

50376  
1997  
15

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

**Line BOUREL**



Thèse de Doctorat en Chimie Organique et Macromoléculaire

**SYNTHESE COMBINATOIRE APPLIQUEE A LA  
DECOUVERTE DE NOUVEAUX MEDICAMENTS**

Soutenu le 13 Janvier 1997

Président :	Pr. Henri SLIWA
Rapporteurs :	Pr. Annie MARCINCAL Pr. Jean MARTINEZ
Examineurs :	Pr. André TARTAR Pr. Christian SERGHERAERT Pr. Hélène GRAS-MASSE Dr. Patricia MELNYK



## **REMERCIEMENTS**

Ce travail a été réalisé au Service de Chimie des Biomolécules, URA CNRS 1309 (Institut Pasteur de Lille), dirigé par le Professeur André Tartar.

Il a fait l'objet d'une collaboration avec les Laboratoires GLAXO-WELLCOME, Centre de Recherche des Ulis, dirigés par François Hyafil.

Il a été réalisé grâce à une bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

**Monsieur Henri SLIWA**

J'ai pu apprécier la clarté et la qualité de vos cours lors de mon Diplôme d'Etudes Approfondies. Je vous remercie vivement de l'honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury de cette thèse et de l'intérêt que vous m'avez témoigné.

**Madame Annie MARCINCAL**

Vous m'avez toujours accueillie avec sympathie et disponibilité. Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

**Monsieur Jean MARTINEZ**

Je suis sensible à l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail en acceptant d'en être le rapporteur et vous prie de recevoir toute ma gratitude.

**Monsieur André TARTAR**

Je vous suis très reconnaissante de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire et d'avoir dirigé cette thèse. Je vous remercie vivement pour la confiance que vous m'avez accordée.

**Monsieur Christian SERGHERAERT**

Vous avez été le premier à m'encadrer et avez toujours fait preuve de disponibilité et d'attention à mon égard. Je vous en remercie.

**Madame Hélène GRAS-MASSE**

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse. Soyez-en remerciée.

**Madame Patricia MELNYK**

J'ai pu bénéficier de vos conseils et de votre aide tout au long de cette thèse. Vous avez accepté de m'aider à corriger ce manuscrit, je vous adresse mes plus vifs remerciements.

Je tiens à remercier Benoît Déprez, dont j'ai pu apprécier la rigueur scientifique et la qualité humaine au cours de ces trois années. Il a toujours été disponible et bienveillant à mon égard et m'a orientée, à chaque fois, dans les bonnes directions. Qu'il reçoive ici toute ma reconnaissance.

Ma profonde amitié va également à Xavier Williard et Iuliana Pop qui ont toujours été présents quand j'avais besoin d'une aide scientifique ou tout simplement d'un réconfort.

Je tiens à associer à ces remerciements Marie-Isabelle Steeland et Valérie Thorel qui m'ont aidée à photocopier et relier cette thèse ainsi que Béatrice Bonnet qui a accepté de corriger une partie du manuscrit.

Je remercie Madame Anick Lemaire pour sa contribution technique à la réalisation de ce travail et tous les membres de la Société CEREP, Lille qui m'ont encouragée, soutenue ou aidée.

Enfin merci à tous les membres du Service de Chimie des Biomolécules qui m'ont aidée ou conseillée tout au long de mon séjour parmi eux.

# TRAVAUX

## PUBLICATIONS

- 1- V. Fauchet, **L. Bourel**, A. Tartar, C. Sergheraert  
« Solid phase synthesis of trypanothione disulfide »  
*Biorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, *4*, 2559-2562
  
- 2- B. Déprez, X. Williard, **L. Bourel**, H. Coste, F. Hyafil, A. Tartar  
« Orthogonal combinatorial chemical libraries »  
*J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *117*, 5405-5406
  
- 3- **L. Bourel**, X. Williard, I. Pop, R. Baudelle, D. Horvath, B. Déprez, P. Melnyk, A. Tartar  
« Synthèse combinatoire : les autoroutes de la diversité »  
*L'actualité chimique*, déc. **1995**, *33*
  
- 4- P. Melnyk, **L. Bourel**, X. Williard, I. Pop, D. Horvath, B. Déprez, A. Tartar  
« Combinatorial chemistry : a rational access to molecular diversity »  
*Actualités de chimie thérapeutique*, **1995**, *22e série*, 51-66
  
- 5- X. Williard, I. Pop, **L. Bourel**, D. Horvath, R. Baudelle, P. Melnyk, B. Déprez, A. Tartar  
« Combinatorial chemistry : a rational approach to chemical diversity »  
*Eur. J. Med. Chem.*, **1996**, *31*, 87-98
  
- 6- **L. Bourel**, A. Tartar, P. Melnyk  
« Improved synthesis of pyridazinediones under microwave irradiation »  
*Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, (24), 4145-4148

## COMMUNICATIONS

- 1- B. Déprez, X. Williard, **L. Bourel**, H. Coste, F. Hyafil, A. Tartar  
« Orthogonal combinatorial libraries »  
XIIIth Symposium on Medicinal Chemistry, Paris, 19-23 Septembre 1994  
*poster*

2- **L. Bourel**, X. Williard, B. Déprez, H. Coste, F. Hyafil, A. Tartar  
« Synthèse et activité biologique d'analogues d'un antagoniste de la vasopressine découvert au moyen d'une banque combinatoire »

Groupe D'Etude Structure Activité, GESA XXV, Saint Valéry en Caux, 9-12 Mai 1995

Journée des jeunes chercheurs, Institut Pasteur de Lille, 21 novembre 1995

*poster*

3- V. Fauchet, **L. Bourel**, A. Tartar, C. Sergheraert

« Strategy for trypanothione disulfide solid phase synthesis »

Solid Phase Synthesis and Combinatorial Chemical Libraries

Edinburgh, 12-16 Septembre 1995

*poster*

4- **L. Bourel**, A. Tartar, P. Melnyk

Combinatorial Synthesis of pyridazinediones under microwaves irradiation

6th Belgian Organic Synthesis Symposium, Gand, 8-12 Juillet 1996

*poster*

5- **L. Bourel**

« Chimie combinatoire et diversité moléculaire »

Faculté de Pharmacie de Paris V, Université René Descartes, 15 Mai 1996

*oral*

## COMPTE-RENDU DE CONGRES

1- R. Baudelle, **L. Bourel**, R. Poulain, S. Vendeville, A. Tartar

« Premier symposium français sur la chimie combinatoire, Rennes 29-30 Octobre 1996 »

*L'actualité chimique*, à paraître en Janvier 1997

# SOMMAIRE

Remerciements	3
Travaux	6
Sommaire	8
Abréviations	13
Avant-propos	15

## RÉSULTATS

### INTRODUCTION :

« La découverte d'une tête de série, clé de voute de la recherche pharmaceutique »	17
--	----

### PARTIE I : CONTRIBUTION A LA RECHERCHE D'UN NOUVEL ANTI-PARASITAIRE 25

<b>Introduction : <i>La maladie de Chagas</i></b>	25
<b>Chapître I : Deux approches pour la découverte de molécules actives</b>	27
I/ Choix d'une cible rationnelle pour une approche antiparasitaire	27
I-1/ Combattre le stress oxydatif est vital pour la cellule	27
I-2/ L'enzyme clé : la <i>trypanothion réductase</i>	28
II/ Deux stratégies possibles pour identifier des antiparasitaires	30
<b>Chapître II : Synthèse en phase solide du trypanothion</b>	32
I/ Description physico-chimique de T(S) <sub>2</sub>	32
II/ Mise au point d'une méthode de synthèse sur support solide de T(S) <sub>2</sub>	33
II-1/ Fixation à la résine	33
II-2/ Protection de la spermidine	34
II-3/ Stabilité du lien à la résine et déprotection de la spermidine	35
II-4/ Elongation de la chaîne peptidique	36
II-5/ Clivage, purification et rendements	38
III/ Discussion	38
<b>Chapître III : Premiers résultats du test de criblage du laboratoire</b>	39
<b>Conclusion</b>	41
<b>Publication : « Solid phase synthesis of trypanothione disulfide »</b>	

### PARTIE II : CHIMIE COMBINATOIRE 42

<b>Introduction : la nécessité de disposer d'un grand nombre de molécules pour les tests de criblage</b>	42
<b>Chapître I : « La chimie combinatoire, un accès rationnel à la diversité »</b>	43
I/ Définition et principe de la synthèse combinatoire	44
II/ Les principales stratégies d'identification structurale	47
II-1/ Les produits de la bibliothèques sont testés en solution	47
II-1-1/ La méthode itérative	47
II-1-2/ La méthode dite du « positionnal scanning »	49
II-1-3/ La méthode des bibliothèques orthogonales	50
II-2/ Les produits de la bibliothèques sont testés liés à un support solide	51
II-2-1/ « Une bille-un composé »	51
II-2-2/ L'étiquetage moléculaire	52
III/ La chimie combinatoire, un défi pour les organiciens	53
IV/ Conclusion	56
<b>Publication : « Synthèse combinatoire : les autoroutes de la diversité »</b>	



