative. La lyophilisation donne 3,9 mg de dicétopipérazine **40** sous la forme d'un composé blanc avec un rendement de synthèse non optimisé.

ESI-MS [MH<sup>+</sup>]: 194.25 ± 0.18 calculée pour C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub> [M] = 195,11

HPLC : Tr = 15'4 (0% à 40%B en 40')

RMN DMSO-d<sub>6</sub> : δ (ppm): 3,35 (dd, 2H, N-CH<sub>α</sub>-); 3,0 (m, 4H, N-CH<sub>2</sub>γ-); 1,65 (m, 4H, N-CH<sub>2</sub>β-); 1,55 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>δ-)

### Synthèse des séquences :

**Ac-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 41**  
**H-APAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 42**  
**H-GPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 43**  
**H-PAAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 44**  
**H-PGAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 45**  
**H-APPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 46**  
**AllocPPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 47**

### Procédure de synthèse sur phase solide :

La même procédure que pour l'obtention du peptide acétal **3'** a été suivie (voir paragraphe II. 1. Synthèse du fragment N-terminal). A partir de la résine PEGA sèche (175 mg, 0,07 mmol), l'élongation puis l'insertion manuelle des deux derniers acides aminés (les trois derniers acides aminés pour le **46**) selon la procédure générale conduit à un rendement de 85 % à partir de la quantité initiale d'amines (320 mg de poids sec, 0,06 mmol).

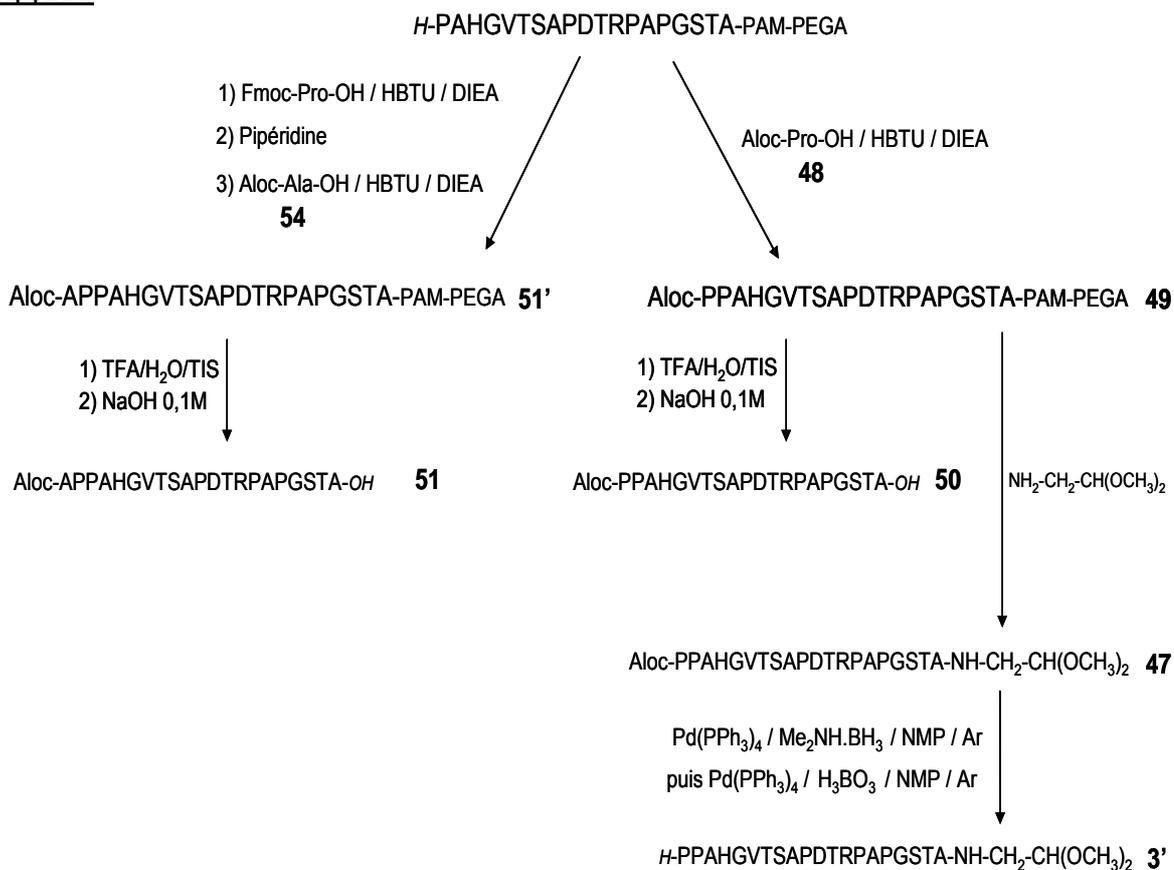
Le peptide **41** a été acétylé avec un mélange DMF/Ac<sub>2</sub>O/DIEA 2:2:1 (3 ml) pendant 20 min. La résine est lavée par DMF (3X) puis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3X) et un test qualitatif de Vojkovsky est réalisé.

La déprotection des chaînes latérales puis l'aminolyse ont été réalisées sur 40 mg de peptide-résine (0,0075 mmol) placé dans une seringue équipée d'un fritté. Les composés **41** à **47** sont obtenus sous forme d'huile avec un rendement de 60 à 80% en partant de la quantité initiale d'amines. Un volume adéquate d'eau distillée est ajoutée aux produits présents pour obtenir une concentration de 1 mg/ml environ. Le pH est ajusté à 7 avec du TFA pour dissoudre totalement chaque composé. La solution est direction injectée en HPLC analytique (gradient : 10 – 50% B en 30 min) et les produits sont caractérisés par ESI-SM (voir tableau ci-dessous).

Composé	Tr	Formule chimique	Masse moyenne	ESI-MS [MH] <sup>+</sup>
41	24'18	C <sub>86</sub> H <sub>138</sub> O <sub>30</sub> N <sub>26</sub>	2014'99	2015,79 ± 0,05
42	19'57	C <sub>82</sub> H <sub>134</sub> O <sub>29</sub> N <sub>26</sub>	1946'97	1947,13 ± 0,35
43	20'06	C <sub>81</sub> H <sub>132</sub> O <sub>29</sub> N <sub>26</sub>	1932'95	1933,47 ± 0,29
44	19'48	C <sub>82</sub> H <sub>134</sub> O <sub>29</sub> N <sub>26</sub>	1946'97	1947,31 ± 0,17
45	20'24	C <sub>81</sub> H <sub>132</sub> O <sub>29</sub> N <sub>26</sub>	1932'95	1933,34 ± 0,03
46	21'05	C <sub>87</sub> H <sub>141</sub> O <sub>30</sub> N <sub>27</sub>	2044'02	2045'32 ± 0,23
47	26'87	C <sub>88</sub> H <sub>145</sub> O <sub>31</sub> N <sub>27</sub>	2057'08	2058,02 ± 0,30

## II. 1. 1. 2. Composés synthétisés au cours de l'étude sur la déprotection du groupement Aloc

Rappel :



#### Aloc-Ala-OH 54

Le mode opératoire appliqué est le même que celui utilisé pour la synthèse de Aloc-Pro-OH.

H-Ala-OH (2g, 22 mmol) est dissout dans une solution aqueuse de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 9 % (52ml, 44 mmol) et refroidit dans la glace à 0°C. AlocOSu (0.85 M, 3.7g, 18.7 mmol) est dissout dans 100 ml de DMF puis ajouté en une seule fois à 0 °C sous agitation à la solution H-Ala-OH / Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (apparition d'un précipité). L'agitation se poursuit ensuite à température ambiante pendant 30 min. La solution réactionnelle est reprise dans l'eau puis extraite à l'éther (3 x) et à l'AcOEt (3 x). La phase aqueuse (pH= 8) est refroidie à 0°C puis ramenée à pH 2 avec de l'acide citrique monohydraté à 5 %. Une extraction à l'AcOEt (3 x) permet de récupérer le composé **54** en phase organique. Cette dernière est lavée par une solution aqueuse de NaCl saturée, par H<sub>2</sub>O puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'évaporation sous vide, suivie d'une purification en HPLC semi-préparative et lyophilisation permet d'obtenir le composé sous la forme d'une huile (1,42 g) avec un rendement de 71%.

CCM : CHCl<sub>3</sub> / EtOH / AcOH (85:10:5); rf: 0.5

HPLC analytique (gradient : 3-30 % B en 30 min) ; Tr = 15.65min

ESI-MS [MH<sup>+</sup>] = 174.11 ± 0,14 calculée pour C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub>N [M] = 173.09

RMN DMSO-d<sub>6</sub> : δ (ppm): 12,5 (s, 1H, COOH); 7,5(d, 1H, CO-NH-CH); 5,9 (m, 1H, H<sub>2</sub>C=CH-CH<sub>2</sub>); 5,15-5,3 (dd, 2H, J<sub>trans</sub>=17,25 Hz, 2J=1,53 Hz, j<sub>cis</sub>=10,46 Hz, H<sub>2</sub>C=CH-CH<sub>2</sub>-O); 4,5 (d, 2H, J=5,33 Hz, H<sub>2</sub>C=CH-CH<sub>2</sub>-O); 4 (m, 1H, N-CH<sub>α</sub>-COOH); 1,25 (d, 3H, N-CH<sub>α</sub>(CH<sub>3</sub>)-COOH ).

#### Aloc-APPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-PAM-PEGA 51'

Le composé **51'** est obtenu selon la procédure de synthèse sur support solide énoncée précédemment. Les deux derniers acides aminés sont couplés manuellement selon la procédure décrite précédemment avec un rendement de 80% (50mg, 0,0065 mmol).

#### Aloc-APPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-OH 51

Les chaînes latérales de **51'** sont déprotégées par un traitement au TFA/H<sub>2</sub>O/Tis (95/2,5/2,5 en v/v) pendant deux heures. Une neutralisation avec une solution à 5% de DIEA dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x2min) suivi d'un lavage au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x) permet d'obtenir le peptide « nu » encore fixé à la résine. 10 mg sont utilisés pour un clivage à la soude

selon la procédure standard et on obtient alors le composé **51** qui caractérisé par HPLC et SM.

MALDI-MS [MH<sup>+</sup>] = 2040,66 calculée pour C<sub>87</sub>H<sub>136</sub>O<sub>31</sub>N<sub>26</sub> [M] = 2041,99  
HPLC analytique (gradient : 10% à 41%B en 50') : Tr = 22'13

### Aloc-PGR(Pbf)A-Wang-PS 53

Fmoc-Ala-Wang-PS (250 mg de résine sèche ; substitution : 0,4 mmoles/g) est traitée par une solution de pipéridine à 20% dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,5 ml), 3 x 5 min. La synthèse sur phase solide a été ensuite réalisée en stratégie Fmoc/tBu selon la procédure générale. Le composé **48** est couplé manuellement puis la résine est lavée avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x), MeOH (3x), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x) et séchée sous vide. Le rendement total d'élongation est de 94% en partant de la quantité initiale d'amines (peptide-résine de poids sec 275 mg ; 0,094 mmoles).

Les acides aminés utilisés pour ces séquences sont décrits ci-dessous :

Fmoc-Gly-OH ; Fmoc-Arg(Pbf)-OH et Aloc-Pro-OH **48**.

Le peptide de référence est Aloc-PGRA-OH obtenu par traitement de 10mg (0,0034mmol) de **53** par TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2,5/2,5 en v/v) pendant deux heures. Cela permet la déprotection de la chaîne latérale et la coupure du peptide de la résine. Le peptide est précipité, lavé dans l'éther froid, centrifugé (2x5min à 5000 tr/min) puis séché. On obtient environ 1mg de produit brut (rendement de l'ordre de 75%) qui est dissout dans 1ml d'H<sub>2</sub>O avant d'être analysé en HPLC et SM.

HPLC analytique (gradient : 3-30 % B en 30 min) ; Tr = 21'5 min  
ESI-MS [MH<sup>+</sup>] = 484.36 ± 0,03 calculée pour C<sub>20</sub>H<sub>33</sub>O<sub>7</sub>N<sub>7</sub> [M] = 483,52

Après les différents modes opératoires utilisés pour éliminer l'Aloc de la Proline, 10 mg (0,0034mmol) de peptide-résine sont soumis à un traitement TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2,5/2,5 en v/v) pendant deux heures. Le peptide est précipité, lavé dans l'éther froid, centrifugé (2x5min à 5000 tr/min) puis séché. On obtient environ 1mg de produit brut (rendement de l'ordre de 75%) qui est dissout dans 1ml d'H<sub>2</sub>O avant d'être analysé en HPLC et SM.

HPLC analytique (gradient : 3-30 % B en 30 min) ; Tr = 7.5 min  
ESI-MS [MH<sup>+</sup>] = 400.11 ± 0,07 calculée pour C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>O<sub>5</sub>N<sub>7</sub> [M] = 399,45

Remarque : le composé All-PGRA-OH a les caractéristiques suivantes :

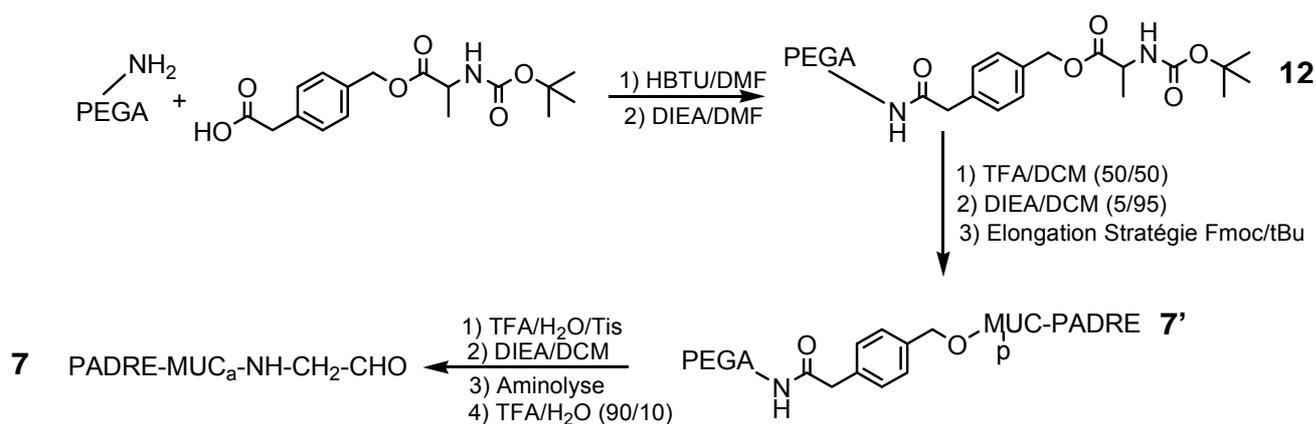
HPLC analytique (gradient : 3-30 % B en 30 min) ; Tr = 10.5 min

ESI-MS  $[MH^+] = 440.40 \pm 0,05$  calculée pour  $C_{19}H_{33}O_5N_7$   $[M] = 439,51$

## II. 1. 2. Synthèse du fragment PADREMUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CHO **7**

avec PADRE = aKXVAAWTLKAa a=Fmoc-D-Ala-OH et X=Cha

MUC<sub>a</sub> = PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA



### PADRE-MUC<sub>a</sub>-PAM-PEGA **7'**

L'obtention du composé **12** et la déprotection du Boc ont déjà été détaillées page 162.

L'élongation est réalisée selon la procédure générale à partir de 250mg de résine PEGA sèche (substitution : 0,4 mmol/g) et conduit au composé **7'** avec les acides aminés protégés suivants :

Fmoc-Pro-OH ; Fmoc-Ala-OH ; Fmoc-His(Trt)-OH ; Fmoc-Gly-OH ; Fmoc-Val-OH  
 Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH ; Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH ; Fmoc-Asp(O*t*Bu)-OH ; Fmoc-Arg(Pbf)-OH

Fmoc-D-Ala-OH ; Fmoc-Lys(Boc)-OH ; X = Fmoc-β-(Cha)Ala-OH ; Fmoc-Val-OH  
 Fmoc-Ala-OH ; Fmoc-Trp(Boc)-Thr(Ψ<sup>Me, Me</sup>, Pro)-OH ; Fmoc-Leu-OH

L'adduit fluorénylméthyl-piperidine formé lors de l'élimination du Fmoc du deuxième acide aminé a été dosé par spectroscopie UV ( $\lambda = 301$  nm,  $\epsilon = 7800$  mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>) pour donner la quantité initiale d'amines disponibles (0,1 mmoles). Le dipeptide Fmoc-Trp(Boc)-Thr(Ψ<sup>Me, Me</sup> Pro)-OH a été introduit lors de l'élongation à la place des deux résidus W<sup>7</sup>T<sup>8</sup>. L'absorbance de l'adduit fluorénylméthyl-pipéridine libéré lors de la déprotection du Fmoc du dernier acide aminé par le traitement pipéridine a été mesurée

à 301 nm ( $\epsilon = 7800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ) et correspond à 0,076 mmoles. Le rendement d'élongation de **7'** est donc de 76% à partir de la quantité initiale d'amines (580mg de peptide-résine sèche). Un traitement au TFA/H<sub>2</sub>O/TIS, [95/2,5/2,5 (3 ml)] pendant 2 heures puis une neutralisation avec une solution à 5% de DIEA dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x2min) suivi d'un lavage au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x) permet d'obtenir le peptide « nu » **7'** toujours fixé à la résine.

#### PADRE-MUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CHO **7**

Le peptide-résine **7'** a été lavé avec du DMF (3x) puis 3 ml d'acétylaldéhyde-diméthylacétal et 1,5 ml de DMF ont alors été ajoutés au peptide-résine. Le milieu a été maintenu à 40°C pendant 18h sous agitation lente puis filtré. La résine a été rincée avec du DMF (3x) et H<sub>2</sub>O (3x) et le peptide a été extrait avec TFE (3x5 min) et HFIP (3x 5 min). L'ensemble des filtrats a été rassemblé et évaporé sous vide. Le peptide-aldéhyde masqué (160mg) est solubilisé dans 20 ml d'eau acidifiée à pH=5 avec de l'acide acétique à 10% avant d'être analysé en HPLC et SM.

Rdt=65%

MALDI-MS [MH<sup>+</sup>]= 3236,52 calculée pour C<sub>146</sub>H<sub>237</sub>O<sub>42</sub>N<sub>41</sub> [M]= 3237,77

HPLC analytique: Tr = 35'1 (10% à 41%B en 50')

Après purification par HPLC semi-préparative, un traitement acide ultérieur au TFA libère la fonction aldéhyde de sa protection diméthylacétal avec un rendement quantitatif. On obtient le peptide **7** purifié, caractérisé en HPLC et spectrométrie de masse.

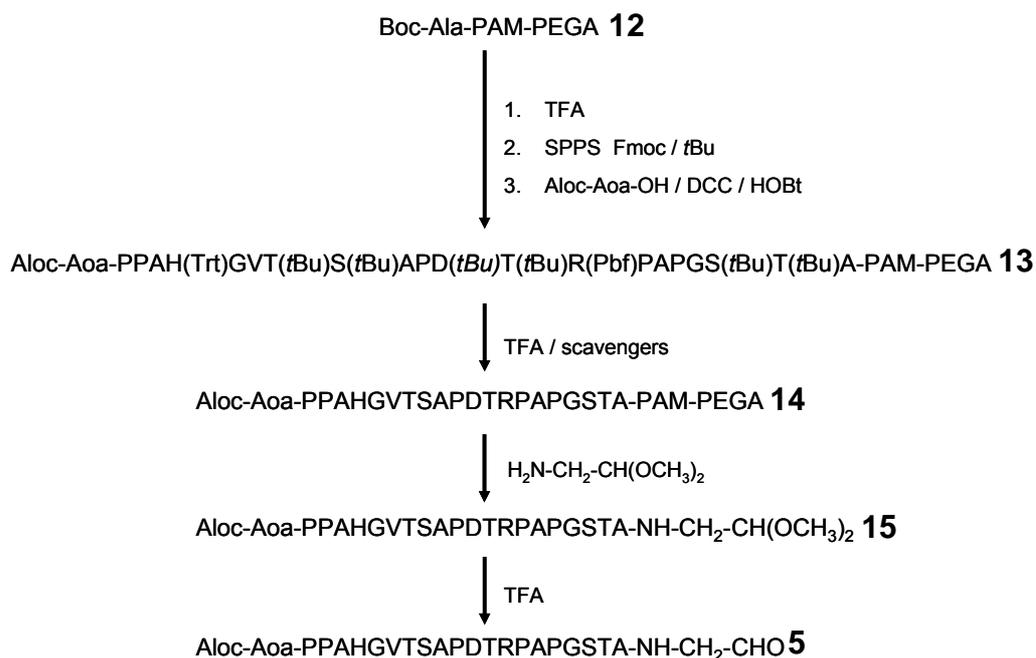
MALDI-MS [MH<sup>+</sup>] = 3191,85 calculée pour C<sub>144</sub>H<sub>231</sub>O<sub>41</sub>N<sub>41</sub> [M] = 3191,73

HPLC analytique : Tr = 32'24 (gradient : 10 - 41% B en 50 min)

**Le rendement global de la synthèse du fragment N-terminal **7** est de 50 % à partir de la quantité initiale d'amines.**

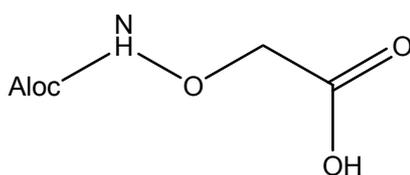
## II. 2. Synthèse du fragment médian Aloc-Aoa-MUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CHO 5

[Rappel : MUC<sub>a</sub> = PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA]



Le fragment médian **5** est obtenu selon la même procédure que pour l'obtention du composé **3** page 165 à partir d'une résine PEGA sèche (250mg, 0,1 mmol). L'élongation est réalisée sur support solide selon la procédure générale. L'absorbance de l'adduit fluorénylméthyl-pipéridine libéré lors de la déprotection du Fmoc du deuxième et dernier acide aminé par le traitement pipéridine a été mesurée à 301 nm ( $\epsilon = 7800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ) et permet d'obtenir un rendement d'élongation de 80% en partant de la quantité initiale d'amines (peptide-résine de poids sec 420 mg ; 0,08 mmoles).

