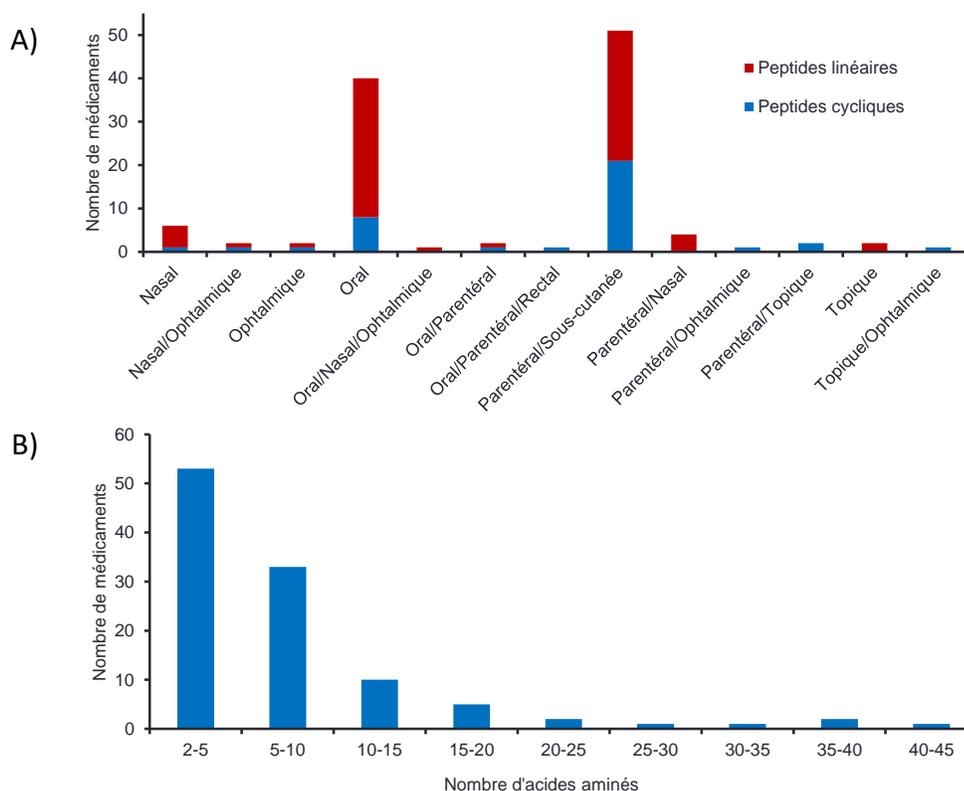


## 1.1 Les peptides : une classe unique d'agents thérapeutiques

Les peptides et les mini-protéines (<50 acides aminés) sont des outils moléculaires d'avant plan dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Ils possèdent de nombreux avantages par rapport à l'utilisation de petites molécules organiques, dont le fait qu'ils possèdent une forte activité et une haute spécificité envers leur cible et qu'ils démontrent une faible toxicité et peu d'interactions médicamenteuses, limitant généralement les effets secondaires liés à leur consommation.<sup>1,2,3</sup> Ce type d'agent thérapeutique génère des revenus de plus en plus importants pour les compagnies pharmaceutiques avec des recettes qui atteignaient 14,1 milliards en 2011 et avec le potentiel d'augmenter à 25,4 milliards en 2018 selon les estimations, puisque présentement 140 médicaments à base de peptides sont en essais cliniques, et plus de 500 en essais précliniques.<sup>4</sup> Une étude de marché publiée en 2016 a d'ailleurs fait l'analyse de 108 médicaments à base de peptides approuvés par la FDA (Figure 1).<sup>5</sup>



**Figure 1.** Répartition de 108 médicaments à base de peptides commercialisés selon leur structure chimique et leur voie d'administration (A) et selon le nombre d'acides aminés de leur séquence primaire (B).