<b>Chapître II : Les bibliothèques orthogonales</b>	57
I/ Objectifs de la méthode	57
I-1/ Généralité de la méthode	57
I-2/ Minimisation des faux positifs	57
I-2-1/ Origine liée à la diversité structurale	58
I-2-2/ Origine liée à des réactions secondaires	59
I-3/ Simplicité de la déconvolution et respect de la confidentialité	60
II/ Principe général des bibliothèques orthogonales	61
III/ Synthèse et utilisation de deux bibliothèques de 15 625 tripeptides chacune	63
III-1/ Choix des molécules à synthétiser	63
III-2/ Organisation générale des bibliothèques	67
III-3/ Synthèse des deux bibliothèques	69
III-3-1/ Stratégie de protection des aminoacides	69
III-3-2/ Déroulement des couplages	70
III-3-3/ Schéma de la synthèse	71
III-4/ Conditions du criblage biologique	71
IV/ Résultats biologiques	72
IV-1/ Détermination de la structure du tripeptide actif	72
IV-2/ Intérêt thérapeutique de l'inhibiteur	74
V/ Confirmation de l'efficacité de la méthode orthogonale	74
VI/ Conclusion	76
<b>Publication : « Orthogonal combinatorial chemical libraries »</b>	
<b>Chapître III : Etude de relations structure/activité pour H-DTic-DTyr-DPnp-OH, tripeptide identifié grâce à la méthode orthogonale</b>	77
I/ Exploration structurale	78
II/ Stratégie de synthèse	79
II-1/ La stratégie de protection	79
II-2/ Utilisation de deux types de résines	80
II-3/ Principe de la synthèse des tripeptides	80
II-4/ Méthodes de purification et d'analyse	81
III/ Résultats biologiques	81
III-1/ Etude du rôle des fonctions N et C terminales	82
III-2/ Etude du rôle de la chiralité	84
III-3/ Etude du rôle des chaînes latérales des trois aminoacides	85
III-3-1/ Modulation de la position C terminale	86
III-3-2/ Modulation de la position intermédiaire	88
III-3-3/ Modulation de la position N terminale	89
III-3-4/ Analogues de H-DTic-DTyr-DPcp-OH	90
III-4/ Conclusion cette étude	92
IV/ Etude structurale de H-DTic-DTyr-DPcp-OH (14)	93
IV-1/ Modélisation moléculaire	93
IV-2/ Résultats de l'étude RMN	95
V/ Etude de l'effet de H-DTic-DTyr-DPcp-OH sur les récepteurs V <sub>2</sub> humains	97
VI/ Conclusion	97
<b>Chapître IV : La bibliothèque LYN</b>	99
I/ Présentation de la bibliothèque	99
I-1/ Stratégie générale	100
I-1-1/ Enjeux et bases de la chimie	100
I-1-2/ La présence des anhydrides et des amines	101
I-2/ Principe de la synthèse	101
II/ Etude préliminaire	103
II-1/ Etude comparée de la réactivité de 6 anhydrides	103
II-1-1/ Sélection des anhydrides	103
II-1-2/ Résultats	105
II-1-3/ Traitement ultérieur des résines	106
II-1-4/ Résultats analytiques	107

II-2/ Etude de la réactivité de 7 amines	110
II-2-1/ Sélection des amines	111
II-2-2/ Résultats	112
II-2-3/ Nécessité de disposer d'un test colorimétrique	113
II-2-4/ Résultats analytiques	114
II-3/ Réalisation d'une bibliothèque de validation de 27 produits	115
II-3-1/ Résultats obtenus pour une synthèse individuelle	116
II-3-2/ 27 produits synthétisés en mélange	118
II-4/ La fermeture des dimères peut-elle conduire à des imides ?	118
II-4-1/ Principe de l'étude de stabilité	119
II-4-2/ Résultats pour le dimère succinyl valine-O-Polymère	119
II-4-3/ Autre étude en parallèle	120
II-4-4/ Bilan de l'étude de stabilité	121
II- 5/ Conclusion de cette étude préliminaire	121
III/ Nomenclature et diversité de la bibliothèque	122
III-1/ Schéma de la diversité	123
III-2/ Nomenclature	124
IV/ Choix des synthons	124
IV-1/ Choix des aminoacides	124
IV-1-1/ Choix de la résine qui les supporte	124
IV-1-2/ Choix des protections des chaînes latérales	126
IV-2/ Choix des anhydrides cycliques	127
IV-3/ Choix des amines	129
IV-3-1/ Modélisation des amines	129
IV-3-2/ Groupement orthogonal	132
IV-3-3/ Nomenclature et conséquences sur les déconvolutions	135
IV-4/ Conclusion	135
V/ Synthèse et résultats	137
V-1/ Synthèse combinatoire de la bibliothèque LYN	137
V-1-1/ Rappel du principe de la synthèse	137
V-1-2/ Logistique de synthèse et mise en place du travail	137
V-1-3/ Traitement par HF	139
V-2/ Résultats	139
V-2-1/ Formation des dimères et nouvelles charges des résines	140
V-2-2/ Résultats avant coupure à l'acide fluorhydrique	140
V-2-3/ Résultats après coupure à l'acide fluorhydrique	141
VI/ Détermination de la structure d'un composé actif	142
VI-1/ Intérêt de l'identification	142
VI-2/ Déroulement de la déconvolution	143
VI-3/ Identification des produits actifs	145
VI-4/ Purification du brut <i>LYN/Gi/34</i>	148
VI-5/ Détermination structurale du produit par SM et RMN	149
VI-6/ Identification de la molécule la plus active du brut <i>LYN/Gi//34</i>	152
VII/ Discussion	153
<b>Conclusion</b>	154
<b>Conclusion de la partie combinatoire</b>	156

## **PARTIE III : SYNTHESE ORGANIQUE RAPIDE** 157

<b>Chapitre I : La synthèse organique à haut débit</b>	157
I/ Stratégie adoptée	157
I-1/ Les exigences de la bibliothèque idéale	157
I-2/ La synthèse parallèle à haut débit	158
I-2-1/ optimiser la diversité des futures bibliothèques	158
I-2-2/ Minimiser l'apparition des faux positifs	158
I-2-3/ Adapter les capacités de synthèse aux capacités de criblage	159

II/ Moyens employés pour réaliser la synthèse parallèle à haut débit	159
II-1/ Le robot	159
II-2/ Le format de synthèse	159
II-3/ L'outil informatique	160
II-4/ La sélection des synthons	160
III/ Stratégie chimique	160
IV/ Contrôles des produits de la réaction	161
V/ Défis futurs	162
<b>Chapître II : Ouverture d'anhydrides en solution</b>	163
I/ Préparations des matières premières	163
I-1/ Nécessité du contrôle analytique	163
I-1-1/ Les amines	163
I-1-2/ Les anhydrides	164
I-2/ Déshydratation des anhydrides	164
II/ Evaluation de la réaction	164
II-1/ Choix des modèles	165
II-2/ Conditions réactionnelles d'évaluation	166
II-3/ Résultats de la bibliothèque de validation	166
II-3-1/ Réactivité des amines avec l'anhydride phtalique	166
II-3-2/ Réactivité des anhydrides avec la phénéthylamine	169
III/ Stéréochimie de l'attaque nucléophile des anhydrides	172
III-1/ Régioisomérisation de l'attaque de l'anhydride 2,3-pyridine dicarboxylique par la phénéthylamine	173
III-2/ Comprendre l'attaque nucléophile sur un carbonyle	174
IV/ Préparation de la production	176
IV-1/ Sélection des synthons	176
IV-2/ Choix du format	176
IV-3/ Etablissement d'un plan de production	177
V/ Quelques résultats de la production	177
V-1/ Le premier jour de production	177
V-2/ Résultats de tous les contrôles	178
V-3/ Répartition statistique des rendements	179
VI/ Conclusion	179
<b>Chapître III : Utilisation des micro-ondes pour la synthèse de pyridazinediones</b>	
I/ Intérêt du chauffage micro-ondes en synthèse combinatoire	181
II/ Synthèse de pyridazinediones	182
II-1/ Méthode classique de synthèse des pyridazinediones	182
II-2/ Mise au point des conditions sur une réaction modèle	183
II-3/ Exploration de la généralité de la réaction. Recherche de ses limites	183
II-3-1/ Déclinaisons des anhydrides	183
II-3-2/ Déclinaisons des hydrazines	186
III/ Conclusion	187
<b>Publication : « Improved synthesis of pyridazinediones under microwave irradiation »</b>	

<b>CONCLUSION GENERALE</b>	188
----------------------------	-----

## PARTIE EXPERIMENTALE

<b>Généralités expérimentales</b>	191
<b>Partie 1/ Synthèse du trypanothion en phase solide</b>	192
I/ Conditions analytiques générales pour cette partie	192