### Aloc-Aoa-OH 16



Aloc-Aoa-OH

Aoa-OH (2g,  $18,3 \cdot 10^{-3}$  mol) est dissout dans une solution contenant 2 eq de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 9 % et refroidit dans la glace. 0,85 eq d'une solution d'AlocOSu ( $15,5 \cdot 10^{-3}$  mol soit 3,09 g) est dissoute dans 100 ml de DMF puis ajoutée en une seule fois à 0 °C sous agitation à la solution Aoa / Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 9 % (apparition d'un précipité). L'agitation se poursuit ensuite à température ambiante pendant 30 min.

Le suivi de la réaction se fait par CCM : il faut absolument avoir des groupes chromophores qui absorbe à 254 nm pour visualiser les tâches CCM en UV. Pour nos produits ce n'est pas le cas mais ils vont quand même migrer sur la plaque et une révélation à l'iode permettra de suivre la réaction.

L'Aloc-Aoa-OH et Aoa-OH sont dissous dans un volume  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / MeOH (1/1)

Le précipité est dilué dans l'eau puis on réalise une extraction à l'Ether (3 fois) et à l'AcOEt (3 fois). La phase aqueuse (pH= 8) est refroidie à 0°C puis on additionne de l'acide citrique monohydraté à 5 % pour ramener le pH à 2. A ce pH, l'acide aminé modifié n'est pas soluble et il se forme une huile. Une extraction à l'AcOEt (3 fois) permet de récupérer le composé en phase organique. Cette dernière est lavée par une solution aqueuse de NaCl saturée, par  $\text{H}_2\text{O}$  puis séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . L'évaporation au Büchi, suivie d'une purification en HPLC semi-préparative et lyophilisation permet d'obtenir une huile avec un rendement global de synthèse de 55% (1,1 g).

Solvants de CCM :  $\text{CHCl}_3$ / EtOH / AcOH (85 / 10 / 5)

HPLC analytique : 3-30 % B en 30 min ; Tr = 13'20

ESI-MS  $[\text{MH}^+] = 176,03 \pm 0,03$  calculée pour  $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_5\text{N}$  [M] = 175

RMN dans DMSO- $d_6$  :  $\delta$  (ppm): 12,85 (s, 1H, COOH); 10,55 (s, 1H, CO-NH-O); 5,9 (m, 1H,  $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2$ ); 5,2-5,3 (dd, 2H,  $J_{\text{trans}}=17,22$  Hz,  $^2J=1,5$  Hz,  $j_{\text{cis}}=10,49$  Hz ;  $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}$ ); 4,55 (d, 2H,  $J=5,35$  Hz,  $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}$ ); 4,3 (s, 2H, O- $\text{CH}_2$ -COOH).

Aloc-Aoa-OH (56mg, 0,32 mmol, 4eq) est préalablement activé avec un mélange de DCC (66mg, 0,32 mmol, 4eq) et HOBt (49mg, 0,32 mmol, 4eq) dans 10 ml de DMF pendant 5 minutes. Ce mélange est transféré sur la résine *H*-MUC<sub>a</sub>-PAM-PEGA et le couplage s'effectue sous une agitation mécanique pendant 2 heures. Le contenu est ensuite rincé au DMF (3x) et au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x) est on obtient le composé **13** (peptide-résine de poids sec 330 mg ; 0,077 mmoles) avec un rendement de 77%. Un test de Vojkovsky s'est avéré être négatif et par conséquent, nous n'avons pas réalisé d'acétylation.

#### Aloc-Aoa-MUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CHO 5

Après déprotection des chaînes latérales du peptide **13**, l'aminolyse est réalisée selon la procédure décrite page 159. L'ensemble des filtrats sont rassemblés et évaporés sous vide. Le peptide **15** protégé aux extrémités N et C terminales est ensuite

solubilisé dans 25 ml d'eau pour être directement purifié par HPLC semi-préparative puis lyophilisé (113 mg de produit obtenu sous la forme d'une poudre blanche).

Rdt = 69%

MALDI-MS = 2131,09 calculée pour  $C_{90}H_{143}O_{33}N_{27}$  [M]= 2130,03

HPLC analytique : Tr = 24'04 (10% à 41%B en 50')

Un aliquote de **15** est traité avec un mélange TFA/H<sub>2</sub>O (95/5) pendant 20 minutes. La fonction aldéhyde « masquée » est alors éliminée et on obtient le peptide **5** sous la forme d'une huile jaune. Pour des raisons de réactivité, le composé **5** sera stocké au congélateur sous la forme **15**. L'acétal sera libéré juste avant les réactions de ligation.

Rdt = 100%

MALDI-MS = 2085,63 calculée pour  $C_{88}H_{137}O_{32}N_{27}$  [M]=2083,99

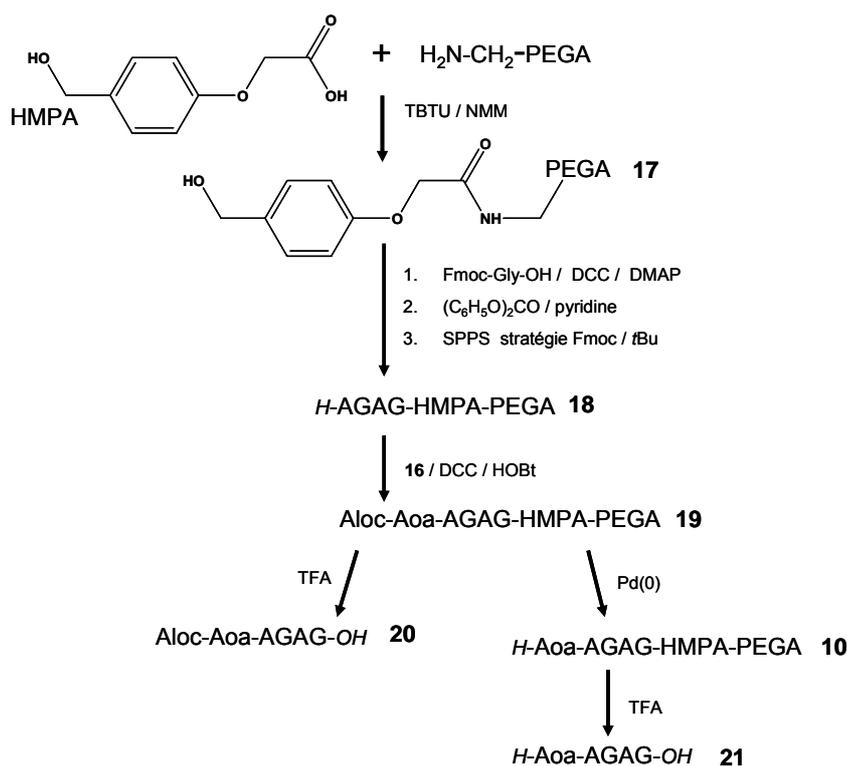
HPLC analytique : Tr = 21'11 (10% à 41%B en 50')

**Le rendement global de la synthèse du fragment médian 5 est de 54 % à partir de la quantité initiale d'amines.**

## II. 3. Synthèse du fragment C-terminal

### II.3.1. Etudes préliminaires :

#### Synthèse de *H*-Aoa-AGAG-HMPA-PEGA **10**



### HMPA-PEGA 17

La résine PEGA (244 mg de résine sèche, à 0,41 mmol/g, 1 équivalent) est lavée par de la DIEA à 5% dans le DMF puis avec DMF(3x). HMPA (55mg, 0,3mmol, 3eq) et TBTU (96,5mg ,0,3mmol, 3eq) sont dissous à 0°C dans 6 ml de DMF contenant de la NMM (46,3µl, 0,6mmol, 6eq) pendant 10 minutes. Après 10 minutes, cette solution est transférée à la résine PEGA dans une seringue munie d'un fritté, et l'agitation est maintenue pendant 2 heures. La résine **17** est lavée au DMF (3x) et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x) puis un traitement au TFA/H<sub>2</sub>O (95/5) est appliqué pendant 1 heure. La résine HMPA-PEGA **17** est alors lavée à la DIEA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5/95) pendant 2 minutes (3x), au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> puis séchée sous vide.

### Aloc-Aoa-AGAG-HMPA-PEGA 19

Fmoc-Gly-OH (119mg, 0,4 mmol, 4eq) est dissout dans 3 ml de DMF anhydre à 0°C en présence de DCC (41,3mg, 0,2 mmol, 2eq). La solution est agitée pendant 30 minutes. On observe l'apparition du précipité de dicyclohexylurée (DCU) qui est filtrée puis la solution obtenue est ajoutée directement sur la résine **17** (260mg, 0,1 mmol). 4-diméthylaminopyridine (5mg, 0,04mmol, 0,4 eq) dissoute dans 1 ml de DMF anhydre est ajoutée à la résine qui est agitée par retournement pendant 4 heures. Après filtration et lavage de la résine avec DMF (3x), de l'anhydride acétique (57µl, 0,6 mmol, 6eq) et DMAP (1,2 mg, 0,01mmol, 0.1eq) sont addtionnés avec 2 ml de DMF. Après 1 heure d'agitation, l'amino-résine Fmoc-Gly-HMPA-PEGA est au rincée au DMF (3x) au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x) puis traitée avec un mélange pipéridine/NMP (20/80 :3x5min). La résine est lavée avec NMP (3x) et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x). L'adduit fluorénylméthyl-piperidine a été dosé par spectroscopie UV ( $\lambda = 301 \text{ nm}$ ,  $\varepsilon = 7800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ) et permet d'estimer le rendement de couplage à 85% à partir de la quantité initiale d'amines disponibles (0,085mmol, 280mg).

L'élongation de la séquence *H*-Ala-Gly-Ala-OH sur *H*-Gly-HMPA-PEGA est réalisée à l'aide du synthétiseur selon la procédure classique pour obtenir **18**. Le rendement de couplage de 96% est évalué sur un aliquote par le dosage du Fmoc libéré du dernier acide aminé de la séquence (300 mg de résine sèche, 0,081 mmol).

Le peptide-résine **18** est dissout dans le DMF et introduit dans une seringue équipée d'un fritté. Aloc-Aoa-OH (59,5mg, 0,34 mmol, 4eq) est solubilisé dans 10 ml de

DMF ainsi que DCC (70,1mg, 0,34 mmol, 4eq) et HOBt (52,1mg, 0,34 mmol, 4eq). Après 5 minutes, cette solution est transférée sur **18** et agitée pendant 2 heures. La résine ensuite rincée au DMF(3x) et au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x). On obtient le composé **19** et un test de Kaiser négatif permet d'envisager un rendement quantitatif (peptide-résine de poids sec 315 mg ; 0,081 mmoles).

Une coupure d'un aliquote de peptide-résine **19** avec une solution de TFA/H<sub>2</sub>O (90/10) selon la procédure générale conduit au composé **20**.

HPLC analytique : 3-30 % B en 30 min ; Tr = 15'70

ESI-MS [MH<sup>+</sup>] = 432,25 ± 0,13 calculée pour C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>O<sub>9</sub>N<sub>5</sub> [M] = 431,40

Remarque :

Caractéristiques de Aloc-Aoa(Aloc-Aoa)-AGAG-OH lors d'un couplage de **16** avec HBTU (5eq)/DIEA (10eq) sur H-AGAG-HMPA-PEGA.

HPLC analytique : 3-30 % B en 30 min ; Tr = 28'00

ESI-MS [MH<sup>+</sup>] = 589,32 ± 0,10 calculée pour C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>13</sub>N<sub>6</sub> [M] = 588,52

Caractéristiques de Aloc-Aoa(Aloc-Aoa)-OBt après activation de **16** par HBTU (5eq)/DIEA (10eq):

HPLC analytique : 3-48 % B en 50 min ; Tr = 34'85

ESI-MS [MH<sup>+</sup>] = 450,14 ± 0,05 calculée pour C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub>N<sub>5</sub> [M] = 449,37

#### H-Aoa-AGAG-HMPA-PEGA 10

**19** est solvato dans la NMP sous argon. On additionne Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub> (14,5mg, 0,243mmol, 3eq) puis Pd[P(Ph)<sub>3</sub>]<sub>4</sub> (19mg, 0,02mmol, 0,2eq). Après 10 minutes d'agitation, la résine est lavée avec NMP (3x), NMP contenant 0,5 % de diéthylthiocarbamate de sodium hydraté (3x), NMP (3x) et du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x). La déprotection d'un aliquote par du TFA selon la procédure générale permet d'obtenir le composé **21**.

HPLC analytique : 3-30 % B en 30 min ; Tr = 4'87

ESI-MS [MH<sup>+</sup>] = 348,28 ± 0,13 calculée pour C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>O<sub>7</sub>N<sub>5</sub> [M] = 347,32

Remarque :

Caractéristiques de produits répertoriés lors de l'obtention de **21**

HPLC analytique : 3-30 % B en 30 min

Composé	Tr	Formule chimique	Masse moyenne	ESI-MS [MH] <sup>+</sup>
HO-CH <sub>2</sub> -AGAG-OH	5'37	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub> N <sub>4</sub>	332,31	333,32 ± 0,10
CH <sub>2</sub> =N-O-AGAG-OH	9'35	C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> O <sub>7</sub> N <sub>5</sub>	359,33	360,30 ± 0,06
CH <sub>3</sub> -CH=N-O-AGAG-OH	12'62	C <sub>14</sub> H <sub>23</sub> O <sub>7</sub> N <sub>5</sub>	373,36	374,27 ± 0,03

Le rendement du composé **10** est de 81 % calculé à partir de la quantité initiale d'amines (peptide-résine de poids sec 290 mg ; 0,081 mmoles).

Synthèse d'analogues avec les dérivés Fmoc-Arg[bis(δ, ω)-Aloc]-OH, Fmoc-Asp(OAl)-OH et Fmoc-Thr(Trt)-OH



Ces analogues ont été synthétisés selon la même procédure que pour l'obtention de **18**. L'ordre des quatre premiers acides aminés a été inversé. Après avoir obtenu la résine **17** (260mg, 0,1 mmol) dans les conditions précédentes (page 175), le couplage du premier acide aminé sur le bras HMPA a été optimisé.

Fmoc-Ala-OH (311,3 mg, 1 mmol, 10eq) est versé dans 6 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre. Le produit se solubilise lors de l'ajout de 1 ml de DMF anhydre. L'ensemble est refroidi dans un bain de glace à 0°C avant l'incorporation du DCC (103,2 mg, 0,5 mmol, 5eq) pour former l'anhydride symétrique. La réaction se déroule sous argon pendant 30 minutes et dans ces conditions, la formation du précipité dicyclohexylurée (DCU) est plus rapide comparée au même protocole dans seulement du DMF anhydre. La DCU est éliminée en utilisant une seringue frittée sous argon. La solution limpide contient l'anhydride dans un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF. Le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> est évaporé au BÜCHI et l'anhydride est directement versée sur la résine HMPA-PEGA **17** pendant 10 minutes. La 4-diméthylaminopyridine (DMAP, 0,61 mg, 0,005 mmol, 0,05eq) dissoute dans 1ml de DMF sec est alors ajoutée sur la résine puis la réaction se déroule pendant 2 heures. L'amino-résine Fmoc-Ala-HMPA-PEGA **26** est lavée par DMF/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Une benzylation est effectuée avec de l'anhydride benzoïque (113,7mg, 0,5 mmol, 5eq) et de la pyridine (8 µl, 0,1 mmol, 1eq) pendant 30 minutes dans du DMF pour bloquer les éventuelles fonctions alcool libre de la résine HMPA-PEGA **17**

susceptibles de donner des sous-produits durant l'élongation peptidique. Un aliquote est prélevé pour déterminer le pourcentage de fixation lors de l'élimination du Fmoc. L'adduit fluorénylméthyl-piperidine a été dosé par spectroscopie UV ( $\lambda = 301 \text{ nm}$ ,  $\varepsilon = 7800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ) et permet d'estimer le rendement de couplage à 100% à partir de la quantité initiale d'amines disponibles (0,1mmol, 280mg).

L'élongation de la séquence *H*-R<sub>13</sub>-Gly-Ala-Gly-*OH* sur *H*-Ala-HMPA-PEGA est réalisée à l'aide du synthétiseur selon la procédure classique pour obtenir *H*-R<sub>13</sub>-Gly-Ala-Gly-Ala-HMPA-PEGA. Le rendement de couplage de 96% est évalué par le dosage du Fmoc libéré du dernier acide aminé de la séquence (310 mg de résine sèche, 0,096 mmol).

Le peptide-résine *H*-R<sub>13</sub>-Gly-Ala-Gly-Ala-HMPA-PEGA est divisé en quatre lots (50mg, 0,015mmol) et les trois derniers acides aminés sont couplés sur le synthétiseur selon la procédure générale. Le suivi UV sur l'appareil et le dosage de l'adduit fluorénylméthyl-piperidine formé lors de l'élimination du Fmoc du dernier acide aminé par spectroscopie UV ( $\lambda = 301 \text{ nm}$ ,  $\varepsilon = 7800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ) indiquent pour les composés **33**, **33**<sub>T-A</sub>, **33**<sub>D-A</sub> et **33**<sub>TD-AA</sub> une quantité d'amines disponible comprise entre 0,12 et 0,15 mmol. Une coupure des peptides du support par un traitement au TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2,5/2,5) pendant 1 heure est effectuée puis ils sont précipités, lavés dans l'éther froid, centrifugés (2x5min à 5000 tr/min) puis séchés. On obtient environ 10mg de produit brut qui sont dissout dans 10ml d'H<sub>2</sub>O. L'analyse HPLC révèle une multitude de pics HPLC et la SM ne permet pas de formuler des hypothèses convaincantes.

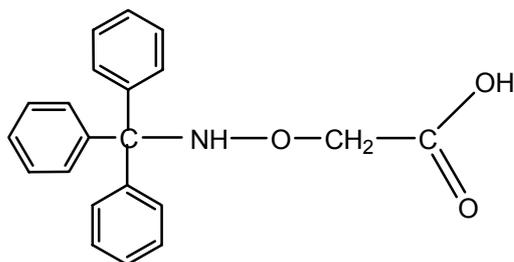
Caractéristiques des analogues :

HPLC analytique : 3-39 % B en 40 min

Composé	Tr	Formule chimique	Masse moyenne	ESI-MS [MH] <sup>+</sup>
33	25'15	C <sub>26</sub> H <sub>45</sub> O <sub>12</sub> N <sub>11</sub>	703,71	704,88 ± 0,06
33 <sub>T-A</sub>	24'94	C <sub>25</sub> H <sub>43</sub> O <sub>11</sub> N <sub>11</sub>	673,68	674,27 ± 0,09
33 <sub>D-A</sub>	19'21	C <sub>25</sub> H <sub>45</sub> O <sub>10</sub> N <sub>11</sub>	659,70	660,82 ± 0,11
33 <sub>TD-AA</sub>	20'74	C <sub>24</sub> H <sub>43</sub> O <sub>9</sub> N <sub>11</sub>	629,67	630,77 ± 0,03



### Synthèse de Trt-Aoa-OH **38**



Aoa[1/2 HCl] (1g, 9,15 mmol, 1eq) est dissout dans 100 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. On ajoute de la DIEA (4,79 ml, 27,5 mmol, 3eq) et du Trt-Cl (2,805 g, 10,065 mmol, 1,1eq). La réaction se déroule pendant 15 heures à température ambiante et elle est suivie par CCM. Deux produits distincts apparaissent qui après révélation aux vapeurs de TFA deviennent jaunes indiquant alors la présence de Trt sur les composés formés. Le premier serait le produit attendu **38** et le second correspondrait à une bis-tritylation de l'Aoa (Trt-Aoa-Trt **38'**). Après évaporation du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, on élimine ce produit parasite par une transestérification dans une solution de MeOH (50 ml) à reflux pendant 60 minutes. Le suivi de la réaction s'effectue par CCM. Le produit est purifié rapidement sur colonne flash de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) car le Trt est très sensible en milieu acide. Les solvants sont évaporés ; le produit **38** est lyophilisé et obtenu sous la forme d'une poudre blanche. La caractérisation par HPLC à 254 nm, spectrométrie de masse et RMN du Trt-Aoa-OH a été réalisée et le rendement de la réaction est de 62 % (1,9g).