Il est possible de constater à la lumière de ces données que le nombre de peptides linéaires est plus important que ceux possédant une structure cyclique. Malgré leur énorme potentiel comme il en sera discuté à la section **1.2.4**, les peptides cycliques demeurent une classe sous-exploitée (70 linéaires contre 38 cycliques, Figure **1A**). De plus, on remarque que la grande majorité des peptides approuvés sont composés de quinze acides aminés et moins ce qui laisse beaucoup de place au développement de peptides de plus haut poids moléculaire jusqu'à présent peu explorés (Figure **1B**). Il faut toutefois noter un défaut de cette étude qui inclut des peptides composés de deux à cinq acides aminés, puisque ceux-ci possèdent un poids moléculaire très faible (<500 Da), ce qui fait que leur comportement s'apparente à celui des petites molécules organiques. Un faible poids moléculaire a pour effet d'augmenter la biodisponibilité orale, ce qui augmente le nombre de peptides biodisponibles oralement rapporté dans le cadre de cette étude, faussant légèrement les données. Malgré tout, les conclusions tirées de l'analyse restent les mêmes, soit que l'énorme diversité moléculaire disponible avec les peptides possédant plus de 15 acides aminés et les peptides cycliques demeure encore sous-exploitée.

Le plein essor des peptides est, entre autres, dû au fait qu'ils sont de bons modulateurs d'interactions protéines-protéines comparativement aux petites molécules.<sup>6,7,8,9</sup> Comme ces interactions sont omniprésentes dans le corps, elles sont impliquées dans beaucoup de dysfonctionnements. Les peptides sont donc indiqués pour une panoplie d'applications, allant des antibiotiques<sup>10,11,12</sup> aux agents anticancéreux,<sup>13,14</sup> en passant par les dysfonctionnements hormonaux, dont le diabète. C'est d'ailleurs dans ce domaine que les compagnies pharmaceutiques axent principalement leur recherche et le développement de peptides thérapeutiques, puisque les agonistes du récepteur *Glucagon-Like Peptide-1* (GLP-1) possèdent des propriétés hypoglycémiantes intéressantes pour le traitement du diabète de type 2 en stimulant la production d'insuline en plus de réduire l'appétit chez le patient, ce qui peut mener à une perte de poids.<sup>15,16</sup> Comme près de 40% des Américains sont considérés obèses selon une étude récente,<sup>17</sup> le marché potentiel pour des médicaments favorisant la perte de poids est bien établie. Plusieurs compagnies pharmaceutiques se sont évidemment lancées dans l'aventure de produire un analogue agoniste au GLP-1, ce qui a résulté en la production d'un grand nombre de peptides ayant entre 32 et 43 acides aminés (Tableau 1).

**Tableau 1.** Agonistes du GLP-1 présentement commercialisés ou en phase clinique.<sup>4</sup>

Compagnie	Nom commercial	Nom générique	Nombre d'acides aminés	Phase clinique**	Administration
Amylin Pharmaceuticals	Byetta™	exénatide	39	IV	Sous-cutanée deux fois par jour. <sup>18</sup>
Amylin Pharmaceuticals	Bydureon™	exénatide	39	IV	Sous-cutanée une fois par semaine. <sup>18</sup>
Novo Nordisk	Victoza™	liraglutide	32	IV	Sous-cutanée une fois par jour. <sup>19</sup>
Sanofi	Lyxumia™	lixisenatide	43	IV	Sous-cutanée une fois par jour. <sup>20</sup>
GlaskoSmithKline	Tanzeum™	ablglutide	ND*	IV	Sous-cutanée une fois par semaine. <sup>21</sup>
Novo Nordisk	-----	semaglutide	28	III	Sous-cutanée une fois par semaine. <sup>22</sup>
Eli Lilly	Trulicity™	dulaglutide	ND*	IV	Sous-cutanée une fois par semaine. <sup>23</sup>

\*Peptide injecté lié à l'albumine.

\*\* Phase IV implique la commercialisation du produit.

Avec cet exemple des agonistes du GLP-1, il est possible de remarquer les désavantages principaux de l'utilisation des peptides en tant que médicaments. En effet, leurs propriétés pharmacocinétiques posent problème dans certains cas, puisqu'ils sont faiblement biodisponibles oralement avec généralement une faible absorption au niveau du tractus gastro-intestinal et un faible temps de demi-vie dans le plasma sanguin.<sup>24,25</sup> Ainsi, ce n'est pas une classe de molécules qui offre une bonne complaisance pour le patient, car leur mode d'administration est généralement intrusif pour l'organisme, soit généralement par injection sous-cutanée ou intraveineuse. De plus, comme le médicament est rapidement dégradé par les protéases et peptidases, surtout présentes dans le foie et les reins, il faut l'injecter souvent afin de garder l'effet désiré (ex : exénatide  $t_{1/2} = 2.5h$ ).<sup>24</sup> C'est pourquoi les compagnies pharmaceutiques produisant de nouveaux agonistes des GLP-1 misent surtout sur un mode d'administration plus convivial afin que leur produit se démarque des concurrents (ex : Bydureon™, Tanzeum™, Trulicity™, semaglutide, etc.).<sup>26</sup>