II/ Synthèse du Trypanothion en phase solide	192
<b>Partie 2/ Chimie combinatoire</b>	195
<b>Relations structure/activité sur H-DTic-DTyr-DPnp-OH</b>	195
I/ Synthèse et analyse des produits de ce chapitre	195
II/ Synthèse générale	196
III/ Cas particuliers	198
III-1/ Importance des extrémités	198
III-2/ Importance de la chiralité	199
III-3/ Importance des chaînes latérales	200
IV/ Synthèse d'une grande quantité de H-DTic-DTyr-DPcp-OH	203
V/ Détermination de la capacité d'inhibition de la liaison de la vasopressine à son récepteur	204
<b>Bibliothèque LYN</b>	204
I/ Méthodes analytiques générales	204
II/ Etude préliminaire	205
II-1/ Etude comparée de 6 anhydrides	205
II-2/ Etude comparée de 7 amines	207
II-3/ Bibliothèque de validation	208
II-4/ Test de stabilité des dimères	209
III/ Synthèse de la bibliothèque LYN	210
IV/ Détermination de la structure d'un composé actif	213
<b>Partie 3 / Chimie automatisée</b>	216
I/ Ouverture d'anhydrides en solution	216
I-1/ Contrôle des anhydrides	216
I-2/ Protocole général d'ouverture des anhydrides par les amines	216
I-3/ Résultats analytiques	217
II/ Les pyridazinediones aux micro-ondes	226
II-1/ Procédure-type pour obtenir les pyridazinediones	226
II-2/ Méthodes de chromatographie	226
II-3/ Résultats analytiques	226

## Annexe

## Bibliographie

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA - acide aminé  
AcOH - acide acétique  
ADH - hormone anti-diurétique (vasopressine)  
Ala - alanine  
AMPC - adénosine monophosphate cyclique  
Arg - arginine  
Asn - asparagine  
Asp - acide aspartique  
Bn - benzyle  
BOP - benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate  
Cf - californium  
ch. - chapitre  
Cys - cystéine  
DCM - dichlorométhane  
DIEA - diisopropyléthylamine  
DMF - diméthylformamide  
éq. - équivalent  
ét. - étape  
Fmoc - 9-fluorényl méthyloxycarbonyl  
G(S)<sub>2</sub> - glutathion oxydé  
Gln - glutamine  
Glu - acide glutamique  
Gly - glycine  
GR - glutathion réductase  
GSH - glutathion réduit  
h - heure  
HBTU - hexafluorophosphate de benzotriazolyltétraméthyl uronium  
HF - acide fluorhydrique  
His - histidine  
HOBt - hydroxybenzotriazole  
HPLC - chromatographie liquide haute performance  
HTOS - high throughput organic synthesis  
HTS - high throughput screening  
IC<sub>50</sub> - concentration inhibitrice de 50% des liaisons ou de l'activité  
ie - impact électronique  
Igl - isoglutamine  
Igu - acide isoglutamique  
Ile - isoleucine  
Km - constante de Michaelis  
KSCN - thiocyanate de potassium  
Leu - leucine  
Lys - lysine  
MBHA - résine méthylbenzhydramine  
min - minute  
MM - masse moléculaire  
Mpi - acide 6-méthoxy-1,2,3,4-tétrahydro-9H-pyridine(3,4,b)-indole-1 carboxylique  
Naa - (2-naphtyl)-alanine  
OMS - organisation mondiale de la santé  
P - polymère  
Pcp - parachlorophénylalanine  
Pfp - parafluorophénylalanine  
pH - potentiel hydrogène

Phe - phénylalanine  
Phg - phénylglycine  
Pro - proline  
Pya - (3-pyridyl)-alanine  
RMN - résonance magnétique nucléaire  
sch. - schéma  
Ser - sérine  
SM - spectrométrie de masse  
T(S)<sub>2</sub> - trypanothion oxydé  
ta - température ambiante  
TBDPS - *tert*-butyldiphénylesilyl  
tBoc - tertibutyloxycarbonyle  
TFA - acide trifluoroacétique  
Thi - (β-thiényl)-alanine  
Thn - acide tétrahydronaphtalique  
Thr - thréonine  
Tic - acide tétrahydroisoquinoléine carboxylique  
TOF - time of fly  
tr - temps de rétention  
TR - trypanothion réductase  
Trp - tryptophane  
TSH - trypanothion réduit  
Tyr(2Br-Bzl) - tyrosine 2-bromobenzyle éther  
V<sub>2</sub>H - récepteur de la vasopressine de type 2 humain  
V<sub>2</sub>P - récepteur de la vasopressine de type 2 porcine  
Z - benzyloxycarbonyle

# **AVANT-PROPOS**

## AVANT-PROPOS

Le travail présenté ici s'articule en trois parties qui ont toutes un but commun : découvrir de nouvelles molécules actives dans le domaine de la pharmacie. Dans une première partie, nous avons abordé un exemple concret appartenant à la recherche des anti-parasitaires basé sur une cible enzymatique. Nous nous sommes ensuite intéressés à une nouvelle méthode pour obtenir rapidement des molécules pour les tests biologiques à haut débit : cette nouvelle méthode, la chimie combinatoire, est en train de révolutionner une étape clé dans la recherche de nouveaux médicaments, qui est l'identification des têtes de série. Le principe en est simple : il s'agit de générer rapidement toutes les combinaisons entre deux familles de réactifs ( $A_1, A_2, \dots, A_i$ ) et ( $B_1, B_2, \dots, B_j$ ) pour obtenir tous les produits possibles de  $A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1, \dots$  jusqu'à  $A_iB_j$ .

Cette thèse a commencé alors que la chimie combinatoire était encore à ses débuts, aussi, à travers ce travail, on pourra discerner les différentes phases de l'évolution de cette méthode au cours des quatre dernières années. D'abord basée sur une chimie exclusivement peptidique et aboutissant à des mélanges, la chimie combinatoire a progressivement évolué vers une chimie non peptidique, plus exigeante ne serait-ce que par les problèmes d'identification des produits actifs qu'elle soulève. La tendance actuelle est toujours de préparer toutes les combinaisons possibles entre deux familles de composés, mais individuellement dans un format miniaturisé et robotisable.

La chimie combinatoire telle qu'elle se conçoit désormais est source de préoccupations nouvelles pour le chimiste organicien : celui-ci doit avoir une meilleure connaissance de la réactivité de ses produits, utiliser des réactions « robustes », c'est-à-dire applicables à un grand nombre de réactifs, adapter ses réactions à un format miniaturisé, contrôler toutes les matières premières et mettre au point de méthodes analytiques rapides pour identifier les produits finaux. C'est ce que nous verrons à travers ce mémoire qui s'illustre de l'identification de 2 molécules actives : un inhibiteur des récepteurs  $V_2$  porcins de la vasopressine et un autre du facteur X, une enzyme clé



dans la cascade de la coagulation. Derrière l'approche combinatoire, se profilent tous les enjeux économiques, technologiques et financiers de l'industrie pharmaceutique et la chimie organique trouve là un nouveau domaine d'expansion depuis quelques années.

Le travail présenté a été réalisé en étroite collaboration avec Benoît Déprez et Xavier Williard.

## **RESULTATS**

# INTRODUCTION

## *La découverte d'une tête de série, clé de voute de la recherche pharmaceutique.*

L'étape clé dans la découverte d'un nouveau médicament est l'identification d'une entité moléculaire susceptible d'interférer avec un processus biologique normal ou pathologique. Cette entité doit être capable de se lier de manière efficace et spécifique à l'une des molécules naturelles qui interviennent dans la régulation du processus étudié. La molécule naturelle, qu'on appelle la « cible » peut être, par exemple, le récepteur d'une hormone. La liaison d'un ligand à ce récepteur peut, soit l'activer, si le ligand est un agoniste, soit empêcher son activation par l'hormone naturelle, si le ligand est un antagoniste. La cible peut aussi être une enzyme dont on bloque l'activité en occupant son site catalytique. Dans tous les cas, un ajustement moléculaire parfait du ligand à sa cible est l'un des garants de l'efficacité et de la spécificité de son action pharmacologique.

## **I/ LES STRATEGIES DE LA DECOUVERTE**

La découverte d'une telle tête de série (ou « lead » en Anglais), protégée par des brevets solides constitue donc une étape capitale dans le processus qui aboutit plusieurs années plus tard à la mise sur le marché d'un médicament. Cette étape est longtemps restée un processus lent, le plus souvent gouverné par le hasard et la chance. Pour tenter d'accélérer cette étape, des stratégies très différentes ont été élaborées. On peut citer parmi elles :

### **I-1/ Les « biotechnologies »**

Ces technologies permettent de produire chez des organismes génétiquement modifiés, de grandes quantités de ligands naturels, par exemple des hormones. Ces produits offrent l'avantage de rester très proches des mécanismes physiologiques. Malheureusement, le plus souvent, les médicaments qui en sont issus, en plus d'être coûteux, sont utilisables uniquement par voie parentérale en raison de leur fragilité métabolique.

## **I-2/ La modélisation moléculaire et le drug design "ab initio"**

Ils devaient permettre, connaissant avec précision la structure tridimensionnelle d'un récepteur, d'en concevoir par calcul un ligand idéal, en exploitant au mieux les interactions moléculaires potentielles. Si ces méthodes de modélisation sont devenues des outils précieux pour l'optimisation d'une tête de série existante, elles ne se sont pas montrées à la hauteur des espoirs qu'elles avaient suscités pour la conception *ab initio*. D'une part, les champs de force utilisés dans les différents algorithmes se sont révélés insuffisamment réalistes tant au niveau de la construction des modèles que de la modélisation des interactions entre les ligands potentiels et les récepteurs ; d'autre part, les structures chimiques ainsi définies ne sont pas forcément accessibles par voie synthétique.