Solvants de CCM : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95/5)

ESI-MS = 334,2 calculée pour C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>O<sub>3</sub>N, [M]<sup>+</sup> = 333,1

HPLC analytique : Tr = 9'5 (50% à 90%B en 12')

RMN dans DMSO-d<sub>6</sub> : δ (ppm): 12,71 (s, 1H, COOH); 7,7 (s, 1H, -NH-O); 7,3 (m, 15H, 3 C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 4,1 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-COOH).

Le peptide résine protégé sur les chaînes latérales H-PPAH(Mmt)GVT(Trt)S(Trt)A-HMPA-PEGA est séché afin de calculé sont en gain en poids (422,5 mg). L'absorbance de l'adduit fluorénylméthyl-pipéridine libéré lors de la déprotection du Fmoc de la proline par le traitement pipéridine a été mesurée à 301 nm ( $\epsilon = 7800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ). La valeur de 0,092 mmole indique que le rendement d'élongation est donc de 92% en partant de la quantité initiale d'amines.

Le couplage de **38** s'effectue selon la procédure manuelle. Trt-Aoa-OH (153,2 mg de 0,46 mmol, 5eq) et HATU (174,8mg, 0,46 mmol, 5 eq) sont dissous dans 5 ml de DMF. L'ensemble est versé sur la résine contenue dans une seringue frittée pendant 5

minutes. La DIEA est alors incorporée (96,2 µl, 0,55 mmol, 6eq) et l'agitation se déroule pendant 2 heures. La résine est lavée par DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH puis un test de Vojkovsky négatif permet de conclure à un couplage quantitatif. Après séchage, le composé **39** a une masse de 445 mg (0,092 mmol).

H-Aoa-PPAHGVTSA-OH **37**

Un aliquote de **39** est traité avec TFA/H<sub>2</sub>O (95/5) pendant 60 minutes afin de déprotéger les chaînes latérales et de couper le peptide de son support. Le composé **37** est analysé par HPLC et spectrométrie de masse.

MALDI-MS [MH]<sup>+</sup> = 909,55 calculée pour C<sub>38</sub>H<sub>60</sub>O<sub>14</sub>N<sub>12</sub>, [M] = 908,43  
HPLC analytique : Tr = 6' (10% à 41%B en 50')

H-Aoa-PPAHGVTSA-HMPA-PEGA **6'**

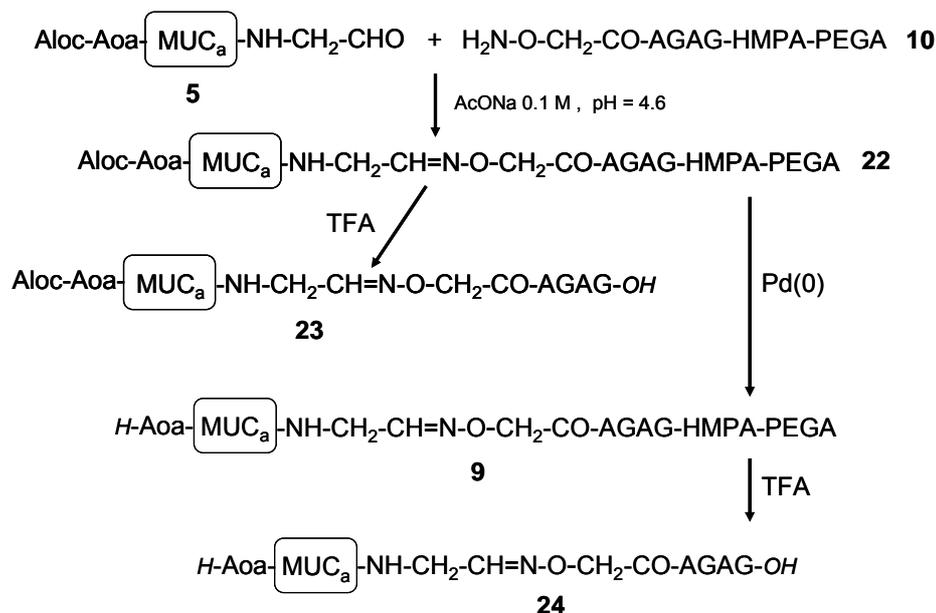
Un aliquote de **39** est également traité par une solution de TFA/TIS/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2/2/98 en v/v) en « flux continu » pendant 12 minutes. Le peptide-résine « nu » est lavé par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF avant d'être soumis à une coupure à la soude selon la procédure générale. On obtient de nouveau le composé **37** avec les caractéristiques mentionnées ci-dessus.

**Le rendement global de la synthèse du fragment C-terminal 6' est de 92 % à partir de la quantité initiale d'amines.**

### III. Multiligations oxime

#### III. 1. Etude préliminaire : Synthèse de Aloc-AoaMUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH=NO-CH<sub>2</sub>-CO-MUC<sub>a</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH=NO-CH<sub>2</sub>-CO-AGAG-OH 25

Rappel de la synthèse:



#### Synthèse du peptide-résine 9 (première ligation oxime)

Le composé **5** (17,5mg, 0,0084mmol, 1,5eq) est dissout dans 2 ml de AcONa 0,1 M, pH = 4,6. La solution obtenue est versée dans une seringue équipée d'un fritté contenant **10** (20mg, 0,0056mmol, 1eq) pendant 5 heures. Le composé **23** obtenu par clivage d'un aliquote (2mg) du peptide résine **22** au TFA selon la procédure générale décrite précédemment, est analysé.

MALDI-MS [MH]<sup>+</sup> = 2413,97 calculée pour C<sub>100</sub>H<sub>156</sub>O<sub>38</sub>N<sub>32</sub>, [M] = 2413,12  
HPLC analytique : Tr = 25' 23 (3% à 39%B en 40')

Le groupement Aloc du composé **22** est éliminé par addition de Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub> (1mg, 0,017mmol, 3eq) et Pd[P(Ph)<sub>3</sub>]<sub>4</sub> (1,3mg, 0,001mmol, 0,2 équivalent) dans 2 ml de NMP. La réaction se déroule pendant 10 minutes sous argon et la résine est lavée avec de la NMP(3x), NMP contenant 0,5 % de diéthylthiocarbamate de sodium hydraté (3x),

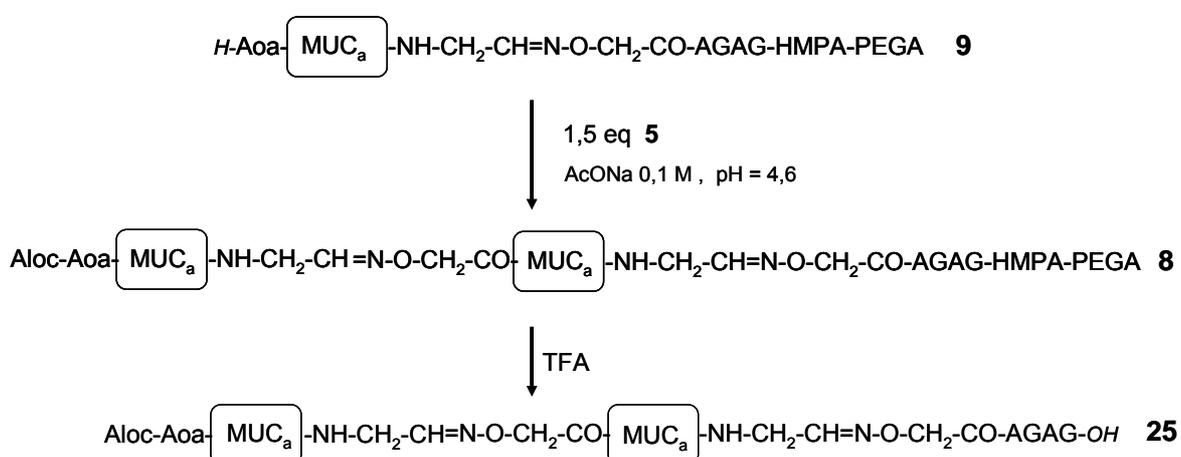
NMP(3x) et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x). Un aliquote de **9** (2mg) est traité en présence de TFA selon la procédure générale et le composé **24** est alors analysé.

MALDI-MS [MH]<sup>+</sup> = 2330,22 calculée pour C<sub>96</sub>H<sub>152</sub>O<sub>36</sub>N<sub>32</sub>, [M]= 2329,10

HPLC analytique : Tr = 20' 73 (3% à 39%B en 40')

Le rendement de la première ligation est quantitatif et l'excès de produit **5** théorique (5,83mg, 0,0028mmol, 0,5eq) est récupéré dans le tampon acétate (2ml), analysé puis réutilisé pour la seconde ligation. Notons que 5mg de **5** ont été récupérés.

### Synthèse du peptide-résine **8** (seconde ligation oxime)



La seconde ligation avec le même fragment médian **5** est réalisée suivant le même protocole que pour la première ligation.

Le composé **5** (13,1mg, 0,0063mmol, 1,5eq) est dissout dans 2 ml de AcONa 0,1 M, pH = 4,6. La solution obtenue est versée dans une seringue équipée d'un fritté contenant **9** (15mg, 0,0042mmol, 1eq) pendant 5 heures. Le composé **25** obtenu par coupure du peptide résine **8** au TFA selon la procédure générale, est alors analysé.

MALDI-MS [MH]<sup>+</sup> = 4396,31 calculée pour C<sub>184</sub>H<sub>287</sub>O<sub>67</sub>N<sub>59</sub>, [M]= 4395,09

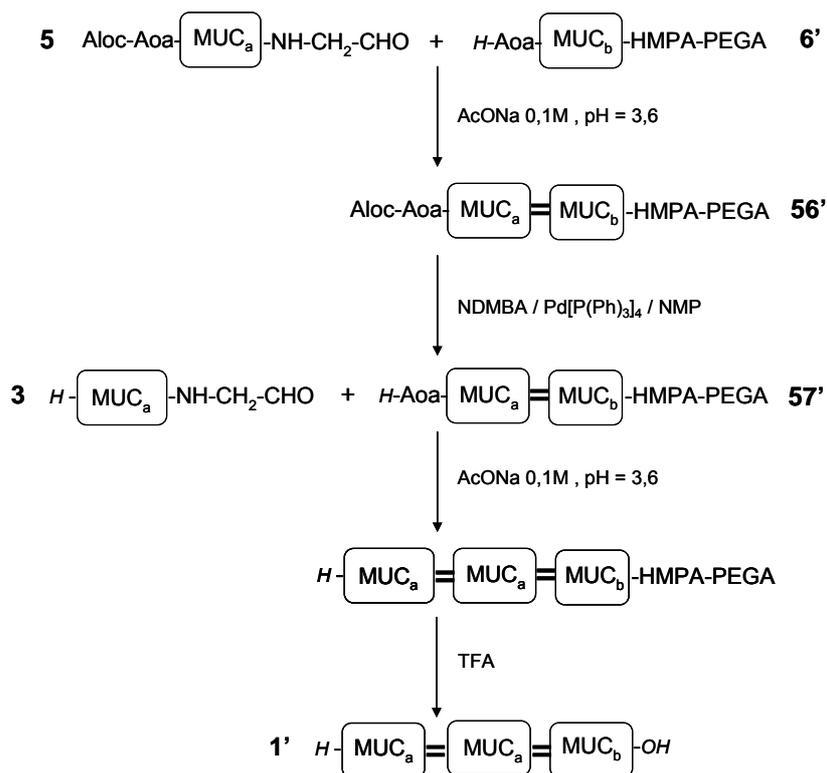
HPLC analytique : Tr = 26' 07 (3% à 39%B en 40')

Le rendement de la seconde ligation est de 97% (estimation par rapport à l'intégration des pics HPLC à 214nm). L'excès de produit **5** (4mg) est récupéré dans le

tampon acétate (2ml). Le composé **25** a été purifié en HPLC semi-préparative et on obtient 12 mg d'un composé sous forme de poudre blanche.

Le rendement de la synthèse conduisant au peptide **25** est de 65 % en partant de la quantité initiale d'amines disponibles.

### III. 2. Synthèse de 1'



### Synthèse du peptide-résine 56' (première ligation oxime)

Afin de minimiser les éventuelles réactions parasites (adduits sur Aoa et transoximation) et d'optimiser la ligation, la première réaction s'effectue à partir du peptide-résine protégé **39** (20mg, 0,0041mmol, 1eq) présent dans une seringue munie d'un fritté. On élimine les groupes protecteurs par une solution de TFA/TIS/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2/2/98 en v/v) en « flux continu » pendant 12 minutes. Le peptide-résine « nu » **6'** est lavé par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O puis on verse 1,1 équivalents de **5** (9,5mg, 0,0045mmol) dissout dans 1,5 ml de tampon acétate 0,1M de pH = 3,6 pendant 3 heures 30 minutes. Un aliquote (2mg) du peptide-résine **56'** est coupée de son support

par TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2,5/2,5 dans 0,5ml) pendant 30 minutes puis précipité dans l'éther froid pour conduire au composé Aloc-AoaMUC<sub>a</sub>=MUC<sub>b</sub>-OH qui est analysé.

MALDI-MS [MH]<sup>+</sup> = 2975,61 calculée pour C<sub>126</sub>H<sub>195</sub>O<sub>45</sub>N<sub>39</sub>, [M]= 2974,41  
HPLC analytique : Tr = 23' 90 (10% à 41%B en 50')

Le rendement de la première ligation est de 92% (estimation par rapport à l'intégration des pics HPLC à 214nm).

Remarques : 0,5mg de **5** ont été récupéré à la suite de la première ligation.

Mode opératoire pour la formation de « l'adduit acétone » sur le composé **6'**  
**6'** (2mg, 00041mmol, 1eq) est introduit dans une seringue équipée d'un fritté et dissout dans 0,5 ml de tampon acétate 0,1M à pH=3,6. L'acétone (150µl, 0,002mmol, 5eq) est additionnée pendant 15 minutes. Après filtration et lavages de la résine par le tampon/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la résine est traitée avec TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2,5/2,5 dans 0,5ml) pendant 30 minutes. « L'adduit acétone » est précipité dans un mélange Et<sub>2</sub>O/EP (1 :1), lavé avec Et<sub>2</sub>O, séché et analysé.

MALDI-MS [MH]<sup>+</sup> = 949,51 calculée pour C<sub>41</sub>H<sub>64</sub>O<sub>14</sub>N<sub>12</sub>, [M]= 948,46  
HPLC analytique : Tr = 16' 72 (10% à 41%B en 50')

#### Elimination de l'Aloc du peptide-résine **56'**

Le groupement Aloc du composé **56'** est éliminé par addition de NDMBA (3,85mg, 0,0246mmol, 6eq) et Pd[P(Ph)<sub>3</sub>]<sub>4</sub> (9,5mg, 0,0082mmol, 2eq) dans la 1,5 ml de NMP anhydre. La réaction se déroule pendant 30 minutes sous argon et la résine est lavée NMP/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Un aliquote (2mg) du peptide-résine **57'** est coupée de son support par TFA/H<sub>2</sub>O (95/5 dans 0,5ml) pendant 30 minutes pour conduire au composé H-AoaMUC<sub>a</sub>=MUC<sub>b</sub>-OH qui est analysé. Au regard du profile HPLC, la déprotection est quantitative.

MALDI-MS [MH]<sup>+</sup> = 2891,13 calculée pour C<sub>122</sub>H<sub>191</sub>O<sub>43</sub>N<sub>39</sub>, [M]= 2890,39  
HPLC analytique : Tr = 14' 51 (10% à 41%B en 50')

« Adduit acétone » sur le composé **57'** :

Le mode opératoire est le même que « l'adduit acétone » sur **6'** mais le temps de réaction est de 120 minutes.

MALDI-MS  $[MH]^+$  = 2931,16 calculée pour  $C_{125}H_{195}O_{43}N_{39}$ ,  $[M]$  = 2930,42  
HPLC analytique : Tr = 24' 72 (10% à 41%B en 50')

Lorsque le nombre d'équivalents en acétone augmente :

L'acétone (3ml, 0,041mmol, 100eq) est additionnée pendant 120 minutes. Après filtration et lavages de la résine par le tampon/  $CH_2Cl_2/MeOH/CH_2Cl_2$ , la résine est traitée avec TFA/ $H_2O/TIS$  (95/2,5/2,5 dans 0,5ml) pendant 30 minutes. « L'adduit acétone » est précipité dans un mélange  $Et_2O/EP$  (1 :1), lavé avec  $Et_2O$ , séché et analysé.

MALDI-MS  $[MH]^+$  = 2931,32 calculée pour  $C_{125}H_{195}O_{43}N_{39}$ ,  $[M]$  = 2930,42  
HPLC analytique : Tr = 24' 20 (10% à 41%B en 50')

Produit de transoximation :

MALDI-MS  $[MH]^+$  = 949,78 calculée pour  $C_{41}H_{64}O_{14}N_{12}$ ,  $[M]$  = 948,46  
HPLC analytique : Tr = 17' 51 (10% à 41%B en 50')

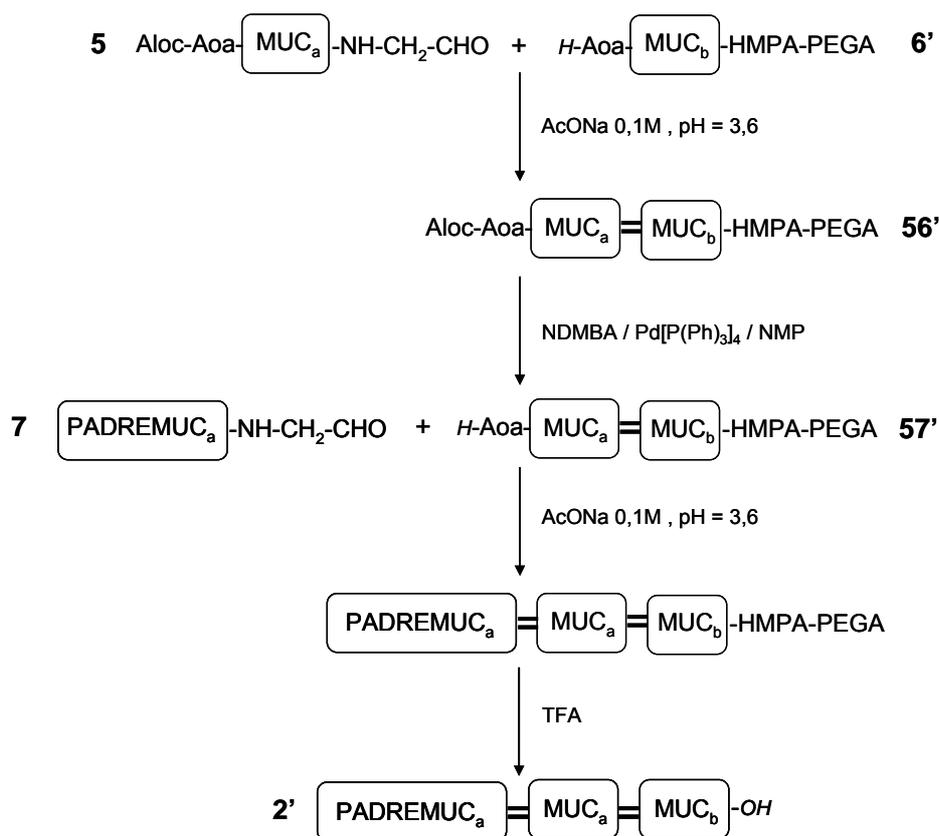
#### Synthèse de **1'** (seconde ligation oxime)

Cette seconde ligation oxime sur support solide est effectuée dans les mêmes conditions que la première. Dans une seringue équipée d'un fritté et contenant **57'** (10mg, 0,002mmol, 1eq), on ajoute **3** (4,3mg, 0,0022mmol, 1,1 eq) dissout dans 1,5 ml de tampon acétate 0,1M de pH = 3,6. Après 3 heures 30 minutes, la résine est lavée avec le tampon/ $CH_2Cl_2/MeOH/CH_2Cl_2$ . Un aliquote (2mg) du peptide-résine est coupée de son support par TFA/ $H_2O/TIS$  (95/2,5/2,5 dans 0,5ml) pendant 30 minutes puis précipité dans l'éther froid pour conduire au composé **1'** qui est analysé.

MALDI-MS  $[MH]^+$  = 4802,74 calculée pour  $C_{204}H_{319}O_{70}N_{65}$ ,  $[M]$  = 4799,33  
HPLC analytique : Tr = 17' 34 (10% à 41%B en 50')

Au final, on obtient 5mg de **1'** et le rendement global de la synthèse est de 52% à partir de la quantité d'amines disponibles.

### III. 3. Synthèse de 2'



#### Synthèse du peptide-résine 57' (Après la première ligation oxime)

Les étapes de synthèse du composé 1' ont permis de prendre 10mg de 57' pour entreprendre la seconde ligation oxime.