Plusieurs méthodes existent afin d'augmenter le temps d'action d'un peptide. La stratégie du Bydureon™ est d'utiliser une capsule de poly-(D, L-lactide-coglycolyse) afin de libérer lentement l'exénatide de façon continue dans le corps.<sup>18,27</sup> D'autres méthodes reposant sur l'utilisation de modifications chimique des peptides sont rapportées afin d'augmenter leur temps de demi-vie. Notamment, il est possible d'effectuer une *N*-méthylation du squelette peptidique, de cycliser le peptide via un lactame ou une lactone, d'utiliser des acides aminés de stéréochimie dextrogyre, ou des acides-β-aminés afin d'éviter la dégradation par les peptidases et protéases.<sup>25,28</sup> Une autre façon beaucoup plus triviale consiste simplement à changer des acides aminés dans la séquence primaire.<sup>24</sup> Cependant, ces méthodes décrites ci-haut impliquent également la possibilité d'une modification structurale du peptide ce qui peut nuire à son efficacité. C'est pourquoi d'autres méthodes comme la PEGylation et la liaison à l'albumine bovine par une chaîne d'acide gras ont notamment été développées.<sup>29,30,31</sup>

## 1.2 Production des peptides

À la lumière des observations ci-dessus, il y a donc une demande croissante en peptides thérapeutiques dans l'industrie pharmaceutique. Présentement, la production des peptides et protéines est majoritairement assurée par deux voies principales, soit la fermentation pour générer des protéines recombinantes et la synthèse chimique. Ces méthodes, bien qu'utiles dans la majorité des cas, possèdent aussi leurs limitations qui restreignent l'accès à l'immense diversité moléculaire que nous offre cette classe de biomolécules.

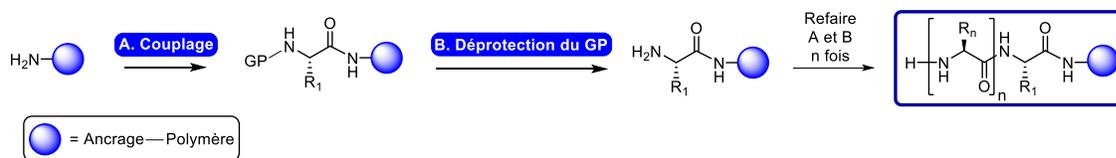
### 1.2.1 Protéines recombinantes

Dans cette première approche, une cellule eucaryote (animale ou levure comme *Saccharomyces cerevisiae*)<sup>32</sup> ou procaryote (e.g. *Escherichia coli*)<sup>33</sup> est utilisée pour produire la protéine cible suite à l'introduction du gène associé dans les cellules par transfection ou transformation. Chez les bactéries, le matériel génétique exogène est introduit à l'aide d'un plasmide qui contient le gène responsable et qui sera traduit pour produire le peptide ou la protéine d'intérêt (protéine recombinante).<sup>34</sup>

De façon générale, cette méthode fonctionne bien, mais elle possède de nombreux inconvénients. Tout d'abord, elle est utilisée majoritairement pour la production de protéines (>50 acides aminés) plutôt que pour la synthèse de peptides en raison des coûts liés à la méthode. En effet, pendant sa production par les micro-organismes, le composé d'intérêt se retrouve dans le milieu de fermentation en compagnie d'un mélange moléculaire complexe utilisé pour la croissance des cellules. Par conséquent, l'isolement de la molécule d'intérêt est souvent très ardu et coûteux, faisant souvent intervenir la chromatographie d'affinité afin de les purifier.<sup>35</sup> Un autre inconvénient est que seuls des acides- $\alpha$ -aminés de stéréochimie lévogyre peuvent être utilisés comme blocs de constructions de ces protéines. De ce fait, la production de protéines contenant des acides aminés non-naturels, des acides aminés dextrogyres, des *N*-méthylations et des lactames ou lactones (peptides cycliques), toutes des transformations utiles pour augmenter le temps de demi-vie de ces molécules, est difficile, voire impossible dans certains cas, par voie recombinante. Ainsi, la production de peptides par cette voie empêche l'incorporation de portions peptidomimétiques, rendant souvent les produits plus vulnérables à la dégradation enzymatique. C'est pourquoi, pour la suite de ce texte, la préparation de peptides exclura cette voie de synthèse, car d'autres méthodes permettent leur production plus rapidement et à moindre coût.