Enfin, ces deux stratégies ont en commun le fait qu'elles conduisent à des solutions consensuelles dont le manque d'originalité ou la prédictabilité constituent un inconvénient significatif en termes de protection industrielle.

## **I-3/ Le criblage systématique**

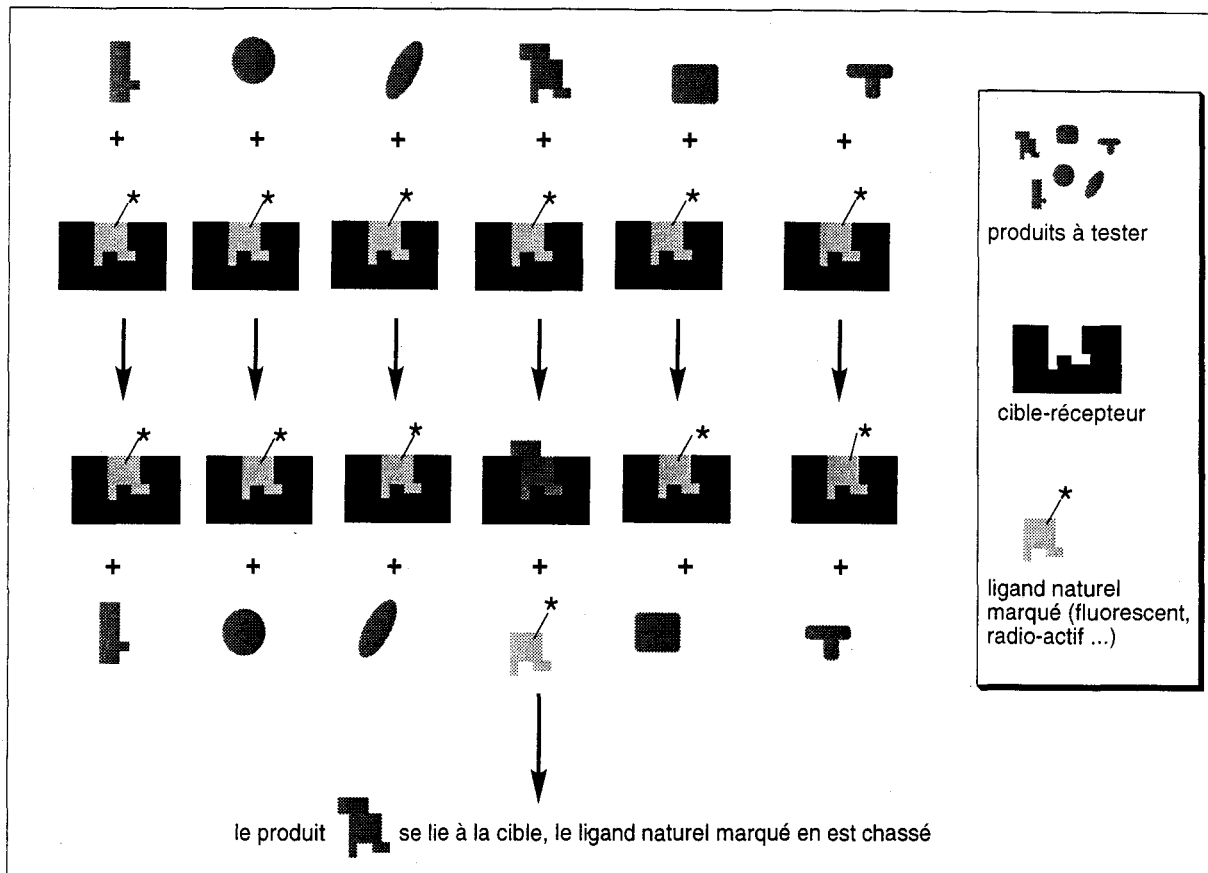
La stratégie actuellement privilégiée dans l'industrie pharmaceutique repose sur le criblage systématique (en Anglais « screening ») de collections de produits chimiques différents, appelés pharmacothèques.

La démarche est la suivante : après avoir relié un phénomène physiopathologique à un couple ligand/récepteur ou substrat/enzyme, un test permettant de visualiser cette liaison est mis au point. Dans le cas le plus simple, le récepteur (ou l'enzyme) est immobilisé sur un support solide et le ligand (ou le substrat) est modifié au moyen d'un marqueur qui le rend facilement identifiable. Si l'on ajoute à ce couple une entité chimique susceptible de s'associer au récepteur en occupant la place du ligand, le déplacement du ligand marqué sera facilement détecté (schéma n°1).

Le criblage peut être de type « binding » ou de type « fonctionnel ». Les tests de « binding » étudient simplement les capacités des molécules testées à se lier au récepteur (ou à l'enzyme), les tests fonctionnels, quant à eux, étudient les propriétés agonistes ou antagonistes. Cette méthode

« empirique » est celle qui a permis, et permet encore aujourd'hui, d'identifier le maximum de têtes de séries médicamenteuses. Elle prend son intérêt dans la rapidité des résultats obtenus et dans le grand nombre de molécules testées.

Schéma 1 : Illustration du criblage



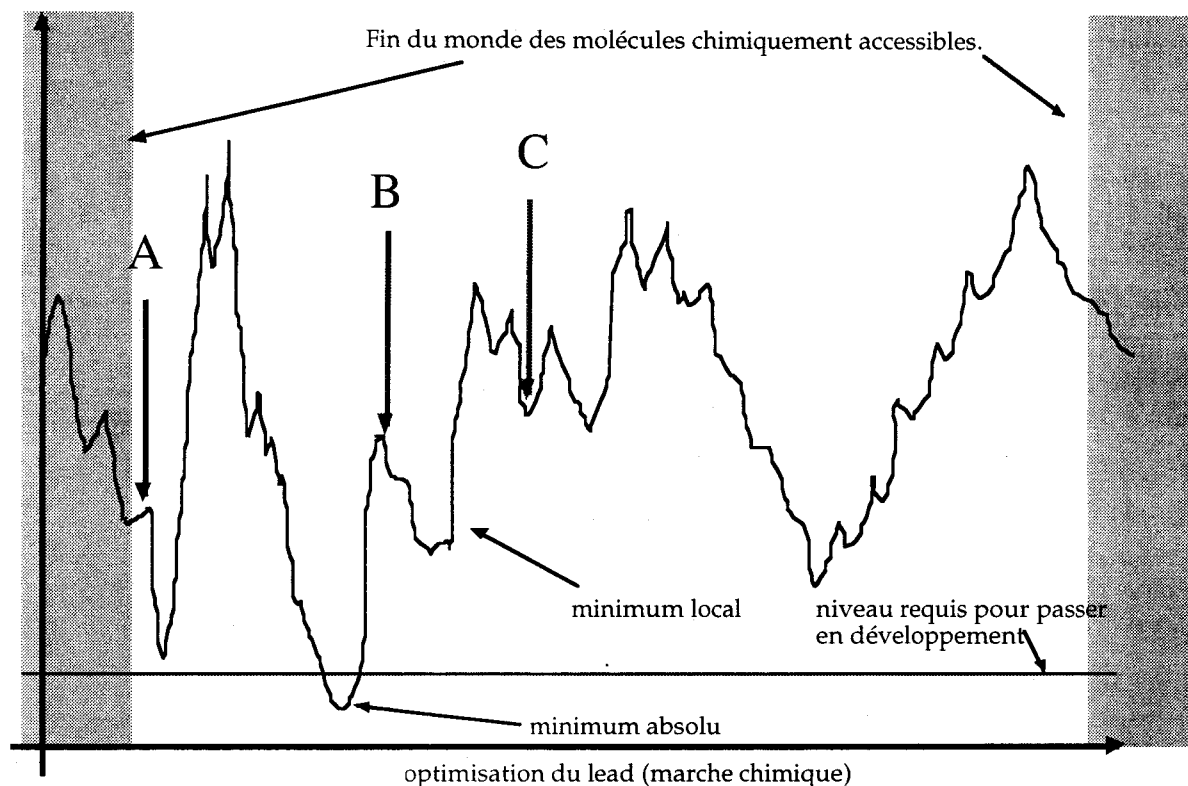
En général, le premier composé chimique identifié est appelé trivialement « touche » (ou « hit » en Anglais) et ne constitue pas le médicament final. En effet, il donne lieu à la synthèse de molécules de structures voisines qui permettront d'optimiser son activité. Le meilleur composé de l'étude, appelé « tête de série » sera celui qui retiendra l'attention des chimistes et pharmacologues : son identification constitue donc une étape très importante dans le processus de découverte d'un nouveau médicament.

Le contexte économique dans lequel évoluent les compagnies pharmaceutiques est extrêmement concurrentiel, et, pour accéder au marché dans les meilleures conditions, ces compagnies se livrent à une véritable guerre de vitesse : les délais de réalisation alloués aux projets diminuent.