#### Synthèse de 2' (seconde ligation oxime)

Cette seconde ligation oxime sur support solide est effectuée dans les mêmes conditions que la première. Dans une seringue équipée d'un fritté et contenant 57' (10mg, 0,002mmol, 1eq), on ajoute 7 (7mg, 0,0022mmol, 1,1 eq) dissout dans 1,5 ml de tampon acétate 0,1M de pH = 3,6. Après 3 heures 30 minutes, la résine est lavée avec le tampon/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Un aliquote (2mg) du peptide-résine est coupée de son support par TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2,5/2,5 dans 0,5ml) pendant 30 minutes puis précipité dans l'éther froid pour conduire au composé 2' qui est analysé.

MALDI-MS  $[MH]^+ = 6064,74$  calculée pour  $C_{266}H_{420}O_{83}N_{80}$ ,  $[M] = 6063,11$   
HPLC analytique : Tr = 35' 78 (10% à 41%B en 50')

Au final, on obtient 4 mg de **2'** et le rendement global de la synthèse est de 33% à partir de la quantité d'amines disponibles.

## **IV. GLYCOSYLATION**

### **IV. 1. Mode opératoire pour la glycosylation**

L'enzyme est l'UDPGalNAc, polypeptide  $\alpha$ -GalNAc transférase T1 (E.C.2.4.1.41), construction soluble de l'enzyme bovine exprimée dans les cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant ~ 10 ng/ $\mu$ l, ~ 3U/mg

Le milieu réactionnel contient :

50 mM morpholino-éthane sulfonique (MES), pH = 6,5

15 mM de  $MnCl_2$

5 mg/ml d'albumine sérique bovine

20  $\mu$ M d'UDP- $[^3H]$ GalNAc, 25000 cpm/nmol

5 ng d'enzyme

peptide accepteur de concentration  $[C] = 0 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5$  mg/ml

L'incubation est de 30 mn à 37°C puis la réaction est arrêtée avec 0,75 ml d'eau. La purification sur colonne d'échange d'anions (Dowex 1 $\times$ 8,  $Cl^-$ , 100-200 mesh) permet la rétention des groupements phosphates de l'UDP- $[^3H]$ GalNAc qui n'ont pas réagi avec le substrat ainsi que les résidus  $[^3H]$ GalNAc libres provenant de la dégradation de l'UDP- $[^3H]$ GalNAc.

Après l'élution, 2,5 ml de liquide de scintillation sont ajoutés à l'éluat permettant alors une mesure de la radioactivité par un compteur à scintillation (Liquid Scintillation Analyzer, Packard, Rungis, France) afin de déterminer l'efficacité du transfert des résidus GalNAc.

Notons que pour évaluer la radioactivité due aux résidus GalNAc libres, un témoin est réalisé avec un mélange réactionnel sans le peptide accepteur.

## IV. 2. Synthèse des monomères

### Synthèse du monomère MUC1(COOH)

Une Fmoc-Ala-Wang-PS (250 mg de résine sèche ; substitution : 0,4 mmoles/g) est traitée par une solution de pipéridine à 20% dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml), 3 x 5 min. La synthèse sur phase solide a été ensuite réalisée en stratégie Fmoc/tBu selon la procédure générale. Le rendement de couplage de 95% est évalué par le dosage du Fmoc libéré du dernier acide aminé de la séquence (420 mg de résine sèche, 0,095 mmol).

Le peptide-résine est soumis à un traitement au TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (90/5/5 en v/v) pendant deux heures ; la solution est filtrée et la résine est lavée au DCM ; le filtrat recueilli est évaporé puis précipité dans l'éther froid. Le peptide est filtré sur fritté, séché et purifié par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC).

Obtention de 170 mg de composé sous la forme d'une poudre blanche.

Rdt = 95% calculé à partir de la quantité initiale d'amines

ESI-MS = 1886.61 +/- 0.41 calculée pour C<sub>80</sub>H<sub>127</sub>O<sub>28</sub>N<sub>25</sub>, [M]= 1885.17

HPLC : Tr = 19'94 (3% à 30% B en 30')

HPLC semi-préparative : Tr = 6'05 (15% à 30% B en 30')

### Synthèse du monomère MUC1(CONH<sub>2</sub>)

Une Fmoc-Rink-Amide résine (250 mg de résine sèche ; substitution : 0,4 mmoles/g) est traitée par une solution de pipéridine à 20% dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml), 3 x 5 min. La synthèse sur phase solide a été ensuite réalisée en stratégie Fmoc/tBu selon la procédure générale. Le rendement de couplage de 90% est évalué par le dosage du Fmoc libéré du dernier acide aminé de la séquence (400 mg de résine sèche, 0,090 mmol).

Le peptide-résine est soumis à un traitement au TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (90/5/5 en v/v) pendant deux heures ; la solution est filtrée et la résine est lavée au DCM ; le filtrat recueilli est évaporé puis précipité dans l'éther froid. Le peptide est filtré sur fritté, séché et purifié par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC).

Obtention de 151 mg de composé sous la forme d'une poudre blanche.

Rdt = 90% calculé à partir de la quantité initiale d'amines

ESI-MS = 1885.51 +/- 0.12 calculée pour C<sub>80</sub>H<sub>128</sub>O<sub>27</sub>N<sub>26</sub>, [M]= 1885.07

HPLC : Tr = 19'12 (3% à 30% B en 30')

HPLC semi-préparative : Tr = 5'36 (15% à 30% B en 30')

### Synthèse du monomère Aoa-MUC<sub>a</sub>-OH

Fmoc-Ala-Wang-PS (250 mg de résine sèche ; substitution : 0,4 mmoles/g) est traitée par une solution de pipéridine à 20% dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml), 3 x 5 min. La synthèse sur phase solide a été ensuite réalisée en stratégie Fmoc/*t*Bu selon la procédure générale. Le peptide-résine *H*-MUC<sub>a</sub>-Wang-PS est dissout dans le DMF et introduit dans une seringue équipée d'un fritté. Boc-Aoa-OH (65mg, 0,34 mmol, 4eq) est solubilisé dans du DMSO (0,5 ml) puis dans 5 ml de DMF avec DCC (70,1mg, 0,34 mmol, 4eq) et HOBt (52,1mg, 0,34 mmol, 4eq). Après 5 minutes, cette solution est transférée sur le peptide-résine et agitée pendant 2 heures. La résine ensuite rincée au DMF(3x) et au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x). On obtient le composé Boc-Aoa-MUC<sub>a</sub>-Wang-PS et un test de Vojkovsky négatif permet d'envisager un couplage quantitatif (peptide-résine de poids sec 415 mg ; 0,092 mmoles).

Le peptide-résine est soumis à un traitement au TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (90/5/5 en v/v) pendant deux heures ; la solution est filtrée et la résine est lavée au DCM ; le filtrat recueilli est évaporé puis précipité dans l'éther froid. Le peptide est filtré sur fritté, séché et purifié par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC).

Le traitement classique de déprotection de l'aminoxy se poursuit par la déprotection des chaînes latérales et le clivage du peptide de la résine par le mélange TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2,5/2,5 en v/v) pendant deux heures. Les étapes de lavages, évaporation des solvants et précipitation à 0°C dans l'éther très pur dépourvu d'acétaldéhydes terminent la manipulation. Le produit Aoa-MUC<sub>a</sub>-OH est ensuite purifié, lyophilisé et stocké à -20°C.

Obtention de 145 mg de composé sous la forme d'une poudre blanche.

Rdt = 81% calculé à partir de la quantité initiale d'amines

ESI-MS = 1959.69 +/- 0.53 calculée pour C<sub>82</sub>H<sub>130</sub>O<sub>30</sub>N<sub>26</sub>, [M]= 1959.27

HPLC : Tr = 17'25 (15% à 60% B en 40')

HPLC semi-préparative : Tr = 19'36 (17% à 44% B en 30')

## Synthèse du monomère H-MUC<sub>a</sub>(cystéine)-OH



Fmoc-Ala-Wang-PS (250 mg de résine sèche ; substitution : 0,4 mmoles/g) est traitée par une solution de pipéridine à 20% dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml), 3 x 5 min. La synthèse sur phase solide a été ensuite réalisée en stratégie Fmoc/*t*Bu selon la procédure générale. Le rendement de couplage de 96% est évalué par le dosage du Fmoc libéré du dernier acide aminé de la séquence (430 mg de résine sèche, 0,096 mmol).

La déprotection des chaînes latérales et le clivage du monomère de la résine sont réalisés par un traitement avec TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95/2,5/2,5) pendant 2 heures. Les solvants de rinçage et de manipulation sont évaporés et le composé obtenu est précipité dans de l'éther à 0 C ; après filtration, le produit est purifié sous argon par HPLC avec une colonne semi-préparative C18, lyophilisé et stocké sous gaz inerte.

Obtention de 123 mg de composé sous la forme d'une poudre blanche.

Rdt = 68% calculé à partir de la quantité initiale d'amines

ESI-MS: 1892.23 ± 0.47 calculée pour C<sub>78</sub>H<sub>125</sub>O<sub>28</sub>N<sub>25</sub>S, M = 1892.33 ;

HPLC : Tr = 18'7 (15% à 60%B en 40')

HPLC semi-préparative : Tr = 18'52 (17% à 44%B en 30')

### **IV. 3. Synthèse des dimères**

#### Synthèse du dimère MUC2(amide) 58

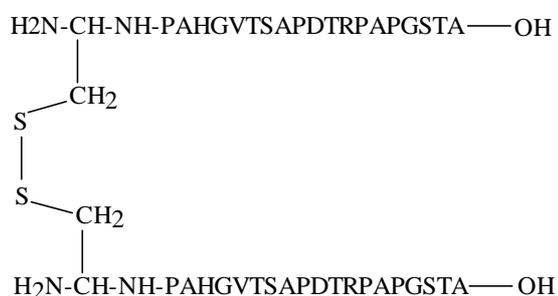
Fmoc-Ala-Wang-PS (250 mg de résine sèche ; substitution : 0,4 mmoles/g) est traitée par une solution de pipéridine à 20% dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml), 3 x 5 min. La synthèse sur phase solide a été ensuite réalisée en stratégie Fmoc/*t*Bu selon la procédure générale. Le rendement de couplage de 82% est évalué par le dosage du Fmoc libéré du dernier acide aminé de la séquence (620 mg de résine sèche, 0,082 mmol).

La déprotection des chaînes latérales et le clivage du dimère de la résine sont réalisés par un traitement avec TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95/2,5/2,5) pendant 2 heures. Les solvants de

rinçage et de manipulation sont évaporés et le composé obtenu est précipité dans de l'éther à 0 C ; après filtration, le produit est purifié par HPLC avec une colonne semi-préparative C18, lyophilisé et stocké.

Obtention de 200 mg de composé sous la forme d'une poudre blanche  
 Rdt = 65% calculé à partir de la quantité initiale d'amines  
 ESI-MS:  $3755.48 \pm 0.30$  calculée pour  $C_{160}H_{252}O_{55}N_{50}$  M= 3754.60  
 HPLC : Tr = 17' (0% à 100%B en 50')  
 HPLC semi-préparative : Tr = 17'36 (0% à 100%B en 50')

### Synthèse du dimère MUC2(cystéine) 60

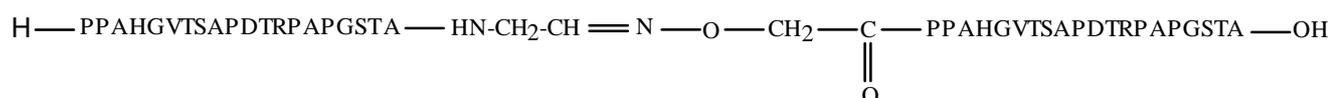


L'oxydation de 15 mg de monomère *H*-MUC<sub>a</sub>(cystéine)-OH se déroule à l'air en milieu basique à pH = 8, avec du carbonate d'ammonium [(H<sub>4</sub>N)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>] = 0,1 M, pendant 24 heures.

Le produit est ensuite purifié en HPLC semi-préparative, les solvants évaporés et le dimère obtenu, lyophilisé.

Obtention de 13,5 mg de composé sous la forme d'une poudre blanche  
 Rdt = 90% calculé à partir de la quantité initiale de monomère utilisé.  
 ESI-MS:  $3783.37 \pm 0,22$  calculée pour  $C_{156}H_{248}O_{56}N_{50}S_2$  M= 3782.66  
 HPLC : Tr = 20'86 (17% à 42%B en 30')  
 HPLC semi-préparative : Tr = 21'71 (17% à 44%B en 30')

### Synthèse du dimère MUC2(oxime) 59



Le partenaire aldéhyde **3** (*H*-MUC<sub>a</sub>-CHO) [8 mg, du  $4,05 \cdot 10^{-3}$  mmol, 1 éq] est dissout dans 8 ml d'un mélange TFA/H<sub>2</sub>O (95/5 en v/v) pendant 10 mn ; la solution est alors

évaporée à sec. Aoa-MUC<sub>a</sub>-OH [ $8,16 \cdot 10^{-3}$  mmol, 2 éq, 16 mg) est dissout dans un tampon acétate de concentration égale à 0,1M et de pH = 4,6.

Le composé Aoa-MUC<sub>a</sub>-OH est transvasé dans le tube contenant le composé **3** et la cinétique de la réaction est suivie par HPLC analytique ; au bout de 5 heures le partenaire en défaut a totalement été consommé et le produit obtenu est purifié par HPLC semi - préparative.

Obtention de 12 mg de composé sous la forme d'une poudre blanche

Rdt = 75% calculé à partir de la quantité initiale de monomère **3** utilisé

ESI-MS :  $3869.63 \pm 0.47$  calculée pour C<sub>164</sub>H<sub>258</sub>O<sub>57</sub>N<sub>52</sub> M = 3869.13

HPLC : Tr = 21'79 (15% à 60%B en 40')

HPLC semi-préparative : Tr = 23'69 (15% à 60%B en 40')

#### IV. 4. Analyse des composés dimères glycosylés par LC/MS

Mode opératoire :

Préparation de solution mère à 250 pmol /  $\mu$ l dans l'eau puis injection de 1  $\mu$ l de cette solution mère dans une colonne Pepmap C18 (15cm x 300 $\mu$ m x 3 $\mu$ m) de débit 5 $\mu$ l / min. (Solvants : A : H<sub>2</sub>O + 0,1 % TFA ; B : ACN + 0,1 % TFA)

Composé	1 GalNAc	2 GalNAc	3 GalNAc
MUC(COOH)	2089,68 $\pm$ 0,21	/	/
MUC(CONH <sub>2</sub> )	2088,61 $\pm$ 0,24	2291,70 $\pm$ 0,02	/
MUC2(amide)	3958,51 $\pm$ 0,55	4161,28 $\pm$ 0,81	4364,48 $\pm$ 0,26
MUC2(oxime)	4072,13 $\pm$ 0,36	4275,59 $\pm$ 0,16	4478,71 $\pm$ 0,24
MUC2(cystéine)	3986,40 $\pm$ 0,67	4189,77 $\pm$ 0,47	/

## **BIBLIOGRAPHIE**

**A**grawal B., Krantz MJ., Reddish MA., Longenecker BM. Cancer-associated MUC1 mucin inhibits human T-cell proliferation, which is reversible by high IL-2. *Nat. Med.* **1998**, 4, 43-49.

Albericio F., Barany G. Improved approach for anchoring N<sup>α</sup>-9-fluorenylmethoxycarbonylamino acids as p-alkoxybenzyl esters in solid-phase peptide synthesis. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1985**, 26, 92-97.

Albericio F., Bofill JM., El-Faham A., Kates SA. Use of onium salt-based coupling reagents in peptide synthesis. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 9678-9683.

Albericio F. Orthogonal protecting groups for N<sup>α</sup>-amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase peptide synthesis. *Biopolymers.* **2000**, 55, 123-139.

Alewood P., Alewood D., Miranda L., Love S., Meutermans W., Wilson D. Rapid *in situ* neutralization protocols for Boc and Fmoc solid-phase chemistries. *Methods Enzymol.* **1997**, 289, 14-29.

Alexander J., Sidney J., Southwood S., Ruppert J., Oseroff C., Maewal A., Snoke K., Serra HM., Kubo RT., Sette A., Grey H.M. Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. *Immunity*, **1994**, 1, 751-761.

Apostolopoulos V., Osinski C., McKenzie IFC. MUC1 cross-reactive Gala(1,3)Gal antibodies in humans switch immune responses from cellular to humoral. *Nat. Med.* **1998**, 4, 315-320.

Aoyagi T., Takeuchi T., Matsuzaki A., Kawamura K., Kondo S. Leupeptins: new protease inhibitors from Actinomycetes. *J. Antibiot.* **1969**, 22, 283-286.

Aucagne V., Gueyrard D., Tatibouët A., Cottaz S., Driguez H., Lafosse M., Rollin P. The first synthesis of C-glucotropaeolin. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 7319-7321.

Aucagne V., Leigh DA. Chemoselective formation of successive triazole linkages in one pot: "click-click" chemistry. *Org. Lett.* 2006, 8, 4505-4507.

**B**ang DH., Kent SBH. A one-pot total synthesis of crambin. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 2534-2538.

Barany G., Merrifield RB. A new amino protecting group removable by reduction chemistry of the dithiasuccinoyl (Dts) function. *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 7363-7365

Barlos K., Chatzi O., Gatos D., Stavropoulos G., Tseggenidis T. Fmoc-His(Mmt)-OH und Fmoc-His(Mtt)-OH: Zwei neue histidin-derivate N<sup>im</sup>-geschützt mit säurehochempfindlichen gruppen. Darstellung, eigenschaften und einsatz in der peptidsynthese. *Tetrahedron Lett.* 1991, 32, 475-478.

Barlos K., Gatos D., Hatzi O., Koch N., Koutsogianni S. Synthesis of the very acid-sensitive Fmoc-cys(Mmt)-OH and its application in solid-phase peptide synthesis. *Int. J. Peptide Protein Res.* 1996, 47, 148-153.

Beligere GS., Gangamani S., Dawson PE., *Biopolymers*. Synthesis of a three zinc finger protein, Zif268, by native chemical ligation. 2000, 51, 363-369.

Bennett EP., Hassan H., Mandel U., Mirgorodskaya E., Roepstorff P., Burchell J., Taylor-Papadimitriou J., Hollingsworth MA., Merx G., van Kessel AG and others. Cloning of a human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase that complements other GalNAc-transferases in complete O-glycosylation of the MUC1 tandem repeat. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 30472-30481.

Bilker MS., Melief CJM., Offringa R., van der Burg SH. Design and development of synthetic vaccines: past, present and future. *Expert Drug Des.* 2007, 6, 591-603.

Borgia JA., Fields GB. Chemical synthesis of proteins. *Trends Biotechnol.* 2000, 18, 243-251.

Boturyn D., Coll JL., Garanger E., Favrot MC., Dumy P. Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 5730-5739.

Brask J., Jensen KJ. Carbopeptides : chemoselective ligation of peptide aldehyde to an aminoxy-functionalized D-Galactose template. *J. Peptide Sci.* **2000**, 290-299.

Briggs MT., Morley JS. Polypeptides Part 17: aminoxy-analogues of aspartame and gastrin C-terminal tetrapeptide amide. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1979**, 2138-2143

Bray BL. Large-scale manufacture of peptide therapeutic by chemical synthesis. *Nature Reviews, Drug Discovery.* **2004**, 2, 587-593.

Brik A., Keinan E., Dawson PE. Protein synthesis by solid-phase chemical ligation using a safety catch linker. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 3829-3835.

Brockhausen I., Yang JM., Whitehouse C., Taylor-Papadimitriou J. Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin breast cancer cells. *Eur. J. Biochem.* **1995**, 233, 607-617.

Bruckdorfer T., Marder O., Albericio F. From production of peptides in milligram amounts for research to Multi-Tons quantities for drugs of the future. *Current pharmaceutical Biotechnology.* **2004**, 5, 29-43.

Bui CT., Ercole F., Pham Y., Campbell R., Rasoul FA., Maeji NJ., Ede. NJ. Improving the performance of an acid-labile 4-hydroxymethyl phenoxyacetic acid (HMP) linker on resin and SynPhase grafted solid-supports. *J. Peptide Sci.* **2000**, 6, 534-538.

Buré C., Lelièvre D., Delmas A., Identification of by-products from an orthogonal peptide ligation by oxime bonds using mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, 14, 2158-2164.

Buré (Thèse **2005** à l'université d'Orléans): Fragmentation dans une source à électronebulisation de biomolécules de synthèse: Peptides thioester, acétal, aldéhyde et oligonucléotides bromés.

Burchell J., Gendler S., Taylor-Papadimitriou J., Girling A., Lewis A., Millis R., Lamport D. Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin. *Cancer Res.* **1987**, 47, 5476-5482.

**C**amarero JA., Cotton GH., Adeva A., Muir TW. Chemical ligation of unprotected peptides directly from a solid support. *J. Peptide Res.*, **1998**, 51, 303-316.

Canne LE., Ferré-D'amaré AR., Burley SK., Kent SBH. Total chemical synthesis of a unique transcription factor-related protein : cMyc-Max. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2998-3007.