### 1.2.2 Synthèse chimique

La synthèse peptidique telle qu'on la connaît sous sa forme actuelle a pris son essor suite aux travaux révolutionnaires de Merrifield en 1963 sur la synthèse de peptides en phase solide (SPPS). Des travaux qui lui ont d'ailleurs mérité le prix Nobel de chimie en 1984.<sup>36,37</sup> Le concept général fait intervenir l'utilisation d'un polymère insoluble portant un groupement fonctionnel disponible, capable de réagir avec un autre groupement fonctionnel sur une molécule pour former une liaison covalente. Dans le cadre de la synthèse peptidique, la fonctionnalité sur le support solide réagit avec l'acide carboxylique d'un acide aminé protégé en N-terminal pour l'attacher au support solide. Le groupement protégeant l'amine peut par la suite être retiré et l'addition d'un autre acide aminé protégé est effectuée. Ces étapes itératives de couplage/déprotection peuvent être répétées un nombre *n* de fois pour obtenir le peptide désiré (Figure 2). Le relargage du peptide peut être effectué sous diverses conditions selon le type d'ancrage utilisé.



**Figure 2.** Schéma de la synthèse peptidique sur support solide.

GP = Groupement protecteur.

Les avantages de la synthèse sur support solide comparativement à la synthèse en solution plus traditionnelle sont nombreux. Puisque les résidus qui ont réagi sont attachés sur le support solide, toutes les impuretés subséquentes qui demeurent en solution peuvent être retirées simplement par filtration. Ces lavages faciles font également en sorte qu'un large excès de réactif peut être utilisé afin d'accélérer l'efficacité de la réaction (temps et rendements), puisque les réactifs excédentaires seront par le fait même éliminés par les lavages. Comme les réactions sont presque quantitatives, une purification n'est pas nécessaire entre chaque étape de synthèse, mais seulement à la toute fin de la synthèse, purification généralement simple effectuée par HPLC. Ainsi, comme en synthèse peptidique les étapes sont répétitives et que les manipulations sont simplifiées par le support solide, une automatisation de la synthèse de peptide a été développée.<sup>38</sup> Tous ces avantages font en sorte que l'utilisation de supports solides fonctionnalisés dépasse les applications en synthèse peptidique. En effet, le concept a également été appliqué en chimie des acides nucléiques,<sup>39</sup> en plus d'innombrables autres exemples en synthèse organique classique,<sup>40,41</sup> sans compter les applications en chimie combinatoire pour la synthèse et le criblage de chimiothèques hautement diversifiées, notamment en utilisant la méthode «*one-bead one-compound*».<sup>42,43</sup>

Au cours des années suivant cette découverte, les polymères, les ancrages, les groupements protecteurs et les réactifs agissant comme agents de couplage ont grandement évolué, de sorte que la synthèse de peptides est devenue très polyvalente et efficace. Chacun de ces aspects sera repris individuellement dans les lignes qui suivent.

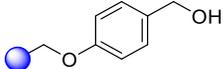
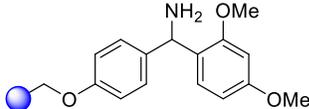
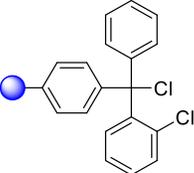
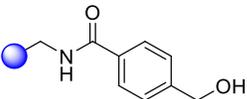
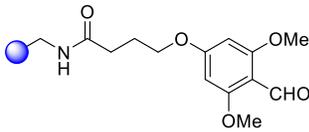
### ***Support solide polymérique***