On demande aux responsables de la recherche en amont d'accélérer leurs processus, et la chimie qui est devenue un des phénomènes limitants, se voit contrainte à une profonde évolution. Ceci s'observe notamment à l'étape de découverte primaire, pour laquelle il est devenu crucial d'alimenter les tests de criblage le plus rapidement possible avec des collections de composés les plus divers et les plus nombreux. Cette orientation est la conséquence de deux observations : l'optimisation des têtes de série requise avant le passage en toxicologie et en expérimentation clinique est une étape extrêmement laborieuse, et dont l'issue n'est jamais garantie.

Cette optimisation peut être modélisée sous la forme d'une marche chimique dans un espace multidimensionnel\*. Le chimiste synthétise des composés qui sont ensuite évalués dans un hyperespace dont les dimensions sont aussi variées que la biodisponibilité *per os*, les caractéristiques pharmacocinétiques et dynamiques (la sélectivité, la puissance, la toxicité...). Le schéma 2 montre une projection en deux dimensions de cet espace.

**Schéma 2 :** Symbolisation de l'espace multidimensionnel offert lors du criblage



\* F. Hyafil, Société Glaxo-Wellcome

Dans l'état actuel des connaissances, la marche dans cet espace se fait quasiment sans visibilité (il n'existe pas de modèles multiparamètres qui permettent de prédire de façon fiable dans les disciplines citées ci-dessus) et l'optimisation est bien souvent piégée dans un minimum local. Dans cet exemple, la molécule **A**, *a priori* le meilleur des trois candidats a, en fait, très peu de chances d'évoluer vers une structure convenable, c'est-à-dire située au-dessous du niveau requis pour passer en développement (la barre horizontale en bas de notre schéma). Tandis que la molécule **B**, moins bonne au départ sera facilement optimisée puisque les structures voisines sont très facilement améliorées, pour aboutir au minimum absolu. La molécule **C**, quant à elle, ne présente pas d'activité intéressante et est aussi difficilement optimisable.

Dans ce contexte, un effort important est maintenant consenti pour faire « tomber » sur cet hyperespace un très grand nombre de molécules : grâce au criblage systématique, cet espace est « arrosé d'une pluie de ligands »<sup>†</sup>, dont les optimisations se feront en parallèle, avec des chances d'aboutir rapidement à des structures développables.

Un avantage considérable du criblage systématique est que les composés identifiés sont les fruits d'une démarche purement empirique. Leur possibilité d'être un jour brevetés s'en trouve renforcée dans la mesure où leur activité n'était pas prévisible.

## **II/ LE CRIBLAGE A HAUT DEBIT (HIGHTHROUGHPUT SCREENING OU « HTS ») ET LA SYNTHÈSE COMBINATOIRE**

Etant donné les succès rencontrés avec cette approche systématique, d'énormes efforts ont été consentis pour augmenter le nombre de molécules susceptibles d'être soumises aux tests de criblage. La première étape a consisté en une automatisation des procédés, faisant en particulier appel aux robots utilisés dans les laboratoires d'analyse médicale. Il est possible actuellement d'évaluer entre 100 000 et 1 000 000 de composés chimiques différents par an dans un test de

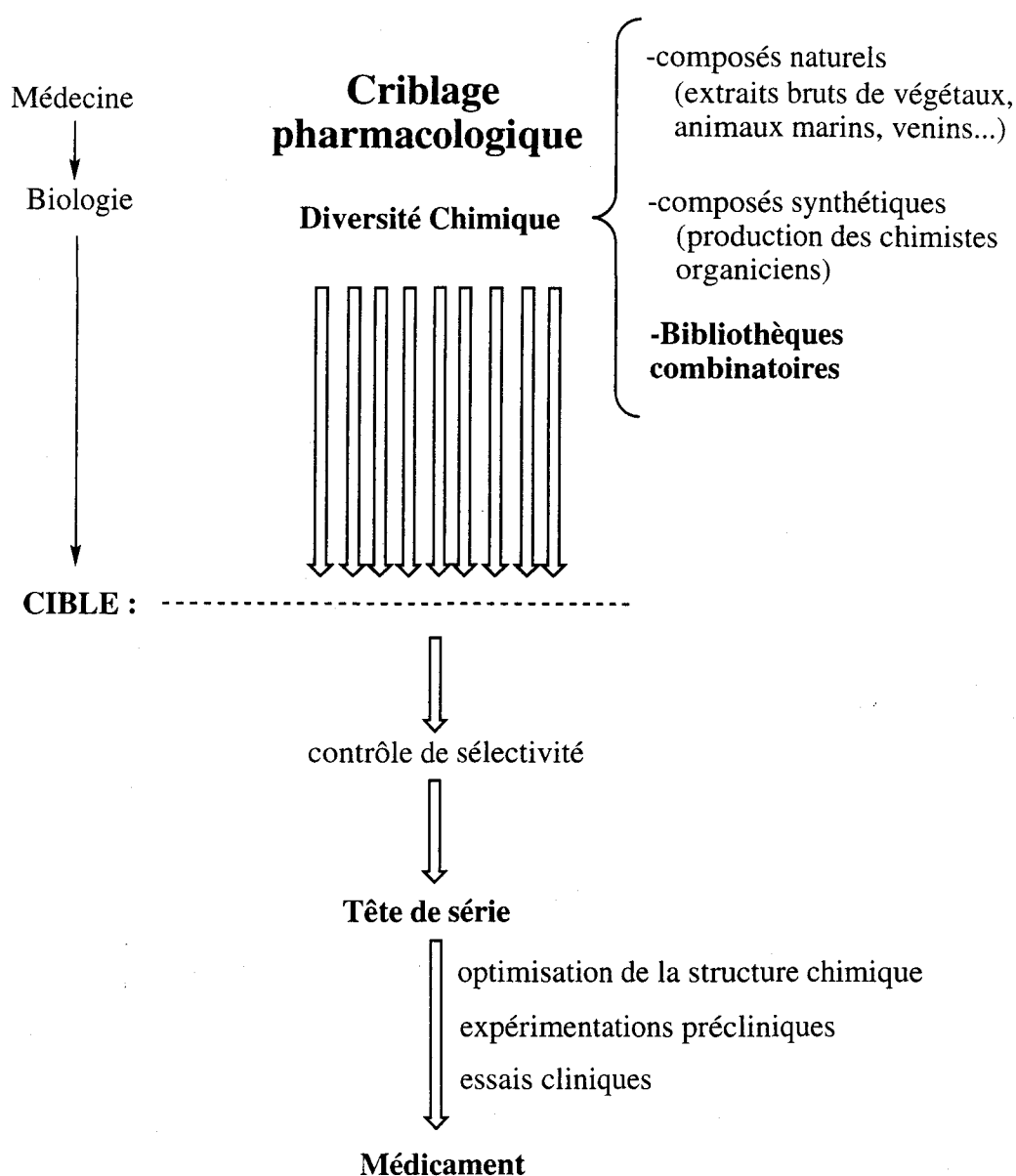
---

<sup>†</sup> B. Déprez, Société CEREP

criblage donné. La plupart des compagnies pharmaceutiques disposent de dizaines, voire de plus d'une centaine de tests de criblage différents.

Une autre clé du succès dans cette stratégie est l'accès aux composés soumis au criblage. Jusqu'à ce qu'apparaissent les méthodes de chimie combinatoire, ces composés avaient deux sources principales (schéma 3) : les sources naturelles et les pharmacothèques synthétiques.

**Schéma 3 : Le criblage pharmacologique**





## **II-1/ Les produits naturels**

Ils ont, de mémoire humaine, toujours représenté une source abondante et précieuse de structures biologiquement actives. Cette approche se heurte néanmoins à deux difficultés souvent sous-estimées : d'une part, quand une activité a été détectée, dans un extrait de plante par exemple, il est nécessaire de procéder à des opérations de purification et d'identification structurale souvent complexes, dont l'issue ne peut être garantie. Paradoxalement, un produit très actif est susceptible d'être détecté même s'il est très faiblement concentré. Ainsi, si sa détection est facile, son identification structurale risque d'être laborieuse (par un approvisionnement en matière première naturelle difficile, ou par la faible concentration en fractions actives...). D'autre part, une fois la structure connue, sa complexité peut en interdire toute tentative de synthèse économiquement viable, ce qui constitue un obstacle majeur, si l'approvisionnement à partir de la source naturelle est limité (on peut citer, par exemple, le taxol et ses dérivés). Il faut également souligner que les pays les plus riches biologiquement, situés dans les zones intertropicales, d'une part n'offrent pas toujours les meilleures garanties de stabilité politique et économique, et d'autre part, soucieux de protéger leur biodiversité, en limitent sévèrement l'accès.

## **II-2/ Les collections historiques de produits synthétisés à l'occasion des différents programmes de recherche des sociétés pharmaceutiques**

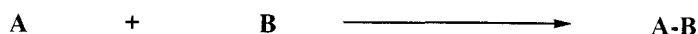
De telles collections, outre le fait qu'elles sont périssables (par consommation ou dégradation), présentent l'inconvénient de ne permettre d'explorer qu'une faible partie de la diversité moléculaire puisqu'elles sont, de par leur origine, focalisées sur certaines séries chimiques.