Canne LE., Botti P., Simon RJ., Chen Y., Dennis EA., Kent SBH. Chemical protein synthesis by solid phase ligation of unprotected peptide segments. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 8720-8727.

Carpino LA., 1-hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397-4398.

Carpino LA., Shroff H., Triolo SA., Mansour ESME., Wenschuh H., Albericio F. The 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group (Pbf) as arginine side chain protectant. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 7829-7832.

Clausen H., Bennett EP. A family of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation. *Glycobiology.* **1996**, 6, 635-646.

Coltart DM. Peptide segment coupling by prior ligation and proximity-induced intramolecular acyl transfer. *Tetrahedron.* **2000**, 56, 3449-3491.

Cordes EH., Jencks WP. Nucleophilic catalysis of semicarbazone formation by anilines. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 826-831.

Cremer GA., Bureaud N., Lelièvre D., Piller V., Kunz H., Piller F., Delmas A. Synthesis of branched oxime-linked peptide mimetics of the MUC1 containing a universal T-helper epitope. *Chem Eur. J.* **2004**, 10, 6353-6360.

Cremer GA., Tariq H., Delmas A. Combining a polar resin and a pseudo-proline to optimize the solid-phase synthesis of a 'difficult sequence'. *J. Peptide Sci.* **2006**, 12, 437-442.

Cremer GA., Bureaud N., Piller V., Kunz H., Piller F., Delmas A. Synthesis and biological evaluation of a multiantigenic Tn/TF-containing glycopeptide mimic of the tumor-related MUC1 glycoprotein. *Chem Med Chem.* **2006**, 1, 965-968.

**D**asgupta B., Chakrabarti P., Gautam B. Enhanced stability of cis Pro-Pro peptide bond in Pro-Pro-Phe sequence motif. *FEBS Letters.* **2007**, 581, 4529-4532.

David R., Michael PO., Beck-Sichinger R and AG. Review : Expressed protein ligation. Method and applications. *Eur.J. Biochem.* **2004**, 271, 663-677.

Dawson PE., Kent SBH. Convenient total synthesis of a 4-helix TASP molecule by chemoselective ligation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 7263-7266.

Dawson PE., Muir TW., Clark-Lewis I., Kent SBH. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*, **1994**, 266, 776-779.

Dawson PE., Kent SBH. Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 923-960.

Decostaire IP., Lelièvre D., Zhang H., Delmas AF. Controlling the outcome of overacylation of N-protected aminoxyacetic acid during the synthesis of an aminoxy-peptide for chemical ligation *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 7057-7060.

Decostaire IP., Lelièvre D., Aucagne V., Delmas AF. Synergic effect of hydride and proton donors in the Pd(0)-mediated deprotection of N<sup>α</sup>-Aloc proline derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 6523-6526.

DeTar DF., DeLos F., Silverstein R. Reactions of Carbodiimides. II. The Reactions of Dicyclohexylcarbodiimide with Carboxylic Acids in the Presence of Amines and Phenols. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 1020-1023.

Dirksen A., Tilman M., Dawson PE. Nucleophilic catalysis of oxime ligation. *Angew.Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7581-7584.

Dirksen A., Dirksen S., Hackeng TM., Dawson PE. Nucleophilic catalysis of hydrazone formation and transimination: implications for dynamic covalent chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15602-15603.

Dourtoglou V., Gross B., Lambropoulou V., Zioudrou C. O-Benzotriazolyl-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate as coupling reagent for the synthesis of peptides of biological interest. *Synthesis.* **1984**, 7, 572-574.

Dourtoglou V., Ziegler JC., Gross B. L'hexafluorophosphate de O-benzotriazolyl-N,N-tetramethyluronium: Un reactif de couplage peptidique nouveau et efficace. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 1269-1272.

Duléry V., Renaudet O., Dumy P. Ethoxyethylidene protecting group prevents N-overacylation in aminoxy peptide synthesis. *Tetrahedron.* **2007**, 63, 11952-11958.

Dumy P., Eggleston IM., Cervigni S., Sila U., Sun X., Mutter M. A convenient synthesis of cyclic peptides as regioselectively addressable functionalized templates (RAFT). *Tetrahedron lett.*, **1995**, 1255-1258.

Ede NJ., Bray AM. A simple linker for the attachment of aldehydes to the solid phase. Application to solid phase synthesis by the multipin™ method. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7119- 7122.

Englebretsen DR., Garnham BG., Bergman DA., Alewood PF. A novel thioether linker : Chemical synthesis of a HIV-1 protease analogue by thioether ligation. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 8871-8874.

Erlanger BF., Borek F., Beiser SM., Lieberman SJ. Steroid-protein conjugates. I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone. *J. Biol. Chem.* **1957**, 228, 713-727.

**F**ar S., Melnyk O. A novel  $\alpha,\alpha'$ -diaminoacetic acid derivative for the introduction of the  $\alpha$ -oxo aldehyde functionality into peptides. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 1271-1273.

Fehrentz J.A., Paris M., Heitz A., Velek J., Winternitz F., Martinez J. Solid Phase Synthesis of C-Terminal Peptide Aldehydes. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6792-6796.

Fischer PM :Review : Diketopiperazines in Peptide in combinatorial chemistry. *J. Peptide. Sci.* **2003**, 9, 9-35.

Flora D., Mo H., Mayer JP., Khan MA., Yan LZ. Detection and control of aspartimide formation in the synthesis of cyclic peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 1065-1068.

Florent I., Derhy Z., Allary M., Monsigny M., Mayer R., Schrével J. A Plasmodium falciparum aminopeptidase gene belonging to the M1 family of zinc-metallopeptidases is expressed in erythrocytic stages. *Mol Biochem Parasitol.* **1998**, 97, 149-160.

Foillard S., Rasmussen MO., Razkin J., Boturn D., Dumy P. 1-Ethoxyethylidene, a new group for stepwise SPPS of aminooxyacetic acid containing peptides. *J. Org. Chem.* **2008**, 73 (3), 983-991.

Franckel M., Zvilichovsk G., Knobler Y. Amino-oxy-peptides. NO-peptides of aminooxyacetic acid and of canaline. *J. Chem. Soc.* **1964**, 3931-3940.

Fréchet JMJ., Wooley KL., Hawker CJ. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 7638-7647.

Freire T., Vichier-Guerre S., Lo-Man R., Bay S., Leclerc C. Carbohydrate antigens: synthesis aspects and immunological applications in cancer. *Mini. Rev. Med Chem.* **2006**, 6, 1357-1373.

**G**aertner HF., Rose K., Cotton R., Timms D., Camble R., Offord RE. Construction of protein analogues by site-specific condensation of unprotected fragments. *Bioconjugate Chem.*, **1992**, 3, 262-268.

Galeotti N., Plagnes E., Jouin P. Synthesis of Peptidyl Aldehydes from Thiazolidines. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 2459-2462

Gallego RG., Dudziak G., Kragl U., Wandrey C., Kameling JP., Vliegthart JFG. Enzymatic synthesis of the core-2 sialyl lewis X O-glycan on the tumor-associated MUC1a' peptide. *Biochimie.* **2003**, 85, 275-286.

Gea A., Farcy. N., Roqué I., Rossel N., Martins JC., J de Clercq P., Madder A. Solid-supported synthesis of highly functionalized tripodal peptides with flexible but preorganized geometry: towards potential serine protease mimics. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4135-4146.

Gendler SJ., Lancaster CA., Taylor-Papadimitriou J., Duhig T., Peat N., Burchell J., Pemberton L., Lalani EN., Wilson D. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 15286-15293.

Gendler SJ., Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol.* **1995**, 57, 607-634.

Genêt JP., Blart E., Savignac M., Lemeune S., Lemaire-Audoire S., Bernard JM. A general and simple removal of allyloxycarbonyl protecting group by palladium-catalyzed reactions using nitrogen and sulfur nucleophiles. *Synlett.* **1993**, 680-682.

Geoghegan KF., Stroh JG. Site-directed conjugation of non peptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-aminoalcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjugate Chem.* **1992**, 3, 138-146.

Gilbertson SR., Yamada S. A study of catalyst selectivity with polymer bound palladium phosphine complexes on various solid phase synthesis supports. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 3917-3920.

Gilsen HJM., Qiao L., Fitz W., Wong CH. Recent advances in the chemoenzymatic synthesis of carbohydrate mimetics. *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 443-473.

Gimmi CD., Morrison BW., Mainprice BA., Gribben JG., Boussiotis VA., Freeman GJ., Park SY., Watanabe M., Gong J., Hayes DF., Kufe DW., Nadler LM. Breast cancer-associated antigen, DF3/MUC1, induces apoptosis of activated human T cells. *Nat. Med.* **1996**, 2, 1367-1370.

Gomez-Martinez P., Dessolin M., Guibé F., Albericio F. N<sup>α</sup>-Alloc temporary protection in solid-phase peptide synthesis. The use of amine-borane complexes as allyl group scavengers. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* **1999**, 2871-2874.

Gothe R., Seyfarth L., Schumann C., Agricola I., Reissmann S., Lifferth A., Birr C., Pavlovna Filatova M., Kritsky A., Kibirev V. Combination of allyl protection and hycram linker technology for the synthesis of peptides with problematical amino acids and sequences. *J. Prakt. Chem.* **1999**, 341, n°4, 369 – 377.

Greene TW., Wuts PGM. Protecting Groups in Organic synthesis. **1991**. 2<sup>nd</sup> ed; Eds. ;John Wiley & Sons: New York.

Grotli. M., Gotfredsen. CH., Rademann J., Buchardt. J., Clark. AJ., Duus. JO., Meldal. M. Physical properties of poly(ethylene glycol) (PEG)-Based resins for combinatorial solid phase organic chemistry: A comparison for PEG-cross-linked and PEG-grafted resins. *J. Comb. Chem.* **2000**, 2, 108-119.

Guibé F. Review : Allylic protectings groups and their use in a complex environment part II: allylic groups and their removal through catalytic palladium  $\pi$ -allyl methodology *Tetrahedron*. **1998**, 54, 2967-3042.

Garro-Helion F., Merzouk A., Guibé F. Mild and selective palladium (0)-catalyzed deallylation of allylic amines. Allylamine and diallylamine as very convenient ammonia equivalents for the synthesis of primary amines., *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 6109 – 6113.

del Guercio MF., Alexander J., Kubo RT., Arrhenius T., Maewal A., Appella E., Hoffman L., Jones T., Valmori D., Sakaguchi K., Grey HM., Sette. A Potent immunogenic short linear peptide constructs composed of B cell epitopes and Pan DR T helper epitopes (PADRE) for antibody responses in vivo. *Vaccine* **1997**, 15, 441-448.

Gum JR. Human mucin glycoproteins: varied structures predict diverse properties and varied functions. *Biochem. Soc. Transact.* **1995**, 23, 795-799.

Hackeng TM., Griffin JH., Dawson PE. Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, 96, 10068-10073.

Hahn ME., Muir TW. Review : Manipulating proteins with chemistry: a cross-section of chemical biology. *Trends in Biochemical Sciences*. **2005**, vol30, n°1, 26-34.

Han SY., Kim YA. Recent development of peptide and coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron*. **2004**, 60, 2447-2467.

Hang HC., Bertozzi C.R. Chemoselective approaches to glycoprotein assembly. *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 727-736.

Hanisch FG., Stadie TR., Deutzmann F., Peter-Katalinic J. MUC1 glycoforms in breast cancer. Cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation. *Eur. J. Biochem.* **1996**, 236, 318-327.

Hernandez JF., Bersch B., Pétillet Y., Gagnon J., Arlaud GJ. Chemical synthesis and characterization of the epidermal growth factor-like module of human complement protease Clr. *J. Peptide. Res.* 1997, 49, 221-231.

Higaki JN., Chakravarty S., Bryant CM., Cowart LR., Harden P., Scardina JM., Mavunkel B., Luedtke GR., Cordellet B. A combinatorial approach to the identification of dipeptide aldehyde inhibitors of  $\beta$  amyloid production. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3889-3898.

Houghton AN., Lloyd KO. Stuck in the MUC on the long and winding road. *Nat. Med.* **1998**, 4, 270-271.

Hutchinson M., Stedman G. Micellar catalysis of the deamination of O-alkylhydroxylamines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* **1973**, 93-95.

Ingale S., Wolfert MA., Gaedwad J., Buskas T., Boons GJ. Robust immune responses elicited by a fully synthetic three-component vaccine. *Nat. Chem. Biol.* 2007, 3, 663-667.

Jensen KJ., Alsina J., Songster MF., Vagner J., Albericio F., Barany G. Backbone Amide Linker (BAL) strategy for solid-phase synthesis of C-terminal-modified and cyclic peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 5441-5452.

Jiménez-Castells C., G. de la Torre B., Gutiérrez Gallego R., Andreu D. Optimized synthesis of aminoxy-peptides as glycoprobe precursors for surface-based sugar-protein interaction studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, vol17, Issue18, 5155-5158.

Johnson ECB., Durek T., Kent SBH. Total chemical synthesis, folding, and assay of a small protein on a water-compatible solid support. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 3283-3287.

Kadereit D., Deck P., Heinemann I., Waldmann H. Acid-labile protecting groups for the synthesis of lipidated peptides. *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 1184-1193.

Kaiser E., Colecott RL., Bossinger CD., Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, 34, 595-598.

Kanie O., Ito Y., Ogawa T. Orthogonal glycosylation strategy in oligosaccharide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 12073-12074.

Katchalski. E. Poly- $\alpha$ -amino acids. *Adv. Protein Chem.* **1951**, 6, 123-185.

Keil S., Claus C., Dippold W., Kunz H. Towards the Development of Antitumor Vaccines: A Synthetic Conjugate of a Tumor-Associated MUC1 Glycopeptide Antigen and a Tetanus Toxin Epitope. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, 40, 366-369.

Kagan E., Ragupathi G., Yi SS., Reis CA., Gildersleeve J., Kahne D., Clausen H., Danishefsky SJ., Livingston PO. *Cancer Immunol Immunother.* **2005**, 54, 424-430.

Karsten U., Serttas N., Paulsen H., Danielczyk A., Goletz S. Binding patterns of DTR-specific antibodies reveal a glycosylation-conditioned tumour-specific epitope of the epithelial mucin (MUC1). *Glycobiology.* **2004**, 14, 681-692.

King TP., Zhao SW., Lam T. Preparation of protein conjugates via intermolecular hydrazone linkage. *Biochemistry.* **1986**, 25, 5774-5779.

Kochendoerfer GG., Tarck JM., Cressman S. Total chemical synthesis of a 27 kDa TASP protein derived from the Mscl ion channel of *M. tuberculosis* by ketoxime-forming ligation. *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 474-480.

Kochendoerfer GG *et al.* Design and chemical synthesis of a homogeneous polymer-modified erythropoiesis protein. *Science*, **2003**, 299, 884-887.

König. W., Geiger. R. A new method for synthesis of peptides: activation of the carboxyl group with dicyclohexylcarbodiimide using 1-hydroxybenzotriazoles as additives. *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788-798.

Kuduk SD., Schwarz JB., Chen XT., Glunz PW., Sames D., Ragupathi G., Livingston PO., Danishevsky SJ. Synthetic and immunological studies on clustered modes of mucin-related Tn and TF O-linked antigens : The preparation of a glycopeptide-based vaccine for clinical trials against prostate cancer. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 12474-12485.

Kurth M., Pèleguin A., Rose K., Offord RE., Pochon S., Mach JP., Buchegger F. Site-Specific Conjugation of a Radioiodinated Phenethylamine Derivative to a Monoclonal Antibody Results in Increased Radioactivity Localization in Tumor. *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 1255-1261

Lairmore MD., DiGeorge AM., Conrad SF., Trevino AV., Lal RB., Kaumaya PT. Human T-lymphotropic virus type 1 peptides in chimeric and multivalent constructs with promiscuous T-cell epitopes enhance immunogenicity and overcome genetic restriction. *J. Virol.* **1995**, 69, 6077-6089.

Lan MS., Batra SK., Qi WN., Metzgar RS., Hollingsworth MA. Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 15294-15299.

Lang I., Donzé N., Garrouste P., Dumy P., Mutter M. Chemoselective addressable HCAN building blocks in peptide synthesis : L-Homocanaline derivatives. *J. Peptide Sci.* **1998**, 4, 72-80.

Lapatsanis L., Miliadis G., Froussios K., Miltiadis K. Synthesis of *N*-2,2,2-(Trichloroethoxycarbonyl)-L-amino acids and *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-amino acids involving succinimidoxo anion as a leaving group in amino acid protection. *Synthesis.* **1983**, 8, 671-673.

Lee M-r., Lee J., Baek B-h., Shin I. The First solid-phase synthesis of oligomeric  $\alpha$ -aminoxy peptides. *Synlett.* **2003**, 325-328.

- Leffler JE., Bothner-By AA. The reaction of nitrous acid with O-alkylhydroxylamines  
*J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 5473-5475.
- Lelièvre D., Chabane H., Delmas A. Simple and efficient solid-phase synthesis of unprotected peptide aldehyde for peptide segment ligation. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 9675-9678.
- Lelièvre D., Turpin O., El Kazzouli S., Delmas A. Influence of polar support for the synthesis of large C-terminal peptide aldehyde : application to chemoselective ligation. *Tetrahedron.* **2002**, 58, 5525-5533.
- Lemaire-Audoire S., Savignac M., Genêt JP. Selective deprotection of allyl amines using palladium. *Tetrahedron Letters.* **1995**, 36, 8, 1267-1270.
- Leon S., Quarrell R., Lowe G. Evaluation of resins for on-bead screening: a study of papain and chymotrypsin specificity using PEGA-bound combinatorial peptide libraries. *Bioorg Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 2997-3002.
- Leppänen A., Mehtas P., Ouyang YB., Ju T., Helin J., Moores KL., van Die I., Canfield WM., McEver RP., Cummings RD. A novel glycosulfopeptide binds to P-selectin and inhibits leukocyte adhesion to P-selectin. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 24838-24848.
- Liakatos A., Kunz H. Synthetic glycopeptides for the development of cancer vaccines. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2007**, 9, 35-44.
- Ligtenberg MJ., Vos HL, Gennissen AM., Hilkens J. Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 5573-5578.
- Liu CF., Tam JP. Peptide segment ligation strategy without use of protecting groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1994**, 91, 6584-6588.
- Lloyd-Williams P., G Jou., Albericio F., Giralt E. Solid-phase synthesis of peptides using allylic anchoring groups; an investigation of their palladium-catalysed cleavage. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 4207-4210.

Lloyd KO., Burchell J., Kudryashov V., Yin BWT., Taylor-Papadimitriou J. Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 33325-33334.

Loffet. A., Zhang. HX. Allyl-based groups for side-chain protection of amino-acids. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1993**, 42, 346-351.

Lo-Man R., Vichier-Guerre S., Bay S., Dériaud E., Cantacuzène D., Leclerc C.. Anti-tumour immunity provided by a synthetic multiple antigenic glycopeptide displaying a tri-Tn glycotope. *J. Immunol.* **2001**, 166, 2849-2854.

**M**McCaldon P., Argos P. Oligopeptide biases in protein sequences and their use in predicting protein coding regions in nucleotide sequences. *Proteins.* **1988**, 4, 99-122.

Mc Hale D., Green J., Mamalis P. Amino-oxy-derivatives. Part I. Some  $\alpha$ -amino-oxy-acids and  $\alpha$ -amino-oxy-hydrazides. *J. Chem. Soc.* **1960**, 225-238.

Marcaurelle LA., Mizoue LS., Wilken J., Oldham L., Kent SBH., Handel TM., Bertozzi CR. Chemical synthesis of lymphotactin : a glycosylated chemokine with a C-terminal mucin-like domain. *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 1129-1132.

Marcaurelle LA., Bertozzi CR. Direct incorporation of unprotected ketone groups into peptides during solid-phase synthesis : application to the one-step modification of peptides with two different biophysical probes for FRET. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 7279-7282.

Meienhofer J., Waki M., Heimer EP., Lambros TJ., Makofske RC., Chang CD. Solid phase synthesis without repetitive acidolysis. Preparation of leucyl-alanyl-glycyl-valine using 9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids. *Int. J. Peptide. Protein Res.* **1979**, 13, 35-42.

Mathieu MN., Wade JD., Tan YY., Summers RJ., Tregear GW. Novel strategy for the synthesis of template-assembled analogues of rat relaxin. Novel strategy for the synthesis of template-assembled analogues of rat relaxin. *J. Peptide Sci.*, **2000**, 6, 235-242.

Meldal M. PEGA : a flow stable polyethylene glycol dimethylacrylamide copolymer for solid phase synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 3077-3080.

Meldal M., Auzanneau FI., Hindsgaul O., Palcic MM. A PEGA Resin for use in the Solid-phase Chemical-Enzymatic Synthesis of Glycopeptides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 16, 1849-1850.

Meldal M. Properties of solid supports. *Methods Enzymol.*, **1997**, 289, 83-104.

Meldal M., Tornøe CW. Cu-Catalyzed Azide-Alkyne cycloaddition. *Chem Rev.* **2008**, 108, 2952-3015.