Les premières expériences ont tout d'abord été effectuées sur une résine de polystyrène et de divinylbenzène chlorométhylée (1%).<sup>36</sup> Des études ont par la suite portées sur la capacité du polymère à bien se gonfler dans différents solvants pour augmenter la surface réactionnelle, et de fait, augmenter l'efficacité des réactions. En effet, bien que le polystyrène se gonfle généralement bien dans les solvants apolaires, on ne peut en dire autant dans les solvants polaires, où la résine a plutôt tendance à se replier sur elle-même, diminuant la surface de contact avec le solvant et les réactifs.<sup>44</sup> C'est pourquoi des efforts ont été déployés pour créer des polymères pouvant être compatibles avec des conditions physiologiques, soit qui peuvent gonfler comme il se doit dans l'eau. De fait, la résine Tentagel™, un mélange de polystyrène et de polyéthylène glycol a fait ses marques dans le marché de la synthèse sur support solide.<sup>45</sup> La résine ChemMatrix® composé uniquement de polyéthylène glycol est aussi une résine intéressante en ce sens qu'elle est relativement polaire. Cette propriété est notamment utile dans la synthèse de longs peptides puisqu'elle prévient le phénomène de repliement de la chaîne peptidique hydrophobe en raison des nombreux groupements protecteurs des chaînes latérales. Les puretés des longs peptides synthétisés sur polystyrène s'en voient généralement diminuées en raison de l'hydrophobicité du support solide qui interagit avec le peptide.<sup>46</sup>

### ***Ancrage***

Dans un autre ordre d'idée, une fois la synthèse du peptide terminée, il faut aussi être en mesure de le retirer du support solide, soit par un clivage spécifique au site d'ancrage. Ainsi, si initialement le peptide était largué en présence d'acide fluorhydrique, un produit demandant des précautions relatives à son utilisation, une panoplie de sites d'ancrage pouvant être clivé sous des conditions beaucoup plus conviviales ont été développées (Tableau 2).<sup>47</sup> Il est donc important de choisir le type d'ancrage de la résine en fonction du peptide qui est désiré. Il est à noter qu'il existe d'autres façons d'ancrer le peptide au support solide que par son acide carboxylique terminal. En effet, il est également possible de l'ancrer par son squelette amide.<sup>48</sup> L'utilité d'une telle approche est notamment la synthèse de peptides cycliques comme il en sera discuté à la section 1.2.4 et au chapitre 4.

**Tableau 2.** Types d'ancrages les plus utilisés en synthèse peptidique et leurs conditions de clivage respectives.<sup>47</sup>

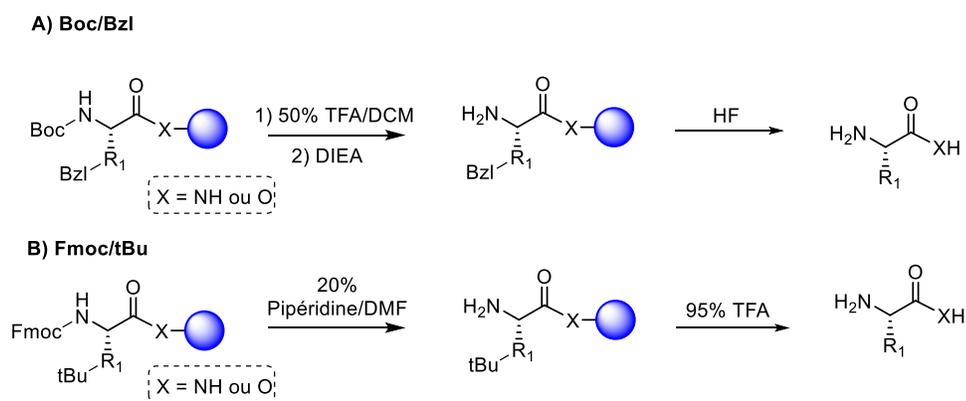
Nom de l'ancrage	Structure chimique	Conditions de clivage	C-terminal après clivage	Groupements protecteurs compatibles
Merrifield <sup>36</sup>		HF	COOH	Boc/Bzl
Hydroxymethyl		HF	COOH	Boc/Bzl
Wang		95% TFA	COOH	Fmoc/tBu
Rink		95% TFA	CONH <sub>2</sub>	Fmoc/tBu
2-Chlorotrityl chloride (2Cl-TCP)		20% HFIP ou 1% TFA dans le DCM	COOH	Fmoc/tBu
Hydroxymethyl benzoic acid (HMBA)		Nucléophiles divers (R-OH, R-NH <sub>2</sub> , OH')	COOR CONHR	Fmoc/tBu
Tris-alkoxy backbone amide linker (BAL) <sup>48</sup>		5% TFA/DCM	Au choix	Fmoc/tBu