## **II-3/ Les méthodes de synthèse combinatoire**

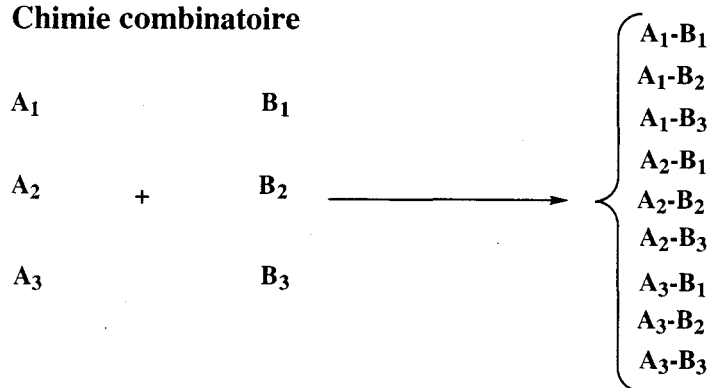
Elles sont apparues il y a 4 ans. Très rapidement, les pharmacothèques obtenues par ces méthodes ont constitué une alternative intéressante aux "collections historiques". Le principe de base est simple (schéma 4) : là où le chimiste fait réagir un produit **A** sur un produit **B** pour obtenir la molécule **A-B**, la chimie combinatoire utilise une famille de produits apparentés à **A** ( $A_1, A_2, A_3$ ) et les fait réagir sur une famille de produits apparentés à **B** ( $B_1, B_2, B_3$ ).

#### Schéma 4 : Principe de la chimie combinatoire

##### Chimie classique



##### Chimie combinatoire



On obtient ainsi, en une seule étape, neuf produits correspondant à toutes les combinaisons possibles, de  $A_1 \cdot B_1$  à  $A_3 \cdot B_3$ . Ces produits sont obtenus « en mélange » et ce mélange sera directement soumis aux tests de criblage. La quantité totale de produits générés est égale au produit des quantités de réactifs employés à chaque étape. Par exemple ici, 3 réactifs de type **A** et 3 réactifs de type **B** génèrent  $3 \times 3 = 9$  dimères différents. Plus généralement, si on emploie le même nombre de réactifs à chaque étape, **N**, et s'il y a **n** étapes, le nombre de dimères obtenus est de  $N^n$ , ici,  $3^2 = 9$ . Quand une activité est détectée, il faut alors procéder à l'identification du constituant responsable de cette activité. Il s'agit de la « déconvolution » ou « décodage ».

Plus récemment, la robotisation des réactions chimiques a permis de préparer les composés, non plus en mélange mais individuellement, ne retenant du principe initial que la capacité de générer de la diversité moléculaire par combinaison systématique de monomères différents.

**PARTIE 1**

**CONTRIBUTION A LA  
DECOUVERTE D'UN NOUVEL  
ANTIPARASITAIRE**

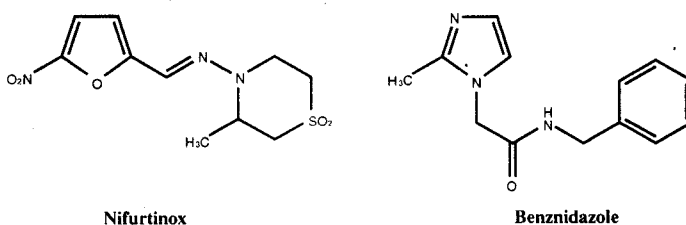
# INTRODUCTION :

## LA MALADIE DE CHAGAS

Les parasites protozoaires *Trypanosoma* et *Leishmania* sont à l'origine de nombreuses maladies à la fois chez l'homme et chez l'animal. Transmis par des insectes hématophages, ils infectent la circulation sanguine, le système lymphatique et d'autres organes tels que le coeur ou le cerveau. Chez l'homme, *Trypanosoma cruzi*, un protozoaire flagellé, est l'agent de la maladie de Chagas, contre laquelle il n'existe à ce jour aucune chimiothérapie réellement efficace. En Afrique, il existe de nombreux cas de maladie du sommeil causés par *T. brucei gambiense* et *T. brucei rhodiense*. Les *leishmania* sont, quant à elles, répandues dans la nature et sont à l'origine de maladies variées comme les leishmanioses humaines viscérales (Kala-Azar, causé par *L. donovani*), les leishmanioses cutanées (bouton d'Orient, causé par *L. Tropica*) et les leishmanioses cutanéomuqueuses (espundia, causé par *L. braziliensis*).

La maladie de Chagas, décrite pour la première fois en 1909 par Carlos Chagas<sup>1</sup>, est un problème de santé majeur en Amérique latine. Elle se présente de manière endémique dans la plupart des pays d'Amérique du Sud et d'Amérique Centrale. Sur une population totale de l'ordre de 360 millions d'habitants, on estime à 90 millions (soit 25% de la population) le nombre d'individus susceptibles d'être contaminés par *T. cruzi* et on compte environ 20 millions d'individus infectés recensés par l'OMS. Les deux seuls médicaments actuellement disponibles sur le marché, le Benznidazole et le Nifurtinox, ne sont pas dirigés contre un métabolisme propre au parasite et possèdent de nombreux effets secondaires.

**Schéma 5 :** molécules antichagasiques actuellement utilisées en thérapeutique



Il y a donc un besoin pressant de molécules qui soient plus spécifiques et plus efficaces pour lutter contre cette parasitose. Outre ces objectifs thérapeutiques, un médicament antichagasique doit avoir un faible prix de revient car il est destiné à des populations particulièrement démunies.

La recherche rationnelle d'antiparasitaires consiste à identifier des voies métaboliques propres au parasite afin de pouvoir développer des inhibiteurs qui n'interfèrent pas avec le métabolisme de l'hôte. Cette stratégie est d'autant plus efficace que la cible joue un rôle clé dans la survie du parasite.

*T. cruzi* est particulièrement sensible au stress oxydatif, aussi avons-nous choisi comme cible thérapeutique une enzyme essentielle à son système de défense contre les radicaux libres, la *trypanothion réductase*. Cette enzyme est spécifique du parasite et offre une cible de choix pour une approche antiparasitaire puisque :

- Elle joue un rôle analogue à la *glutathion réductase* dans un organisme qui en est dépourvu,
- En dépit de fortes homologues de séquence et de structure, *trypanothion réductase* parasitaire (TR) et *glutathion réductase* humaine (GR) se montrent mutuellement et totalement exclusives vis-à-vis de leurs substrats respectifs.

Nous avons donc deux voies différentes pour déterminer des inhibiteurs de l'enzyme : d'une part, la conception rationnelle d'inhibiteurs à partir de la structure tridimensionnelle de l'enzyme et de son substrat, d'autre part la mise en place d'un test en microplaque permettant de cribler un grand nombre de molécules différentes afin de déterminer de nouvelles têtes de série.

# CHAPITRE I :

## DEUX APPROCHES POUR LA DECOUVERTE DE MOLECULES ACTIVES

### I/ CHOIX D'UNE CIBLE RATIONNELLE POUR UNE APPROCHE ANTIPARASITAIRE

Comme nous l'avons vu, l'approche la plus prometteuse en matière d'agents anti-parasitaires consiste à identifier des voies métaboliques propres aux parasites étudiés, pour développer à terme des inhibiteurs spécifiques, donc non susceptibles d'interférer avec le métabolisme de l'hôte. Dans cette perspective, bloquer les moyens de défense contre le stress oxydatif chez les parasites de la famille des trypanosomatidés présente de nombreux avantages.

#### I-1/ Combattre le stress oxydatif est vital pour la cellule

Une fraction non négligeable de l'oxygène nécessaire au métabolisme cellulaire est convertie, par le biais de réactions secondaires en espèces oxygénées réactives (peroxydes, superoxydes, radical hydroxyle...). Ces composés sont hautement cytotoxiques à cause de leur aptitude à modifier les acides nucléiques, les protéines et les membranes lipidiques. Les parasites subissent le stress oxydatif, non seulement comme la conséquence de la vie aérobie, mais aussi comme principal effet des moyens de défense de l'hôte, puisque les leucocytes et les macrophages activés produisent des ions superoxydes.

Ainsi dans le cas de *T. cruzi*, le Benznidazole (nitroimidazole) et le Nifurtinox (nitrofurane) répondent-ils à une stratégie d'amplification du stress oxydatif (schéma 5).