Melnyk O., Fehrentz JA., Martinez J., Gras-Masse H. Functionalization of peptides and proteins by aldehydes or keto groups. *Biopolymers (Peptide science)*. **2000**, 55, 165-186.

Melnyk O., Fruchart JS., Grandjean C., Gras-Masse H. Tartric acid-based linker for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide  $\alpha$ -oxo aldehydes. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 4153-4160.

Melnyk O., Bossus M., David D., Rommens C., Gras-Masse H. Synthesis of lipopeptides using hydrazone chemical ligation. *J. Peptide Res.* **1998**, 52, 180-184.

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

Miao Z., Tam JP. Bidirectional tandem pseudoproline ligations of proline-rich helical peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4253-4260.

Mikola H., Hänninen E. Introduction of Aliphatic Amino and Hydroxy Groups to Keto Steroids Using O-Substituted Hydroxylamines. *Bioconjugate Chem.* **1992**, 3, 182-186.

Mitchell AR., Erickson BW., Ryabtsev MN, Hodges RS., Merrifield RB. Tert-butoxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)-phenylacetamidomethyl-resin, a more acid-resistant support for solid-phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 10, 7357-7362.

Miranda LP., Lubell WD., Halkes KM., Groth T., Grotli M., Rademann J., Gotfredsen. CH., Meldal M. SPOCC- 194, a new high functional group density PEG based-resin for solid phase organic chemistry. *J. Comb. Chem.* **2002**, 4, 523-529.

Mitsunobu O. The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products. *Synthesis*. **1981**, 1-28.

Morgan TDB., Stedman G. Kinetics and mechanism of the reaction between nitrous acid and hydroxylamine. Part II. The alkyl hydroxylamines. *J. Chem. Soc. (B) :Phys. Org.* **1968**, 344-349.

Muir TW., Dawson PE., Kent SBH. Protein synthesis by chemical ligation of unprotected peptides in aqueous solution. *Methods Enzymol.* **1997**, 289, 266-298.

Muir TW. A chemical approach to the construction of multimeric protein assemblies. *Structure*. **1995**, 3, 649-652.

Muir TW., Sondhi D., Cole PA. Expressed protein ligation : a general method for protein engineering. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **1998**, 95, 6705-6710.

Mutter M., Vuillemer SA. A chemical approach to protein design. Template assembled synthetic proteins. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1989**, 28,535-554.

**N**ardin EH, Calvo-Calle JM, Oliveira GA, Clavijo P, Nussenzweig R, Simon R, Zeng W, Rose K. Plasmodium falciparum polyoximes: highly immunogenic synthetic vaccines constructed by chemoselective ligation of repeat B-cell epitopes and a universal T-cell epitope of CS protein. *Vaccine*. **1998**, 16, 590-600.

Nardin EH., Calvo-Calle JM., Oliveira GA., Nussenzweig RS., Schneider M., Tiercy JM., Loutan L., Hochstrasser D., Rose K. A totally synthetic polyoxime malaria vaccine containing plasmodium falciparum B cell and universal T cell epitopes elicits immune responses in volunteers of diverse HLA types. *J. Immunol.* **2001**, 166, 481-489.

Narita M., Honda S., Umeyama H., Obana S. The solubility of peptide intermediates in organic solvents. Solubilizing Potential of Hexafluoro-2-propanol. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, 61, 281-284.

Nefzi A., Sun X., Mutter M. Chemoselctive ligation of multifunctional peptides to topological templates via thioether formation for TASP synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 229-230.

Nguyen DL., Seyer R., Heitz A., Castro B. Renin substrates. Part1. Liquid-phase of the equine sequence with benzotriazoloxyltris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP). *J. Chem. Soc.* **1985**, 1025-1031.

Nicolas E., Clemente J., Ferrer T., Albericio F., Giralt E. The Use of the Nbb-Resin for the solid-phase synthesis of peptide alkylesters and alkylamides. Synthesis of Leuprolide. *Tetrahedron.* **1997**, 53, 3179-3194.

Nilsson BL., Kiessling LL., Raines RT. Staudinger ligation : a peptide from thioester and azide. *Org. Lett.* **2000**, 1341-1941.

Nilsson BL., Soellner MB., Raines RT. Chemical synthesis of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, 34, 91-118.

Nishiuchi Y., Inui T., Nishio H., Bodi J., Kimura T., Tsuji Fl., Sakakibara S. Chemical synthesis of the precursor molecule of the Aequorea green fluorescent protein, subsequent folding, and development of fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1998**, 13549-13554.

Offord RE., Gaertner HF., Wells TNC. Proudfoot. A. E. I. Synthesis and evaluation of fluorescent chemokine and evaluation of fluorescent chemokines labelled at the amino terminal. *Methods Enzym.* **1997**, 287, 348-369.

Ouerfelli O., Warren JD., Wilson R.M., Danishefsky SJ. Synthetic carbohydrate-based antitumor vaccines: challenges and opportunities. *Expert Rev. Vaccines.* **2005**, 4, 677-685.

Oxelbark J., Allenmark S. Barriers to stereoinversion of N-Aryl-1,3,2-benzodithiazole1-oxides studied by dynamic enantioselective liquid chromatography. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 1483-1486.

Partidos CD., Steward MW. Prediction and identification of a T cell epitope in the fusion protein of measles virus immunodominant in mice and humans. *J. Gen. Virol.* **1990**, 71, 2099-2105.

Partidos CD., Delmas A. Steward MW Structural requirements for synthetic immunogens to induce measles virus specific CTL responses. *Mol. Immunol.* **1996**, 33, 1223-1229.

Patek M., Lebl. M., Safety-catch anchoring linkage for synthesis of peptide amides by Fmoc/Boc strategy. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 3891-3894.

Pearson DA., Blanchette M., Baker ML., Guindon CA. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking for protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2739-2742.

Piller V., Piller F., Cartron JP. Isolation and characterisation of an N-acetylgalactosamine specific lectin from *Salvia sclarea* seeds. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 14069-14075.

Porchet N., Dufossé J., Degand P., Aubert JP. Les mucines humaines : pourquoi une telle hétérogénéité peptidique ? *Médecine/Sciences.* **1991**; 7, 1024-1030.

**R**ademann J., Grotli M., Meldal M., Bock K. SPOCC: A resin for solid-phase organic chemistry and enzymatic reactions on solid phase. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5459-5466.

Rai R., Aravinda S., Kanagarajadurai K., Raghotama S., Shamala N., Balaram P. *J. Am. Chem. Soc.* Diproline templates as folding nuclei in designed peptides. Conformational analysis of synthetic peptides helices containing amino terminal Pro-Pro segments. **2006**, 128, 7916-7928.

Ramage R., Green J., Blake AJ. An acid labile arginine derivative for peptide synthesis: N<sup>δ</sup>-2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl-L-arginine. *Tetrahedron.* **1991**, 47, 6353-6370.

Rau HK., Haehnel W. Design, Synthesis, and properties of a novel cytochrome b model. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 468-476.

Reddish M., MacLean GD., Koganty RR., Kan-Mitchell J., Jones V., Mitchell MS., Longenecker BM. Anti-MUC1 class I restricted CTLs in metastatic breast cancer patients immunized with a synthetic MUC1 peptide. *Int. J. Cancer.* **1998**, 76, 817-823.

Rivière. P., Declerck V., Martinez J., Lamaty F. 2-(Trimethylsilyl)ethanesulfonyl or (SES) group in amine protection and activation. *Chem Rev.* **2006**, 106, 2249-2269.

Richardson A.Jr. Aminoxyacetic acid derivatives. *J. Med. Chem.* **1964**, 7, 824-826.

Rose K. Facile synthesis of homogeneous artificial protein. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 30-33.

Rose K., Zeng W., Brown LE., Jackson DC. A synthetic peptide-based polyoxime vaccine construct of high purity and activity. *Mol. Immunol.* **1995**, 32, 1031-1037.

Rose K., Zeng W., Regamey PO., Chernushevich IV., Standing KG., Gaertner HF. Natural peptides as building blocks for the synthesis of large protein-like molecules with hydrazone and oxime linkage. *Bioconjugate Chem.* **1996**, 7, 552-556.

Rose K. et al. New cyclisation reaction at the amino terminus of peptides and proteins. *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, 1038-1043.

Rostovtsev VV., Green LG., Fokin VV., Sharpless BK. A Stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective ligation of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int; Ed.* **2002**, 41, 2596-2599.

**S**arrubi E., Seneci PF., Angelastro MR. Peptides aldehyde as inhibitors of HIV-protease. *FEBS Lett.* **1992**, 319, 253-256.

Saxon E., Armstrong JI., Bertozzi CR. A « traceless » Staudinger ligation for the chemoselective synthesis of amide bonds. *Org. Lett.* **2000**, 2141-2143.

Sayer JM., Pinsky B., Schonbrunn A., Washtien W. Mechanism of carbinolamine formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 7998-8009.

**S**chnölzer M., Alewood P., Jones A., Alewood D., Kent SBH. In situ neutralization in Boc-chemistry solid-phase peptide synthesis. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1992**, 40, 180-193.

Schumann C., Seyfarth L., Greiner G., Paegelow I., Reissman S. Synthesis and biological activities of new side chain and backbone cyclic bradykinin analogues. *J. Peptide Res.* **2002**, 60, 128-140.

Schumann C., Seyfarth L., Greiner G., Reissman S. Synthesis of different types of dipeptide building units containing N- or C-terminal arginine for the assembly of backbone cyclic peptides. *J. Peptide Res.* **2000**, 55, 428-435.

Shao J., Tam JP. Unprotected peptides as building blocks for the synthesis of peptide dendrimer with oxime, hydrazone and thiazolidine. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3893-3899.

Sheppard RC., Williams BJ. Acid-labile resin linkage agents for use in solid phase peptide synthesis. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1982**, 20, 451-454.

Shirai M., Chen M., Arichi T., Masaki T., Nishioka M., Newman M., Nakazawa T., Feinstone SM., Berzofsky JA. Use of intrinsic and extrinsic helper epitopes for in vivo induction of anti-hepatitis C virus cytotoxic T lymphocytes (CTL) with CTL epitope peptide vaccines. *J. Infect. Dis.* **1996**, 173, 24-31.

Sieber P., Riniker B. Protection of histidine in peptide synthesis: A Reassessment of the trityl group. *Tetrahedron Letters.* **1987**, 28, 6031-6034.

Sonogashira K., Tohda Y., Hagihara N. A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines. *Tetrahedron Letters.* **1975**, 4467-4470.

Sorensen AL., Reis CA., Tarp MA., Mandel U., Ramachandran K., Sankaranarayanan V., Schwientek T., Graham R., Taylor-Papadimitriou J., Hollingsworth MA., Burchell J., Clausen. H. Chemoenzymatically synthesized multimeric Tn/STn MUC1 glycopeptides elicit cancer-specific anti-MUC1 antibody responses and override tolerance. *Glycobiology.* **2006**, vol16, n°2, 96-107.

Spetzler JC., Hoeg-Jensen T. Preparation of O-amino-serine, Ams, a new building block in chemoselective ligation chemistry. *J. Peptide Sci.* **1999**, 5, 582-592.

Spetzler JC., Hoeg-Jensen T. A new amino acid derivative with a masked side-chain aldehyde and its use in peptide synthesis and chemoselective ligation. *J. Peptide. Sci.* **2001**, 537-551.

Spetzler JC., Hoeg-Jensen T. Masked side-chain aldehyde amino acids for solid-phase synthesis and ligation. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 2303-2306.

Spinelli N., Edupuganti OP., Defrancq E., Dumy P. New solid support for the synthesis of 3'-oligonucleotide conjugates through glyoxylic oxime bond formation. *Org. Lett.* **2007**, vol9, N°2, 219-222.

Springer GF. T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science.* **1984**, 224, 1198-1206

Stewart DE., Sarkar A., Wampler JE. Occurrence and role of *cis* peptide bonds in protein structures. *J. Mol. Biol.* **1990**, 214, 253-260.

**T**am JP. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1988**, 85, 5409-5413.

Tam JP. Lu YA. Vaccine engineering: enhancement of immunogenicity of synthetic peptide vaccines related to hepatitis in chemically defined models consisting of T- and B-cell epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1989**, 86, 9084-9088.

Tam JP., Spetzler JC. Chemoselective approaches to the preparation of peptide dendrimers and branched artificial proteins using unprotected peptides as building blocks. *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids.* **1995**, 1, 123-132.

Tam JP., Spetzler JC. Multiple antigen peptide system. *Methods Enzymol.* **1997**, 289, 612-637.

Tam JP., Miao Z. Stereospecific pseudo-proline ligation of N-terminal serine, threonine, or cysteine-containing unprotected peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9013-9022.

Tanaka S., Saburi H., Murase T., Yoshimura M., Kitamura M. Catalytic removal of N-allyloxycarbonyl groups using the [CpRu-(IV)( $\pi$ -C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>)(2-quinolinecarboxylato)]PF<sub>6</sub> complex. A new efficient deprotecting method in peptide synthesis. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 4682-4684.

Thieriet N., Alsina J., Giralt E., Guibé F., Albericio F. Use of Alloc-amino acids in solid-phase peptide synthesis. Tandem deprotection-coupling reactions using neutral conditions. *Tetrahedron Letters*. **1997**, vol38, n°41, 7275-7278.

Tomalia DA., Durst HD. Genealogically directed synthesis: Starburst/cascade dendrimers and hyperbranched structures. *Top. Curr. Chem.* **1993**, 165, 193-313.

Torbeev VY., Kent SBH. Convergent chemical synthesis and crystal structure of a 203 amino acid "covalent dimmer" HIV-1 protease enzyme molecule. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1667-1670.

Tornøe CW., Christensen. C., Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-Dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.

Trost BM., Weber L., Strege PE., Fullerton TJ., Dietsche TJ. Allylic alkylation : nucleophilic attack on  $\pi$ -allylpalladium complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 3416-3426.

Tsuji J., Takahashi H., Morikawa M. Organic syntheses by means of noble metal compounds XVII. Reaction of  $\pi$ -allylpalladium chloride with nucleophiles. *Tetrahedron Lett.* **1965**, 49, 4387-4388.

**U**ttenweiler-Joseph S., Moniatte M., Lambert J., Van Dorsselaer A., Bulet P. A matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry approach to identify the origin of the glycan heterogeneity of diptericin, an O-glycosylated antibacterial peptide from insects. *Anal. Biochem.* **1997**, 247, 366-375.

**V**aliyaveetil FI., Sekedat M., Muir TW., MacKinnon R. Semisynthesis of a functional K<sup>+</sup> channel. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 2504-2507.

Vanderesse. R., Thevenet. L., Marraud. M., Boggetto N., Reboud M., Corbier C.  $\alpha$ -Aminoxy acids as building blocks for the oxime and hydroxylamine pseudopeptide links. Application to the synthesis of human elastase inhibitors. *J. Peptide Sci.* **2003**, 9:282-299.

Veber DF., Milkowski JD., Varga SL., Denkwalter RG., Hirschmann R. Acetamidomethyl. A novel thiol protecting group for cysteine. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 5456-5461.

Villain M., Vizzavona. J., Rose. K. Covalent capture: a new tool for the purification of synthetic and recombinant polypeptides. *Chemistry and Biology.* **2001**, 8, 673.

Vojkovsky T. Detection of secondary amines on solid phase. *Pept. Res.* **1995**, 8, 236-237.

**W**ahl F., Mutter M. Analogues of oxytocin with an oxime bridge using chemoselectively addressable building blocks. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6861-6864.

Walker MA. Protein Synthesis by Chemical Ligation of Unprotected Peptides in Aqueous solution. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1069-1071.

Wandall HH., Hassan H., Mirgorodskaya E., Kristensen AK., Roepstorff P., Bennett EP., Nielsen PA., Hollingsworth MA., Burchell J., Taylor-Papadimitriou J., Clausen H. Substrate specificities of three members of the human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, GalNAc-T1, -T2 and T3. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 23503-23514.

Webb RR., Kaneko T. Synthesis of 1-(Aminoxy)-4-[(3-nitro-2-pyridyl)dithio]butane and 1-(Aminoxy)-4-[(3-nitro-2-pyridyl)dithio]but-2-ene, Novel Heterobifunctional Cross-Linking Reagents. *Bioconjugate Chem.* **1990**, 1, 96-99.

Wender PA., Jessop TC., Pattabiraman K., Pelkey E T., VanDeusen CL. An efficient scalable synthesis of the molecular transporter octaarginine via a segment doubling strategy. *Org. Lett.* **2001**, 3, 21, 3229-3232.

Werner A. a) Ueber hydroxyamineessigsäure und derivate derselben. *Ber. Dtch. Chem. Ges.* 1893, 26: 1567-1571; b) Werner A., Sonnefeld E.. Ueber hydroxyamineessigsäure und  $\alpha$ -hydroxylaminpropionsäure. *Ber. Dtch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 3350-3363.

Wetlaufer DB. Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. In *Advances in protein chemistry* N°17; ed. Anfinsen CB.; Anson ML.; Bailey K.; Edsall JT.; London : Academic Press. **1962** ; p: 303-390.

Wöhr T *et al.* Pseudo-prolines as a solubilizing structure-disrupting protection technique in peptide synthesis., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 9218-9227.

Wilken J., Kent. SBH. Chemical protein synthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998.**, 9, 412-426.

Wreschner DH., Hareuveni M., Tsarfaty I., Smorodinsky N., Horev J., Zaretsky J., Kotkes P., Weiss M., Larhe R., Dion A., Keydar I. Human epithelial tumor antigen cDNA sequences : Differential splicing may generate multiple protein forms. *Eur. J. Biochem.* **1990**, 189, 463-473.

**Z**ajac AJ., Murali-Krishna K., Blattman JN., Ahmed R. Therapeutic vaccination against chronic viral infection: the importance of cooperation between CD4+ and CD8+ T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **1998**, 10, 444-449.

Zeng. F., Zimmerman. C. Rapid synthesis of dendrimers by an orthogonal coupling strategy. **1996**, 118, 5326-5327.

Zhang L., Torgerson TR., Liu XY., Timmons S., Colosia D., Hawiger J., Tam J.P. Preparation of functionally active cell-permeable peptides by single-step ligation of two peptide modules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, 95, 9184-9189.

Zheng W., Jackson DC., Murray J., Rose K., Brown LE. Totally synthetic lipid-containing polyoxime peptide constructs are potent immunogens. *Vaccine*. **2000**, 1031-1039.

## **ANNEXES**

**ANNEXE 1**

**Controlling the outcome of overacylation of N-protected aminoxyacetic acid  
during the synthesis of an aminoxy-peptide for chemical ligation.**

**Decostaire I., Lelièvre D., Zhang H., Delmas A.**

**Tetrahedron Lett.**

**2006**

**7057-7060**

## Controlling the outcome of overacylation of N-protected aminoxyacetic acid during the synthesis of an aminoxy-peptide for chemical ligation

Isidore P. Decostaire, Dominique Lelièvre, Haihui Zhang and Agnès F. Delmas\*

*Centre de biophysique moléculaire, UPR 4301 CNRS,<sup>†</sup> rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, France*

Received 16 June 2006; revised 18 July 2006; accepted 20 July 2006

Available online 14 August 2006

**Abstract**—An aminoxy-containing peptide, the nucleophile partner for oxime ligations, is usually grafted on a NH<sub>2</sub>-peptide resin by activating a protected aminoxyacetic acid as an active ester. Here, we have shown that its subsequent coupling to NH<sub>2</sub>-peptide resin competes with the overacylation of the –NH–O– nitrogen and that the overacylation level increases with the basicity of the reaction mixture. Moreover, we found that overacylation is prevented when the COOH of the Aoa-derivatives is engaged in an amide bond.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Oxime ether chemistry has recently attracted attention as a convenient approach to the rapid formation of combinatorial libraries,<sup>1</sup> as well as to the chemoselective ligation of protein-like polypeptides as developed by Rose.<sup>2</sup> The oxime bond is generated by an addition–elimination between an electrophile carbonyl-containing compound such as aldehyde or ketone and an aminoxy nucleophile.<sup>3</sup> In chemical peptide and protein syntheses, the oximation reaction is chemoselective as aminoxy derivatives are weak bases although they are reactive nucleophiles toward carbonyl groups due to the  $\alpha$ -effect of the neighboring heteroatom. The reaction proceeds under mild acidic conditions<sup>4</sup> at which the basic side chain of lysine, arginine and  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> are protonated.

**Abbreviations:** Alloc, allyloxycarbonyl; Aoa, aminoxyacetic acid; DCC, *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide; DIEA, *N,N*-diisopropylethylamine; DMAP, 4-dimethylaminopyridine; Fmoc, 9-fluorenylmethoxycarbonyl; HATU, 2-(1*H*-7-azabenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate; HBTU, 2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate; HCTU, 5-chloro-2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate; HOAt, hydroxy-7-azabenzotriazole; HOBT, 1-hydroxybenzotriazole; Cl-HOBT, 6-chloro-1-hydroxybenzotriazole; TFA, trifluoroacetic acid; TIS, triisopropylsilane.