### Groupements protecteurs

Comme chaque ancrage possède ses propres caractéristiques, il est important de choisir les bons groupements protecteurs afin de pouvoir effectuer la déprotection sélective de l'amine tout en gardant les chaînes latérales fonctionnalisées protégées et en demeurant ancré sur le support solide. À cette fin, plusieurs stratégies de protection d'amines et de groupements de chaînes latérales ont été développées.<sup>49</sup> Afin de simplifier le tout, il est possible de les classer en deux grandes classes, soit les méthodes Boc/Bzl<sup>36</sup> et Fmoc/tBu.<sup>50</sup> Si, la première méthode est compatible avec les ancrages clivables en milieu fortement acide et requière donc des équipements spéciaux, la seconde est compatible avec des ancrages plus acidosensibles. Principalement, les ancrages peuvent être clivés en présence d'acide trifluoroacétique à 95%, les 5% restant étant composés de «scavenger» qui trappent les carbocations générés. Ce sont généralement des

trialkylsilane, des thioéthers, du phénol, des thiols ou même de l'eau. L'ajout de ces réactifs empêche les carbocations de se lier à nouveau aux chaînes latérales et évite un clivage incomplet de la résine en déplaçant l'équilibre vers la formation des produits.

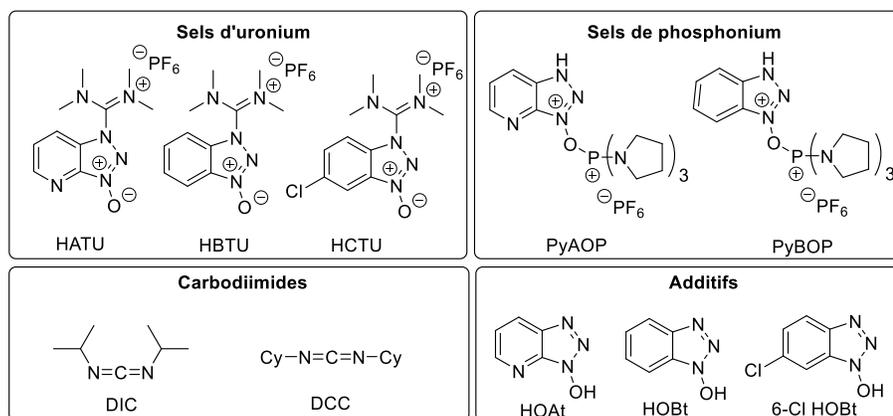
Il faut donc au moins trois degrés d'orthogonalité pour effectuer la synthèse des peptides : une protection de l'amine, une protection des chaînes latérales et le clivage du support solide (Figure 3). Il est toutefois à noter que dans certaines situations, la déprotection des chaînes latérales et le clivage du support solide peuvent être effectués simultanément afin d'économiser du temps.



**Figure 3.** Principales stratégies de protection orthogonale de la synthèse peptidique. L'approche Boc/Bzl (A) et l'approche Fmoc/tBu (B) sont les deux principales méthodes.