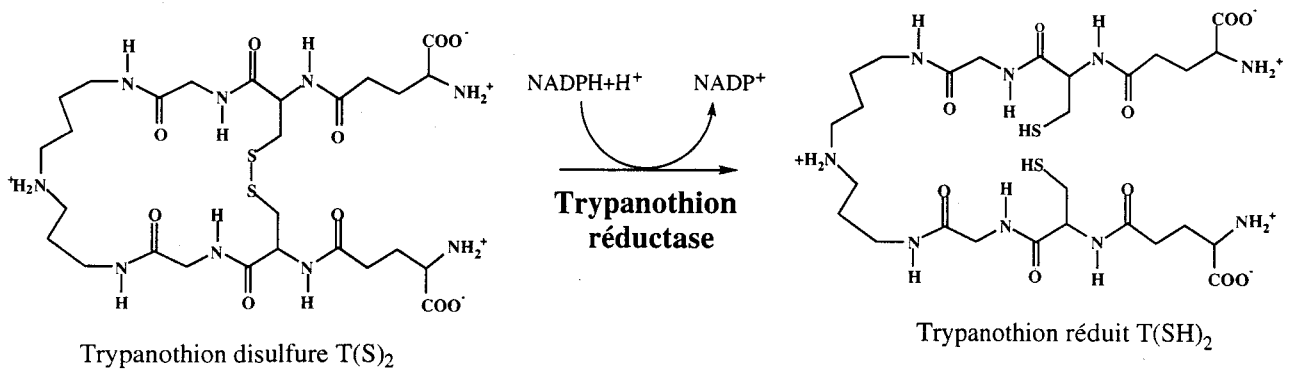
Sous l'action de nitroréductases, ces hétérocycles nitrés sont en effet engagés dans un cycle redox menant à la production d'espèces oxygénées réactives à l'origine de leur effet trypanocide.

Malheureusement, leur manque évident de spécificité se traduit par une toxicité importante limitant leur emploi à la phase aiguë de la maladie.

## I-2/ L'enzyme clé : la trypanothion réductase

Les trypanosomatidés ont développé un système spécifique pour lutter contre le stress oxydatif. Contrairement à presque tous les autres organismes vivants dont l'équilibre redox dépend d'un thiol particulier, le glutathion, les trypanosomatidés utilisent comme réducteur un conjugué (bis-glutathionyl)-spermidine appelé trypanothion ( $T(SH)_2$ ). Chez l'hôte vertébré, le glutathion est maintenu sous sa forme réduite par une flavoprotéine utilisant le NADPH, la *glutathion réductase* (GR). Chez le parasite, il n'existe pas de GR ; la réduction du trypanothion fait appel à un enzyme analogue, la *trypanothion réductase* (TR) (Schéma 6).

**Schéma 6 : Réduction du trypanothion par la TR**



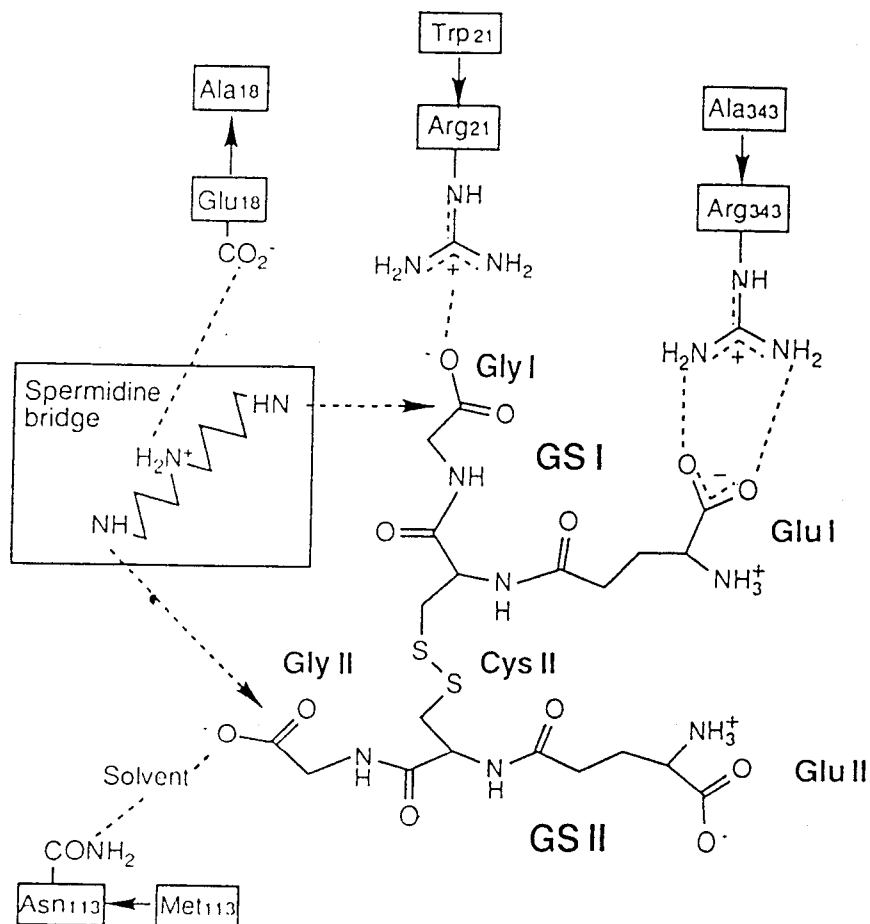
Cette différence offre une cible idéale pour une approche antiparasitaire puisqu'en dépit d'une parenté structurale étroite et d'une homologie d'environ 40% au niveau de leur structure primaire, la *trypanothion réductase* parasitaire et la *glutathion réductase* humaine sont mutuellement et totalement exclusives vis-à-vis de leurs substrats respectifs.

Nous reportons dans le schéma 7, un extrait de l'article de Walsh *et al.*<sup>2</sup> qui montre la différence entre le glutathion et le trypanothion au niveau du site actif de leurs réductases respectives.

En trait plein au centre, le glutathion interagit avec l'enzyme GR en plusieurs points du site actif par l'intermédiaire de liaisons ioniques : la fonction carboxylate de Gly I reconnaît une fonction

guanidinium portée par la chaîne latérale de l'Arg 21. La fonction carboxylate de Glu I engage une autre liaison ionique avec la chaîne latérale d'une autre arginine en position 343. La fonction carboxylate de Gly II forme une liaison ion-dipôle avec la chaîne latérale d'une asparagine en piégeant une molécule de solvant.

**Schéma 7 :** Différences entre glutathion et trypanothion au niveau de GR et TR respectivement



Le trypanothion est formé de deux molécules de glutathion reliées par un pont spermidine situé entre les fonctions carboxyliques des glycines C terminales (Gly I et Gly II). D'autres liaisons ioniques se forment au niveau du site actif de TR. La fonction amine secondaire de la spermidine, protonée, engage une liaison ionique avec la chaîne latérale d'un acide glutamique en position 18. Cet acide glutamique n'existe pas dans le cas de la GR et est remplacé par une alanine : le trypanothion ne pourrait pas se fixer à cet endroit. Dans TR, en position 21, se trouve un tryptophane : la fonction amide de Gly I peut interagir avec la chaîne latérale du tryptophane. La fonction carboxamide de Gly II interagit maintenant avec une méthionine en 113. Grâce à ce schéma, on distingue donc



aisément les différences primordiales entre TR et GR. Ceci justifie l'exclusivité des enzymes vis-à-vis de leur substrat.

## II/ DEUX STRATEGIES POSSIBLES POUR IDENTIFIER DES ANTIPARASITAIRES

Partant de la cible identifiée et validée, deux stratégies sont possibles pour identifier des antichagasiques.

Tout d'abord, le « drug design rationnel » consiste à proposer des structures inhibitrices après calculs et prévisions d'activité. Il est basé sur la connaissance de l'enzyme, de la structure du substrat et de leur mode d'interaction. Cette approche nécessite une synthèse rapide d'analogues du substrat modifiés de manière à leur conférer des propriétés inhibitrices, par exemple en remplaçant la liaison disulfure par un analogue non réductible<sup>3</sup>.

A l'époque où nous avons entrepris ce travail, il n'existait qu'une synthèse du trypanothion décrite<sup>4,5</sup>, comportant 8 étapes, elle se déroulait en phase homogène, nécessitait environ 8 jours de travail et son rendement global ne dépassait pas 10%. Nous avons donc mis au point une synthèse en phase solide qui permet d'accéder en 2 jours au trypanothion en phase solide avec un rendement global en produit isolé de 38%. Cette méthode est également applicable à la synthèse rapide d'analogues.

L'autre méthode est le criblage systématique d'un grand nombre de molécules. Dans ce cas, la connaissance de la structure du substrat n'est plus le point de départ de la démarche : ces informations sont remplacées par le nombre de composés testés qui dépasse la dizaine de milliers. Un test en microplaque a été mis au point au laboratoire<sup>6</sup> : l'activité inhibitrice d'une molécule donnée est évaluée par sa capacité à s'opposer à la réduction du ligand naturel  $T(S)_2$ . Une telle approche nécessite de disposer d'une quantité importante de  $T(S)_2$  pour les tests enzymatiques. Compte-tenu du prix élevé de ce substrat, il était indispensable de mettre au point une méthode rapide et efficace pour le produire en grande quantité.

C'est pourquoi nous avons proposé une méthode originale pour synthétiser rapidement  $T(S)_2$ . Quelle que soit l'approche choisie, cette synthèse en phase solide de  $T(S)_2$  apporte un gain de temps et un meilleur rendement par rapport à la méthode traditionnelle en phase homogène.