**Keywords:** Aminoxy group; Overacylation; Coupling reagent; Peptide synthesis; Chemoselective ligation.

<sup>†</sup>Affiliated with the University of Orléans and INSERM.

\* Corresponding author. Tel.: +33 2 38 25 55 77; fax: +33 2 38 63 15 17; e-mail: [delmas@cns-orleans.fr](mailto:delmas@cns-orleans.fr)

The oximation reaction has proven to be very efficient for the synthesis of compounds such as the following: polypeptides,<sup>5</sup> multimer compound for receptor targeting,<sup>6</sup> or vaccine design,<sup>7</sup> cyclic peptides,<sup>8</sup> glycopeptides,<sup>9</sup> and oligonucleotide–peptide conjugates.<sup>10</sup> It is also efficient for grafting a probe to microarray,<sup>11</sup> and for introducing a prosthetic group to a peptide.<sup>12</sup> Oximes are stable in a wide range around the physiological pH.<sup>13</sup> As the formation of oxime bonds in chemoselective ligation procedures has become a most efficient tool, the insertion of appropriate functionalities in each partner has been steadily growing. The introduction of an aldehyde and a ketone group has recently been reviewed.<sup>14</sup> The introduction of an aminoxy group is usually carried out using the commercially available *N*-Boc protected aminoxy acetic acid<sup>15</sup> (Aoa) and a few syntheses of a modified amino acid bearing an aminoxy group on its side chain.<sup>16</sup> However, side reactions such as overacylation may occur on the –NH–O– nitrogen leading to an Aoa(Aoa)-peptide as a by-product.<sup>8a,17</sup> The use of diprotected Aoa derivatives such as *N,N*-di-Boc protected Aoa (Boc<sub>2</sub>-Aoa-OH)<sup>17</sup> and phthaloyl protected Aoa<sup>18</sup> prevents overacylation from occurring. Moreover, the use of a hindered and nonelectron withdrawing group such as trityl (Trt)<sup>8a</sup> versus an electron withdrawing group such as carbamate (Boc) as *N*-Aoa protecting group is also useful to prevent overacylation. Throughout these reports, the coupling step was performed using various coupling reagents.

Reasoning that the  $\alpha$ -effect of the oxygen atom not only affects the nucleophile but also the basic character of the neighboring amino-group with an increase in its acid character, we envisioned that the basic conditions during the coupling step would enhance the overacylation process. This hypothesis was considered using an Aoa derivative protected with a nonhindered withdrawing group such as allyloxycarbonyl (Aloc) by which overacylation should be maximized. To introduce Aloc-Aoa-OH, protocols were carried out using several coupling agents under different conditions such as concentration, reaction time, and presence of base.

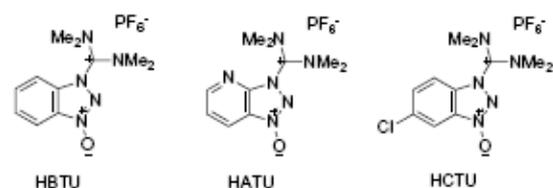
Aloc-Aoa-OH<sup>19</sup> was coupled to the  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> of the peptide resin resulting from the elongation of the model peptide AGAG using a Wang resin and the Fmoc/*t*-Bu strategy (Table 1). The peptide was released with TFA, H<sub>2</sub>O, 95/5. After TFA evaporation under vacuum, the peptide was solubilized in H<sub>2</sub>O (1 mg/ml) and analyzed by HPLC and mass spectrometry. The purity of crude peptides was estimated by integration of the HPLC profiles.

Using HBTU<sup>20</sup> (4 equiv) as coupling reagent with DIEA (10 equiv), that is, a 2.5-fold excess of base, the introduction of Aloc-Aoa-OH led to a quantitative acylation over 30 min but with 40% of the overacylated form (Table 1, entry 1). With a lower excess of DIEA (1.25-fold), the overacylated form was only 24% (Table 1, entry 2). To further demonstrate the effect of the base, HBTU was used with the hindered base collidine (2,4,6-trimethylpyridine, p*K*<sub>a</sub> 7.4), a weaker base than DIEA (p*K*<sub>a</sub> 10.1). Whatever the excess of collidine used, the formation of the overacylated product was prevented (Table 1, entries 3 and 4). However, the acylation reaction was less effective than when DIEA was used (Table 1, entries 4 vs 1 and entries 3 vs 2). This observation is in agreement with the aminium/uronium salt activation of a hindered amino acid, which is optimal in the presence of DIEA versus collidine.<sup>21</sup>

In order to determine when overacylation occurs, that is, on the Aoa derivative in solution or on the Aoa derivative already grafted to the peptide resin, a double coupling was performed (Table 1, entry 5). No increase in the overacylation level was observed under these conditions. This suggests that the acylation of NH<sub>2</sub>-peptide resin competes with the acylation of -NH-O- of the

Aoa-derivative. In other words, the overacylated compound Aloc-Aoa(Aloc-Aoa)-OBt must be first formed in solution and then transferred on the H<sub>2</sub>N-peptide resin before acylation is completed. Despite the well-known lability of OBt esters, we were pleased to characterize Aloc-Aoa(Aloc-Aoa)-OBt in the activation mixture (see Supplementary data). Consequently, the nucleophilicity of the nitrogen of the Aloc-Aoa-OH species changes and depends on the bond in which the carbonyl is engaged, the amide bond preventing the overacylation to occur. This might explain why the overacylation process has not been observed with amino acids that bear the oxyamine on the side chain.<sup>16</sup> During the activation of the COOH, the proton of the -NH-O- of the Aoa derivative becomes more labile, to the point of being abstracted by increasing the basicity of the reaction mixture. Hence, two ways can be pursued to reduce the overacylation process, that is, driving the coupling reaction as rapidly as possible to the formation of the Aloc-Aoa-peptide resin and/or diminishing the efficient basicity of the reaction mixture.

To increase the rate of the coupling reaction, HATU,<sup>22</sup> the more powerful aminium/uronium-based coupling reagent, was used to activate Aloc-Aoa-OH as well as the new HCTU<sup>23</sup> (Scheme 1, Table 2) whose HOBt-derivative moiety is as acidic as that of HATU (p*K*<sub>a</sub>: 3.28 and 3.35 for HOAt and Cl-HOBt, respectively, vs 4.60 for HOBt). The use of HCTU led to 35% of the overacylation level (Table 2, entry 1) whereas the use of HATU led to 19% (Table 2, entry 2). This indicates that the neighboring group effect of the N of the pyridine ring of OAt active ester<sup>22</sup> does intervene in the coupling reaction affording more rapidly the amide form to the detriment of Aloc-Aoa(Aloc-Aoa)-OBt. Best results were obtained with HATU and a 1.25-fold excess of collidine, conditions under which no overacylation



Scheme 1.

Table 1. Acylation of N-terminal-amine of H-AGAG-Wang-resin with Aloc-Aoa-OH using HBTU as coupling reagent

	Aloc-Aoa-OH	Coupling reagent	Base	Time (min)	H <sub>2</sub> N~ (%) <sup>a</sup>	Aloc-Aoa-NH~ (%) <sup>a</sup>	Aloc-Aoa(Aloc-Aoa)-NH~ (%) <sup>a</sup>
<i>Single coupling</i>							
1	4 equiv	HBTU 4 equiv	DIEA 10 equiv	30	0	60	40
2	4 equiv	HBTU 4 equiv	DIEA 5 equiv	30	5	71	24
3	4 equiv	HBTU 4 equiv	Collidine 5 equiv	30	17	83	0
4	4 equiv	HBTU 4 equiv	Collidine 10 equiv	30	6	94	0
<i>Double coupling</i>							
5	4 equiv	HBTU 4 equiv	DIEA 10 equiv	30	0	58	42
	+4 equiv	+HBTU 4 equiv	+DIEA 10 equiv	30	0	60	40

<sup>a</sup> Estimated by integration of the HPLC peaks at 214 nm.

Table 2. Acylation of N-terminal amine of *H*-AGAG-Wang-resin with Aloc-Aoa-OH using HATU and HCTU as coupling reagents

	Aloc-Aoa-OH	Coupling reagent	Base	Time (min)	H <sub>2</sub> N <sup>ac</sup> (%) <sup>a</sup>	Aloc-Aoa-NH <sup>ac</sup> (%) <sup>a</sup>	Aloc-Aoa(Aloc-Aoa)-NH <sup>ac</sup> (%) <sup>a</sup>
1	4 equiv	HCTU 4 equiv	DIEA 10 equiv	30	0	65	35
2	4 equiv	HATU 4 equiv	DIEA 10 equiv	30	0	81	19
3	4 equiv	HATU 4 equiv	Collidine 5 equiv	30	4	96	0
4	4 equiv	HATU 4 equiv	Collidine 10 equiv	30	5	95	0
5	4 equiv	HATU 4 equiv	Collidine 5 equiv	60	3	97	0

<sup>a</sup>Estimated by integration of the HPLC peaks at 214 nm.

Table 3. Acylation of N-terminal amine of *H*-AGAG-Wang-resin with Aloc-Aoa-OH using a carbodiimide as coupling reagent

	Aloc-Aoa-OH	Coupling reagent	Time (min)	H <sub>2</sub> N <sup>ac</sup> (%) <sup>a</sup>	Aloc-Aoa-NH <sup>ac</sup> (%) <sup>a</sup>	Aloc-Aoa(Aloc-Aoa)-NH <sup>ac</sup> (%) <sup>a</sup>
<i>Single coupling</i>						
1	5 equiv	DCC/HOBt 5 equiv	60	24	73	3
2	5 equiv	DCC/HOBt 5 equiv	120	2	94	4
3	5 equiv	DCC/HOBt 5 equiv	150	1	94	5
4	4 equiv	DCC/HOBt 4 equiv	120	4	96	0
5	10 equiv	DCC/HOBt 10 equiv	120	2	94	4
<i>Double coupling</i>						
6	5 equiv	DCC/HOBt 5 equiv	60	24	73	3
	+3 equiv	+DCC/HOBt 3 equiv	+60	4	93	3

<sup>a</sup>Estimated by integration of the HPLC peaks at 214 nm.

was observed and only 4% of the nonacylated form (Table 2, entry 3). This incomplete acylation is quite acceptable since the acylation yield was good and no by-product could react with an aldehyde-containing peptide during the oximation reaction. No overacylation was observed even when a 2.5-fold excess of collidine or an increased reaction time was used (Table 2, entries 4 and 5).

Since the reactivity of –NH–O– toward overacylation increases as the basicity of the amine added to the aminium/uronium coupling reagent increases, it would be interesting to activate Aloc-Aoa-OH with dicyclohexylcarbodiimide (DCC), a coupling reagent, which does not require the presence of an additional tertiary base to activate the carboxylic acid.<sup>24</sup> In this work, DCC was combined with HOBt,<sup>25</sup> an acidic nucleophile additive (Table 3). Provided that the reaction time and the equivalents of the coupling reagent were optimized, acylation was very efficient with a minimal level of overacylation. The best compromise was obtained using 4 equiv of DCC/HOBt over 120 min (Table 3, entry 4), which afforded no significant overacylated peptide (<1%) and less than 5% of the nonacylated peptide.

In summary, the conditions for coupling Aoa-derivatives were investigated in order to avoid overacylation of the NH–O group. We found that overacylation is prevented when the COOH of Aoa-derivatives is engaged in an amide bond. Coupling of aminooxyacetic acid protected with a nonhindered carbamate-based group is effective without the overacylation side reaction when using dicyclohexylcarbodiimide as the coupling reagent and HOBt as an acidic additive. Overacylation, favored by the use of uronium/aminium coupling reagents in the presence of DIEA, can be completely circumvented

using a weaker base such as collidine. These data highlight the relationship between basic properties of the reaction mixture and the overacylation process of the *N*-Aloc protected aminooxyacetic acid.

#### Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Ligue Nationale contre le cancer (section Centre). We are also grateful to Dr. Corinne Buré and Mr. Rémi Puppo for recording most of the MS spectra.

#### Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.tetlet.2006.07.092.

#### References and notes

- (a) Nazarpak-Kandlousy, N.; Nelen, M. I.; Goral, V.; Eliseev, A. V. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 59–65; (b) Renaudet, O.; Reymond, J. L. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4693–4696.
- Rose, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30–33.
- Jencks, W. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475–480.
- Sayer, J. M.; Pinsky, B.; Schonbrunn, A.; Washtien, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 7998–8009.
- Canne, L. E.; Ferré d'Amaré, A. R.; Burley, S. K.; Kent, S. B. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2998–3007.
- (a) Thumshirn, G.; Hersel, U.; Goodman, S. L.; Kessler, H. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2717–2725; (b) Boturnyn, D.; Coll, J. L.; Garanger, E.; Favrot, M. C.; Dumy, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5730–5739.

7. (a) Nardin, E. H.; Calvo-Calle, J. M.; Oliveira, G. A.; Nussenzweig, R. S.; Schneider, M.; Tiercy, J. M.; Loutan, L.; Hochstrasser, D.; Rose, K. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 481–489; (b) Cremer, G. A.; Bureau, N.; Lelièvre, D.; Piller, V.; Piller, F.; Delmas, A. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 6353–6360.
8. (a) Wahl, F.; Mutter, M. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6861–6864; (b) Roberts, K. D.; Lambert, J. N.; Ede, N. J.; Bray, A. M. *J. Pept. Sci.* **2004**, *10*, 659–665.
9. Hang, H. C.; Bertozzi, C. R. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 727–736.
10. Zatspein, T. S.; Stetsenko, D. A.; Gait, M. J.; Oretskaya, T. S. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 471–489.
11. Salisbury, C. M.; Maly, D. J.; Ellman, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14868–14870.
12. Marcaurelle, L. A.; Bertozzi, C. R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7279–7282.
13. (a) Shao, J.; Tam, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3893–3899; (b) Rose, K.; Zeng, W.; Regamey, P. O.; Chernushevich, I. V.; Standing, K. G.; Gaertner, H. F. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 552–556.
14. Melnyk, O.; Fehrentz, J. A.; Martinez, J.; Gras-Masse, H. *Biopolymers* **2000**, *55*, 165–186.
15. Offord, R. E.; Gaertner, H. F.; Wells, T. N.; Proudfoot, A. E. *Methods Enzymol.* **1997**, *287*, 348–369.
16. (a) Lang, I.; Donzé, N.; Garrouste, P.; Dumy, P.; Mutter, M. *J. Pept. Sci.* **1998**, *4*, 72–80; (b) Spetzler, J. C.; Hoeg-Jensen, T. *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 582–592.
17. Brask, J.; Jensen, K. J. *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 290–299.
18. (a) Yang, D.; Li, B.; Ng, F.-F.; Yan, Y.-L.; Qu, J.; Wu, Y.-D. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7303–7312; (b) Leu, M.-R.; Lee, J.; Back, B.-H.; Shin, I. *Synlett* **2003**, *3*, 325–328.
19. To a stirred solution of Aoa (2 g, 18.3 mmol) in 0.85 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (43 ml) at 0 °C was added AllocOSu (3.09 g, 15.5 mmol) in DMF (100 ml) in one portion. Mixing was continued at room temperature for 30 min. H<sub>2</sub>O was added until dissolution of the precipitate. The solution was then extracted with diethylether (3×) and ethyl acetate (3×). The aqueous phase was cooled, acidified at pH 2 with 5% citric acid and extracted with ethyl acetate (3×). This organic phase was washed with brine (3×), H<sub>2</sub>O (3×), dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and evaporated to dryness. TLC (silica gel, CHCl<sub>3</sub>/EtOH/AcOH 85:10:5, rf 0.5). The residue was purified by semi-preparative HPLC. Overall yield: 55%. Analytical HPLC (column C18, 300 Å, 4.6 × 250) Tr = 13.2 min (3–30% B in 30 min with A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA and B = MeCN/0.1% TFA) NMR DMSO-*d*<sub>6</sub>: δ (ppm): 12.85 (s, 1H, COOH); 10.55 (s, 1H, CO-NH-O); 5.9 (m, 1H, H<sub>2</sub>C=CH-CH<sub>2</sub>); 5.2–5.3 (dd, 2H, *J*<sub>trans</sub> = 17.22 Hz, <sup>2</sup>*J* = 1.5 Hz, *J*<sub>cis</sub> = 10.49 Hz; H<sub>2</sub>C=CH-CH<sub>2</sub>-O); 4.55 (d, 2H, *J* = 5.35 Hz, H<sub>2</sub>C=CH-CH<sub>2</sub>-O); 4.3 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-COOH). ESI, MH<sup>+</sup>: 176.0, calcd for C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>N<sub>5</sub> 176.14.
20. Dourtougkou, V.; Gross, B.; Lambropoulou, V.; Zioudrou, C. *Synthesis* **1984**, *7*, 572–574.
21. Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678–9683.
22. Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397–4398.
23. (a) Israeli Patent Application No: IL141804; (b) Marder, O.; Shvo, Y.; Albericio, F. *Chim. Oggi* **2002**, *20*, 37–41.
24. DeTar, D. F.; Silverstein, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 1020–1023.
25. König, W.; Geiger, R. *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788–798.

**ANNEXE 2**

**Synergic effect of hydride and proton donors  
in the Pd(0)-mediated deprotection of *N*<sup>ε</sup>-Aloc proline derivatives.**

**Decostaire I., Lelièvre D., Aucagne V., Delmas A.**

**Tetrahedron Lett.**

**2007**

**6523-6526**

## Synergic effect of hydride and proton donors in the Pd(0)-mediated deprotection of $N^\alpha$ -Aloc proline derivatives

Isidore P. Decostaire, Dominique Lelièvre, Vincent Aucagne and Agnès F. Delmas\*

Centre de Biophysique Moléculaire, UPR 4301 CNRS<sup>†</sup>, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 2, France

Received 25 April 2007; revised 5 July 2007; accepted 9 July 2007

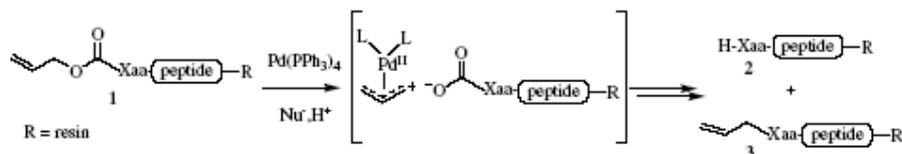
Available online 13 July 2007

**Abstract**—In this study, the challenging Pd(0)-catalyzed  $N^\alpha$ -Aloc removal from a proline residue using  $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{BH}_3$  or  $\text{PhSiH}_3$  as allyl scavengers has been investigated. Standard conditions led to a large amount of an allylamine byproduct. A careful study of the reactions allowed us to design the optimal conditions for the quick and quantitative formation of the desired product, while taking advantage of a synergic effect between hydride and proton donors.  
© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The solid phase technique has revolutionized peptide synthesis. Ever since the pioneering work of Merrifield, polymer supports,<sup>1</sup> protecting groups<sup>2</sup> and coupling reagents<sup>3</sup> have become the subject of considerable interest as they enable the routine synthesis of peptides.<sup>4</sup> The Fmoc strategy<sup>5</sup> is now widely used thanks to a large variety of piperidine-stable, acid-labile side-chain protecting groups<sup>2</sup> and to the convenient trifluoroacetic acid (TFA) treatment to release the deprotected peptide from the resin. Use of allylic protecting groups<sup>6</sup> is a popular strategy to induce a third dimension in the protection scheme, which allows the synthesis of branched or cyclic peptides and glycopeptides. Allyloxycarbonyl (Aloc) derivatives of amines, and to a lesser extent alcohols, and allyl (All) esters, aryl ethers and glycosides are the most classic examples. The deprotection step usually

involves a Tsuji–Trost reaction using a combination of a soluble Pd(0) catalyst with a nucleophile or hydride donor acting as a scavenger.<sup>6</sup> The choice of an appropriate allyl scavenger is clearly a key factor in establishing reliable procedures. The hydride donor  $\text{PhSiH}_3$ <sup>7</sup> is reportedly an excellent and user-friendly scavenger when used in conjunction with  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  for the removal of allyl ester and allyl carbamate groups, and has become very popular, especially in peptide chemistry.<sup>8</sup>

Formation of an allylamine such as 3 (Scheme 1) is one of the most troublesome side reactions occurring during  $N$ -Aloc removal,<sup>6</sup> in particular when the carbamate is installed on secondary amines.<sup>9</sup> Allylamines have themselves been reported to be deallylated by  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  in the presence of a pronucleophilic acidic species such as



Scheme 1.

**Keywords:** Aloc; Alloc; Allylamine; Proline protection; Solid phase peptide synthesis.

**Abbreviations:** Aloc, allyloxycarbonyl; PAM, phenylacetamidomethyl; PEGA, polyethylglycol polyacrylamide; Pbf, 2,2,4,6,7-pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl; TFA, trifluoroacetic acid.

\* Corresponding author. Tel.: +33 2 38 25 55 77; fax: +33 2 38 63 15 17; e-mail: delmas@cnrs-orleans.fr

<sup>†</sup> Affiliated with the University of Orléans and INSERM.