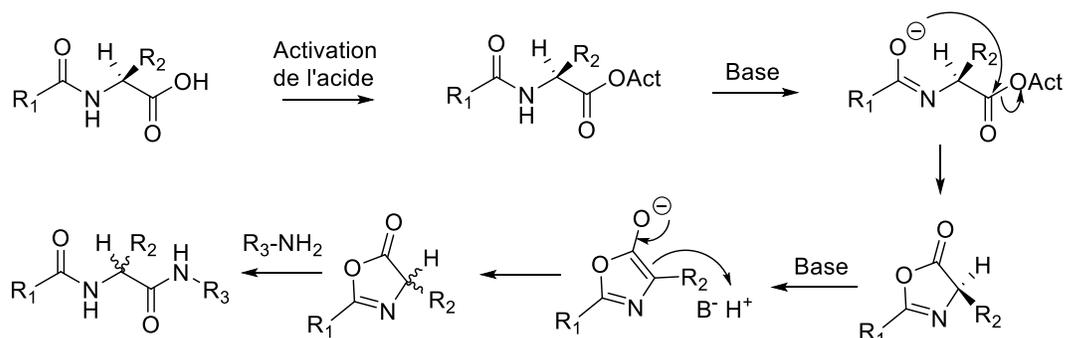
### Agents de couplages

Le dernier aspect à considérer pour la synthèse des peptides est l'agent de couplage qui doit être utilisé pour former le lien amide entre chaque acide aminé. En effet, le corps humain utilise des enzymes pour que cette réaction ait lieu. Le comportement de ces enzymes a d'ailleurs été répliqué dans la synthèse par voie enzymatique, sans néanmoins démontrer une efficacité supérieure à la synthèse chimique.<sup>51</sup> Ainsi, en synthèse chimique, comme aucune enzyme n'est impliquée, il faut activer l'acide carboxylique pour que la condensation ait lieu. Pour ce faire, une multitude d'agents de couplage a été développée (Figure 4).<sup>52</sup>



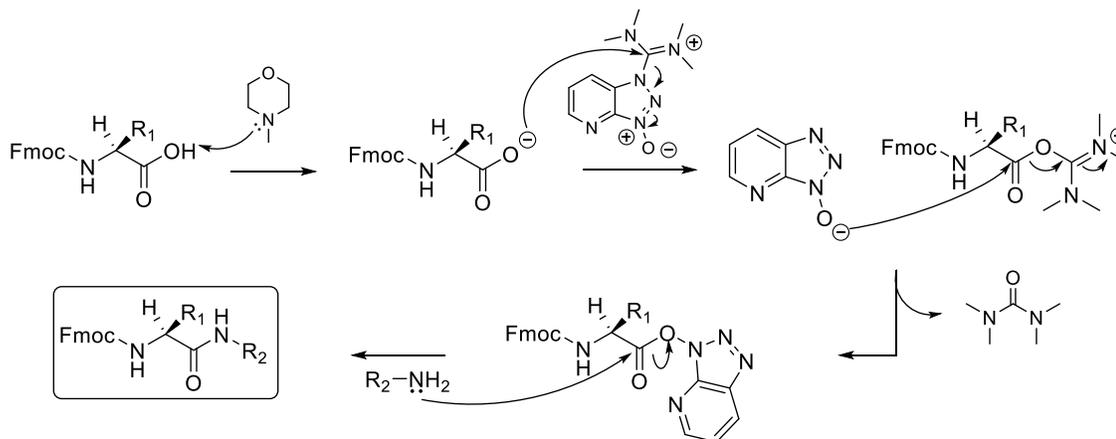
**Figure 4.** Principaux agents déshydratants utilisés en synthèse peptidique.

En comparant les structures des molécules présentées à la Figure 4, il est possible de remarquer des similitudes. L'utilisation des carbodiimides est une excellente façon de former des liens amides, cependant, des problèmes d'épimérisation peuvent survenir avec l'utilisation de ces agents de couplages seuls. En effet, l'attaque désirée de l'amine sur l'acide carboxylique est une réaction relativement lente comparativement à la réaction acide-base intramoléculaire qui peut survenir dans de telles conditions, ce qui provoque la formation d'une oxazolone (Figure 5).<sup>52</sup> Les oxazolones sont des molécules où l'hybridation du carbone en alpha du carbonyle devient  $sp^2$ , qui est donc plan, impliquant la perte de la stéréochimie du peptide.