0040-4039/\$ - see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.tetlet.2007.07.061

Kunz's *N,N'* dimethylbarbituric acid (NDMBA)<sup>10</sup> and Genêt's thiosalicylic acid (TSA).<sup>11</sup> It is believed that the allylamine needs to be protonated to generate a  $\pi$ -allyl palladium complex necessary for an effective deprotection.<sup>10b,11b</sup> NDMBA and TSA have also been shown to smoothly deprotect *N*-Aloc acyclic secondary amines,<sup>12</sup> probably through concomitant formation of both allylamine 3 and secondary amine 2 and conversion of the former species to the latter one. However, though TSA worked well in the removal of *N*<sup>α</sup>-Aloc from cyclic secondary amine in solution,<sup>11a</sup> NDMBA was shown to be ineffective in removing *N*<sup>α</sup>-Aloc from solid-supported ones.<sup>13</sup> Moreover, one drawback in the reactions involving the pronucleophilic species is their slow kinetics compared to reactions involving tin, boron or silicon hydrides.<sup>12</sup> We considered the possibility of designing fast and clean deprotection conditions using standard hydride donors such as PhSiH<sub>3</sub>.<sup>7</sup> To address this question, we chose a challenging case in which an Aloc was installed on a supported cyclic secondary amine, which is more nucleophilic than an acyclic one, hence more prone to form allylamine. To explore the Aloc removal from a terminal *N*<sup>α</sup>-Aloc-proline peptide resin, the model sequence A<sup>14</sup> was chosen, grafted on a polystyrene resin. All the deprotection experiments were conducted using a catalytic amount (20 mol %) of Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> as a source of Pd(0). Ratios of the different products were determined by cleavage of the peptide from the resin under appropriate conditions followed by HPLC analysis of the crude mixture.

An initial set of experiments was carried out under the most classic conditions using a large excess of PhSiH<sub>3</sub> as the allyl scavenger and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> as the solvent<sup>15</sup> (Table 1, entries 1–3). Conversion of the Aloc protected proline 1 was complete after 120 min but was accompanied by the side-formation of a noticeable amount of allylamine 3, as expected in this challenging case. Surprisingly, the latter was smoothly transformed into amine 1 over another 180 min (Table 1, entry 3). We postulated that the source of proton necessary for this deallylation process could be the small amount of HCl dissolved into CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.<sup>16</sup> In trying to address this point, a second set

Table 1. On solid support *N*-Aloc deprotection using PhSiH<sub>3</sub> as an allyl scavenger<sup>a</sup>

	Solvent	<i>t</i> (min)	Added time (HCl) <sup>b</sup>	Yield <sup>c</sup> (%)		
				<i>N</i> -Aloc 1	NH 2	<i>N</i> -Allyl 3
1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90		24	57	19
2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	120		0	65	35
3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	300		0	100	0
4	NMP	90		65	30	5
5	NMP	300		14	58	28
6	NMP	600		0	55	45
7	NMP	1200		0	53	47
8	NMP	300	+300	10	70	20
9	NMP	600	+600	0	100	0

<sup>a</sup> Conditions: Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>: 0.2 equiv; PhSiH<sub>3</sub>: 50 equiv; temperature: 20 °C; peptide resin A: Aloc-Pro-Gly-Arg(Pbf)-Ala-Wang resin.

<sup>b</sup> In the presence of 2 equiv of HCl.

<sup>c</sup> Estimated by integration of the HPLC peaks at 214 nm.

of experiments was carried out in NMP (Table 1, entries 4–7). The initial reaction profiles were similar to those of experiments conducted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. However, the allylamine was not converted into amine, even after a prolonged reaction time (Table 1, entries 6 and 7), whereas the target amine 2 was obtained quickly and quantitatively by simply adding dilute anhydrous HCl to the reaction mixture (Table 1, entry 9). Aloc removal was somewhat slower in NMP (Table 1, entry 6) than in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Table 1, entry 2), probably due to either poorer solvation of the protected peptide resin A in NMP, or slower kinetics in the Pd(0) catalytic cycle.

This study was extended using the hydride donor dimethylamine borane<sup>12</sup> as the allyl scavenger, previously described as the one best-suited from scavenger screenings within the context of difficult *N*-Aloc removals.<sup>13,17</sup> The reaction was carried out in NMP to avoid the presence of any adventitious source of proton. To enable good solvation of the reagents during the reaction, we chose the unprotected peptide resin B,<sup>18</sup> the sole protecting group being Aloc installed on the terminal *N*<sup>α</sup>-Pro.<sup>20</sup> Under these conditions,<sup>23</sup> quantitative conversion of the *N*<sup>α</sup>-Aloc peptide resin B was observed after 30 min but accompanied by the formation of a considerable amount (68%) of allylamine 3 (Table 2, entry 1). This

Table 2. On solid support *N*-Aloc deprotection using Me<sub>2</sub>NH-BH<sub>3</sub> as an allyl scavenger in NMP<sup>a</sup>

<i>t</i> (min)	Added time [B(OH) <sub>3</sub> ] <sup>b</sup>	Yield <sup>c</sup> (%)		
		<i>N</i> -Aloc 1	NH 2	<i>N</i> -Allyl 3
1	30	0	32	68
2	90	0	47	53
3	330	0	100	0
4	30	+60	100	0

<sup>a</sup> Conditions: Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>: 0.2 equiv; Me<sub>2</sub>NH-BH<sub>3</sub>: 6 equiv; temperature: 20 °C; peptide resin B: Aloc-PPAHGVTSPDTRPAPGSTA-PAM-PEGA resin (PAM: phenylacetamidomethyl, PEGA: polyethylglycol polyacrylamide).

<sup>b</sup> In the presence of 6 equiv of B(OH)<sub>3</sub>.

<sup>c</sup> Estimated by integration of the HPLC peaks at 214 nm.

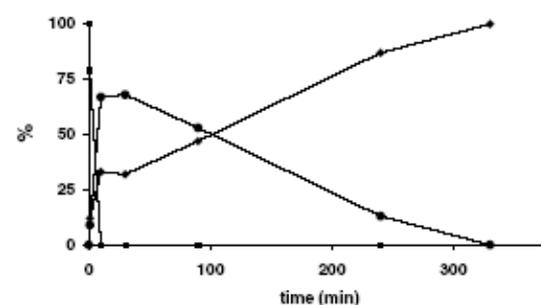
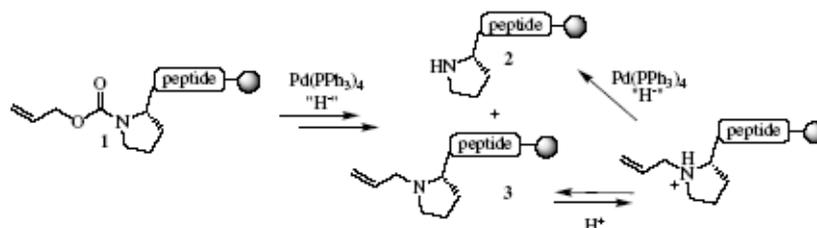


Figure 1. Kinetics of *N*-Aloc deprotection from peptide resin B. The reaction was performed in NMP in the presence of 6 equiv Me<sub>2</sub>NH-BH<sub>3</sub> at room temperature. The percentage of each product was estimated by integration of the HPLC peaks at 214 nm after final deprotection of the peptide resin using NaOH. (square) *N*-Aloc 1; (diamond)  $\alpha$ -amine 2; (circle) *N*-allylamine 3.



Scheme 2.

confirmed, once again, that the removal of  $N^{\alpha}$ -Aloc from supported proline residues is a challenging task.<sup>24</sup> Rather surprisingly, increasing the reaction time up to 330 min led to the quantitative formation of the target amine 2 (Table 2, entry 3).<sup>25</sup> The kinetics of this reaction was studied in more details by HPLC (Fig. 1). At the very beginning of the reaction, the  $N$ -Aloc derivative 1 was quickly converted into a mixture of the desired product 2 and allylamine 3. After a plateau, a second reaction, slower than the first, afforded the amine while allylamine 3 was being consumed. We suspected this time again an adventitious source of protons to be responsible for this unusual reaction profile.  $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{BH}_3$  is known to be slowly hydrolyzed into boric acid and volatile dimethylamine,<sup>12</sup> and we wondered if the presence of boric acid could be responsible for the efficiency of the deallylation process. To evaluate this hypothesis,  $\text{B}(\text{OH})_3$  was added to the reaction mixture after 30 min (Table 2, entry 4). After a total time of only 90 min, quantitative deallylation of the  $N$ -allyl proline was observed, whereas the same reaction carried out without any additive, still led to 53% of allylamine 3 (Table 2, entry 2). These data strongly support that the known high efficiency of  $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{BH}_3$  in the  $N$ -Aloc deprotection system depends not only on the trapping of the  $\pi$ -allyl palladium complex by the hydride but also on the conversion of the allylamine byproduct into an amine after its protonation by hydrolysis products according to Scheme 2.

In conclusion, this study revisited the challenging  $N^{\alpha}$ -Aloc removal from secondary amines using  $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{BH}_3$  and  $\text{PhSiH}_3$  as allyl scavengers. Our data suggest that the efficacy of these hydride donors arises not only from their nucleophilic properties but also from an adventitious source of proton due to the decomposition of the solvent ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) or the hydrolysis of the allyl scavenger itself ( $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{BH}_3$ ). A careful study of the reaction allowed us to design optimized conditions leading to the quantitative formation of the desired unprotected product, taking advantage of the synergic effect between hydride and proton donors.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants from ARC Grand Ouest. We are grateful to Dr. Corinne Buré and Mr. Rémy Poupot for recording most of the MS spectra and to Mr. Hervé Meudal for recording NMR spectra.

#### References and notes

- (a) Hudson, D. *J. Comb. Chem.* 1999, 1, 333–360; (b) Hudson, D. *J. Comb. Chem.* 1999, 1, 403–457.
- Albericio, F. *Biopolymers* 2000, 55, 123–139.
- Han, S. Y.; Kim, Y. A. *Tetrahedron* 2004, 60, 2447–2467.
- Albericio, F. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004, 8, 211–221.
- Chan, W. C.; White, P. D. In *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach*; Oxford University Press, 2000.
- For a review see: Guibé, F. *Tetrahedron* 1998, 54, 2967–3042.
- Dessolin, M.; Guillerez, M.-G.; Thieriet, N.; Guibé, F.; Loffet, A. *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 5741–5744.
- See, for example, (a) Grieco, P.; Gitu, P. M.; Hruby, V. J. *J. Pept. Res.* 2001, 57, 250–256; (b) Teixido, M.; Altamura, M.; Quartara, L.; Giolitti, A.; Maggi, C. A.; Giralt, E.; Albericio, F. *J. Comb. Chem.* 2003, 5, 760–768.
- (a) This side formation of allylamine is believed to result not only from the competition between the newly deprotected amine and the scavenger for the trapping of the allyl group, but also from the direct intramolecular decarboxylative rearrangement of the carbamate- $\pi$ -allylic intermediate.<sup>5</sup> (b) The decarboxylation of allyl carbamates in the presence of Pd(0) without any allyl scavenger was exploited in purpose for the synthesis of allylamines: Møllegaard-Wactzig, S. R.; Kumar-Rayabarapu, D.; Tunge, J. A. *Synlett* 2005, 18, 2759–2762.
- (a) Kunz, H.; März, J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1988, 27, 1375–1377; (b) Garro-Helion, F.; Merzouk, A.; Guibé, F. *J. Org. Chem.* 1993, 58, 6109–6113.
- (a) Genêt, J. P.; Blart, E.; Savignac, M.; Lemeune, S.; Lemaire-Audoire, S.; Bernard, J. M. *Synlett* 1993, 9, 680–982; (b) Lemaire-Audoire, S.; Savignac, M.; Genêt, J. P. *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 1267–1270.
- Gomez-Martinez, P.; Dessolin, M.; Guibé, F.; Albericio, F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1999, 2871–2874.
- Fernandez-Fornier, D.; Casals, G.; Navarro, E.; Ryder, H.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* 2001, 42, 4471–4474.
- Peptide resin A, Aloc-Pro-Gly-Arg(Pbf)-Ala-Wang-resin (Pbf: 2,2,4,6,7-pentamethylidihydrobenzofuran-5-sulfonyl), was obtained by SPPS using the Wang resin and the classical Fmoc/tBu strategy.<sup>5</sup>
- Typical procedure for palladium-catalyzed  $N$ -Aloc removal in the presence of  $\text{PhSiH}_3$ . To peptide-resin A (10 mg; 3  $\mu\text{mol}$ ) solvated in the appropriate solvent (1 ml),  $\text{PhSiH}_3$  (50 equiv) was added under agitation, and, a few min later, followed by  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0.7 mg; 0.2 equiv) under an argon atmosphere. After the reaction time specified in the table, the resin was washed with the solvent used for the reaction (3 $\times$ ) and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 $\times$ ). Then, the peptide resin was treated with  $\text{TFA}/i\text{Pr}_3\text{SiH}/\text{H}_2\text{O}$ , 95/2.5/2.5 (0.5 ml) for 2 h. After draining the resin, the peptide was precipitated by addition of cold  $\text{Et}_2\text{O}$  and centrifuged. The crude product dissolved

- in H<sub>2</sub>O (2 mg/ml) was analyzed by HPLC and mass spectrometry.
- Lloyd-Williams, P.; Jou, G.; Albericio, F.; Giralt, E. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4207–4210.
  - Jarikote, D. V.; Köhler, O.; Socher, E.; Seitz, O. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *15*, 3187–3195.
  - Peptide resin B: Aloc-PPAHGVTSPDTRPAPGSTA-PAM-PEGA resin. Peptide resin C (Aloc-APPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-PAM-PEGA resin) where Aloc was installed on a primary amine was included in the study. These sequences are part of our ongoing program concerning the synthesis of glycoprotein immunogens towards MUC1.<sup>19</sup>
  - (a) Cremer, G. A.; Bureaud, N.; Lelièvre, D.; Piller, V.; Piller, F.; Delmas, A. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 6353–6360; (b) Cremer, G. A.; Bureaud, N.; Piller, V.; Kunz, H.; Piller, F.; Delmas, A. F. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 965–968.
  - To synthesize peptide resins B and C, we followed a procedure optimized in our laboratory.<sup>21</sup> In brief, the phenylacetamidomethyl (PAM) linker was installed on the PEGA resin by using the commercially available Boc-Ala-4-(oxymethyl)phenylacetic acid linker.<sup>19a</sup> After Boc removal by TFA treatment and DIEA neutralization, the elongation was carried out following the Fmoc/tBu strategy.<sup>5</sup> The *N*-terminal amino acids, Ala and Pro, were introduced as *N*<sup>ε</sup>-Aloc-protected amino acids.<sup>22</sup> Subsequent cleavage of the acid-labile side-chain protecting groups with TFA/*i*Pr<sub>3</sub>SiH/H<sub>2</sub>O, 95/2.5/2.5 afforded peptide resins B and C.
  - Lelièvre, D.; Turpin, O.; El Kassouli, S.; Delmas, A. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5525–5533.
  - Aloc-Ala-OH and Aloc-Pro-OH were synthesized as described in Sakakura, A.; Hayakawa, Y. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 4427–4435; Debaene, F.; Mejias, L.; Harris, J. L.; Winssinger, N. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 8677–8690.
  - Typical procedure for palladium-catalyzed *N*-Aloc removal in the presence of Me<sub>2</sub>NH-BH<sub>3</sub>. Peptide resin (10 mg; 1.81 μmol) was solvated in NMP (1 ml) under an argon atmosphere. Me<sub>2</sub>NH-BH<sub>3</sub> was added in an appropriate concentration under agitation, followed by Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.42 mg; 0.2 equiv). After the reaction time specified in the table, the peptide resin was washed with NMP (3×), NMP containing 0.5% sodium diethyldithiocarbamate trihydrate (3×) and DMF (3×). The peptide was released from the solid support through saponification with 0.1 N NaOH (0.5 ml) in DMF (0.5 ml) for 20 min. An aliquot of the solution was neutralized with HCl and analyzed by HPLC and mass spectrometry.
  - The Pd(0)/Me<sub>2</sub>NH-BH<sub>3</sub> system afforded the quantitative release of Aloc from peptide resin C (where Aloc was installed on a primary amine) over 30 min without any formation of the allylamine.
  - This same observation was already reported when Aloc, installed on the supported piperidine secondary amines, was being removed.<sup>15</sup>

## **Ligation chimique sur support solide : vers la préparation d'analogues de la glycoprotéine MUC1**

Le travail effectué au cours de cette thèse se situe dans le cadre d'une approche anti-tumorale par immunothérapie. Le cœur de ce projet a consisté à développer une méthodologie permettant de synthétiser des mimes de la forme tumorale de la glycoprotéine MUC1 par multiligation chimique sur support solide. La stratégie de synthèse repose sur une approche convergente basée sur la condensation par liaison oxime entre un peptide aminoxy (Aoa) et un peptide aldéhyde. Le développement d'une approche utilisant la déprotection sélective du groupe Aoa sur le fragment médian a permis de coupler plusieurs motifs MUC1 par ligation chimique sur support solide et d'obtenir deux longs peptides comportant deux unités et demi de répétition de la protéine MUC1 pour l'un et un épitope T-auxiliaire supplémentaire pour l'autre composé.

Ce travail ouvre la voie à la synthèse de chimères de MUC1 qui seront glycosylées par voie chimioenzymatique. Ces petites glycoprotéines synthétiques, bien que calquées sur des glycoprotéines naturelles, seront élaborées dans le but d'étudier différentes présentations des antigènes pour optimiser leur immunogénicité.

Mots clés : Peptide, MUC1, Multiligation chimique, Support solide, Liaison oxime, Aloc.

---

### **Solid phase chemical ligation:**

#### **To the preparation of glycoprotein analogues of the glycoprotein MUC1**

The work described in this manuscript takes place within the framework of new approaches for anti-tumor immunotherapy. It was aimed at developing a methodology to synthesise mimics of the tumor-related glycoprotein MUC1 by chemical multiligation on solid support. The main strategy was based on a convergent approach through successive condensations of an aminoxy (Aoa) peptide on a peptide aldehyde leading to oxime bonds. The orthogonal protection of the Aoa group of the median fragment enabled several MUC& peptide to be successively coupled by chemical ligation on solid support. Two long peptides with two units and a half repetition of the MUC1 protein for one and one epitope T-additional auxiliary for the other compound were obtained.

This work paves the way for the synthesis of MUC1 chimeras glycosylated by chemistry and enzymatic reaction. These small synthetic glycoproteins, although modeled on natural glycoproteins, will be developed in order to study various presentations antigens to optimize their immunogenicity.

Keywords: Peptide, MUC1, Multiligation, solid phase, Oxime bound, Aloc.



UNIVERSITE D'ORLEANS



**Isidore DECOSTAIRE**  
**Ligation chimique sur support solide :**  
**vers la préparation d'analogues**  
**de la glycoprotéine MUC1**

Le travail effectué au cours de cette thèse se situe dans le cadre d'une approche anti-tumorale par immunothérapie. Le cœur de ce projet a consisté à développer une méthodologie permettant de synthétiser des mimes de la forme tumorale de la glycoprotéine MUC1 par multiligation chimique sur support solide. La stratégie de synthèse repose sur une approche convergente basée sur la condensation par liaison oxime entre un peptide aminooxy (Aoa) et un peptide aldéhyde. Le développement d'une approche utilisant la déprotection sélective du groupe Aoa sur le fragment médian a permis de coupler plusieurs motifs MUC1 par ligation chimique sur support solide et d'obtenir deux longs peptides comportant deux unités et demi de répétition de la protéine MUC1 pour l'un et un épitope T-auxiliaire supplémentaire pour l'autre composé.

Ce travail ouvre la voie à la synthèse de chimères de MUC1 qui seront glycosylées par voie chimioenzymatique. Ces petites glycoprotéines synthétiques, bien que calquées sur des glycoprotéines naturelles, seront élaborées dans le but d'étudier différentes présentations des antigènes pour optimiser leur immunogénicité.

Mots clés : Peptide, MUC1, Multiligation chimique, Support solide, Liaison oxime, Aloc.

**Solid phase chemical ligation:**  
**To the preparation of glycoprotein analogues**  
**of the glycoprotein MUC1**

The work described in this manuscript takes place within the framework of news approaches for anti-tumor immunotherapy. It was aimed at developing a methodology to synthesise mimics of the tumor-related glycoprotein MUC1 by chemical multiligation on solid support. The main strategy was based on a convergent approach through successive condensations of an aminooxy (Aoa) peptide on a peptide aldehyde leading to oxime bonds. The orthogonal protection of the Aoa group of the median fragment enabled several MUC& peptide to be successively coupled by chemical ligation on solid support. Two long peptides with two units and a half repetition of the MUC1 protein for one and one epitope T-additional auxiliary for the other compound were obtained.

This work paves the way for the synthesis of MUC1 chimeras glycosylated by chemistry and enzymatic reaction. These small synthetic glycoproteins, although modeled on natural glycoproteins, will be developed in order to study various presentations antigens to optimize their immunogenicity.

Keywords: Peptide, MUC1, Multiligation, solid phase, Oxime bound, Aloc.



**Centre de Biophysique Moléculaire**  
CNRS / UPR 4301  
Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2