**Figure 5.** Mécanisme d'épimérisation en synthèse peptidique via la formation d'oxazolone.

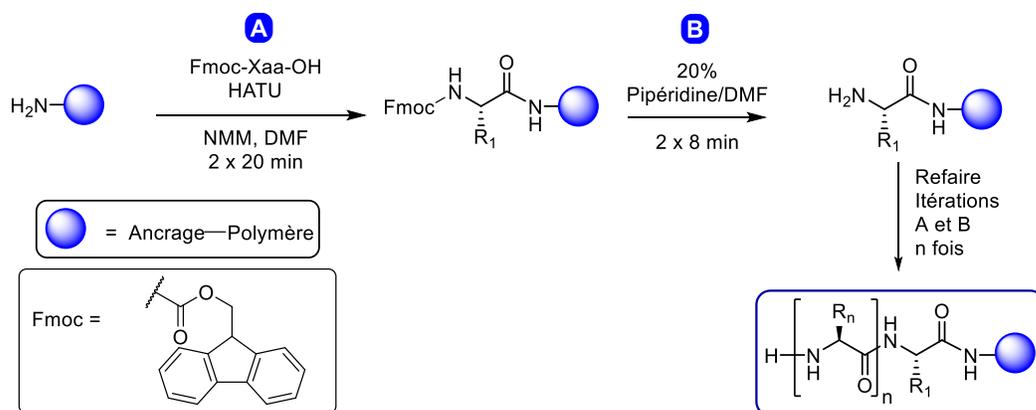
Dans l'optique de réduire cette épimérisation, l'ajout d'additifs comme des hydroxybenzotriazoles est généralement la méthode favorisée.<sup>53</sup> L'idée derrière cette addition est que l'attaque de l'alcool sur l'intermédiaire est plus rapide que l'attaque de l'amine, mais l'ester activé résultant est beaucoup moins sensible à la formation d'une oxazolone. De cette façon, les dérivés uroniums et phosphoniums présentés à la Figure 4 constituent en fait la combinaison entre un carbodiimide et un additif benzotriazole.<sup>54</sup> L'utilisation de ces agents de couplages nécessite la présence d'une faible base tertiaire comme la *N*-méthylmorpholine (NMM) ou la *N,N*-diisopropyléthylamine (DIEA) afin de former le carboxylate sans toutefois déprotéger l'amine de son groupement protecteur carbamate. Le mécanisme de cette réaction est décrit à la Figure 6. Cet ajout de base est cependant problématique dans une approche de couplage de fragments de peptides comme il en sera discuté à la section 1.2.3.



**Figure 6.** Mécanisme de la formation d'un lien peptidique via l'utilisation d'un réactif hybride, le HATU.

### La SPPS en résumé

Ayant couvert la synthèse peptidique sous quatre principaux aspects, le schéma de synthèse général de la Figure 2 peut désormais être précisé (Figure 7). Pour la suite de ce mémoire, la SPPS fera référence à cette méthode, puisque c'est cette dernière qui a été utilisée lors des travaux présentés. Il est à noter que les chaînes latérales d'acides aminés fonctionnalisés sont protégées via des groupements labiles en milieu acide (ex. tBu, Boc, Trt, Pbf) et les ancrages généralement sélectionnés sont aussi sensibles dans ces conditions (ex : Rink, 2-Cl TCP, BAL).



**Figure 7.** Schéma de la synthèse peptidique sur support solide utilisé dans le cadre de ce mémoire.

Bien que la synthèse peptidique sur support solide ait connu un essor formidable au cours des dernières décennies pour devenir une méthodologie bien rodée, quelques difficultés techniques demeurent. Bien que chaque étape soit presque quantitative, il n'en demeure pas moins que la synthèse d'un peptide de 30 acides aminés demande au moins 60 étapes réactionnelles. Ainsi, même si seulement 1% d'impureté survient à chaque étape, au bout de 60 étapes, seulement 45% du peptide désiré peut théoriquement être obtenu. De plus, lorsque les chaînes peptidiques s'allongent, des structures secondaires peuvent être formées ce qui peut diminuer l'efficacité des couplages. Notamment, le fait que chaque groupement fonctionnel sur les chaînes latérales doit être protégé fait en sorte que les peptides sont relativement hydrophobes. Cette caractéristique peut causer le repliement de la chaîne peptidique via l'interaction des chaînes hydrophobes avec le polymère, ce qui diminue significativement l'accès au N-terminal du peptide. C'est pourquoi, de façon générale, cette méthode de synthèse de peptides est limitée aux peptides possédant moins de 30 résidus d'acides aminés.<sup>55</sup> Pour atteindre des structures peptidiques d'une longueur supérieure, il faut généralement passer par des approches de couplages de fragments peptidiques comme il en sera discuté dans la prochaine section (Section 1.2.3).