# CHAPITRE II :

## SYNTHESE EN PHASE SOLIDE

### DU TRYPANOTHION T(S)<sub>2</sub>

Le travail décrit ici a fait l'objet d'une publication :

« **Solid Phase synthesis of trypanothion disulfide** »

Valéry Fauchet, Line Bourel, André Tartar and Christian Sergheraert

*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **1994**, 4, (21), 2559-2562.

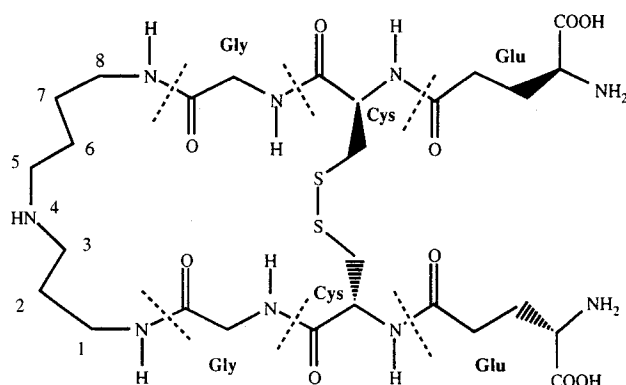
Cette synthèse du trypanothion disulfure T(S)<sub>2</sub> a été réalisée selon une stratégie originale en phase solide et a permis de fournir rapidement une grande quantité de substrat pour les tests enzymatiques<sup>vii</sup>.

Nous décrivons cette démarche après un rappel physico-chimique sur la molécule à synthétiser.

#### I/ DESCRIPTION PHYSICO-CHIMIQUE DU TRYPANOTHION

Le trypanothion est le N<sub>1</sub>,N<sub>8</sub>-bisglutathionyl spermidine disulfure (schéma 8).

**Schéma 8** : le trypanothion disulfure T(SH)<sub>2</sub> (1):



A des valeurs de pH physiologiques, le trypanothion disulfure T(S)<sub>2</sub> et sa forme réduite, le dihydrotrypanothion T(SH)<sub>2</sub> sont des zwitterions avec une charge nette de +1. Le pont spermidine confère un caractère hydrophobe à la partie carboxy-terminale de la molécule. Dans les mêmes conditions, le glutathion réduit GSH et le glutathion oxydé GSSG, ont respectivement une charge nette de -1 et -2. Ceci contribue certainement à la spécificité de substrat de la GR et de la TR.

Des études de modélisation moléculaire indiquent que  $T(S)_2$  et  $T(SH)_2$  peuvent adopter une conformation en feuillet  $\beta^8$ . Cependant la RMN montre que les deux peptides sont très flexibles en solution aqueuse<sup>9</sup>. Aucune des deux formes n'a encore été étudiée en cristallographie.

Enfin le potentiel standard  $E'_0$  du couple  $T(SH)_2 / T(S)_2$  a été mesuré par une technique de déplacement à l'équilibre. La valeur obtenue  $(-0,242 \pm 0,002 \text{ V})^{10}$  est légèrement plus électro-négative que celle du glutathion ( $E'_0 = -0,230\text{V}$ ).

## II/ MISE AU POINT D'UNE METHODE DE SYNTHESE SUR SUPPORT SOLIDE DU TRYPANOTHION DISULFURE

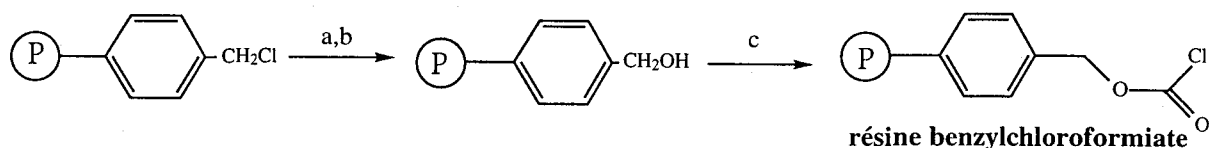
Une seule synthèse du trypanothion disulfure  $T(S)_2$  en phase homogène a été décrite par Fairlamb *et al.*<sup>1,12</sup>. Comportant 8 étapes, son rendement total n'est approximativement que de 10% et s'avère inadapté à la préparation rapide d'analogues structuraux. Nous avons préparé  $T(S)_2$  à l'aide d'une méthode en phase solide. Cette méthode nous est apparue intéressante, d'une part pour avoir accès plus rapidement au trypanothion lui-même mais également pour bénéficier d'une méthode rapide et facilement déclinable pour obtenir des analogues structuraux. Une des étapes clés de cette synthèse est la protection sélective des fonctions amines primaires  $N_1$  et  $N_8$  de la spermidine pour permettre la fixation au polymère par la fonction amine secondaire  $N_4$ . Après déprotection des fonctions amines primaires, l'élongation de la partie peptidique symétrique est poursuivie selon la technique classique de synthèse peptidique en phase solide.

### II-1/ Fixation à la résine

Afin d'assurer la liaison chimique entre le polymère et la fonction amine secondaire  $N_4$  de la spermidine, nous avons choisi la fonction benzyloxycarbamate, analogue à la protection des amines «benzyloxycarbonyle» (Z). Celle-ci est compatible avec les stratégies «Boc» et «Fmoc» utilisées en synthèse peptidique et peut être coupée du polymère par traitement à l'acide fluorhydrique anhydre. Pour obtenir le polymère fonctionnalisé, une résine chlorométhylée est d'abord traitée avec de l'acétate de potassium (schéma 6) ; le produit est converti dans sa forme hydroxylée par saponification et enfin,

un traitement par le phosgène dans le toluène permet d'obtenir la résine benzylchloroformiate avec un rendement quantitatif.

**Schéma 9 : Fonctionnalisation de la résine de Merrifield**

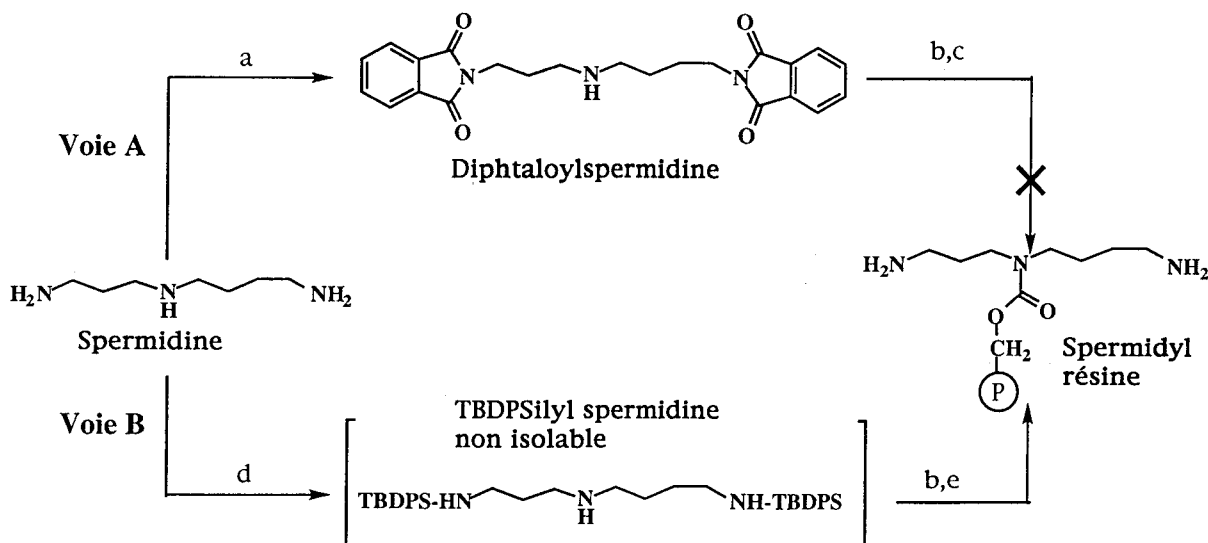


a)  $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{K}^+$  ; b)  $\text{NaOH}$ , 0,1M ; c)  $\text{COCl}_2$

## II-2/ Protection de la spermidine

Une stratégie de protection adaptée et sélective des fonctions amines primaires  $\text{N}_1$  et  $\text{N}_8$  de la spermidine consiste à utiliser le N-éthoxycarbonylphtalimide<sup>13</sup> (schéma 7, voie A) qui ne réagit pas avec les fonctions amine secondaires.

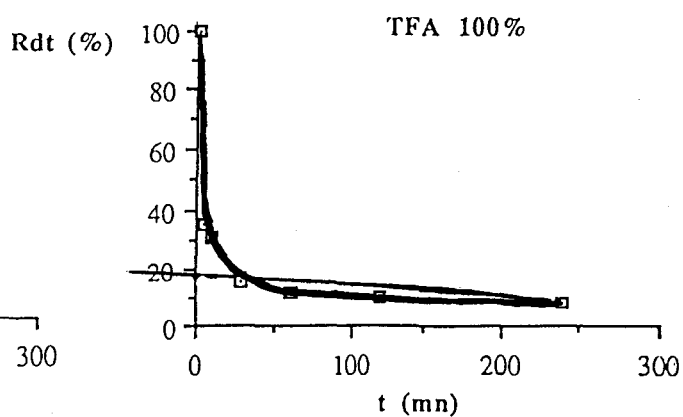
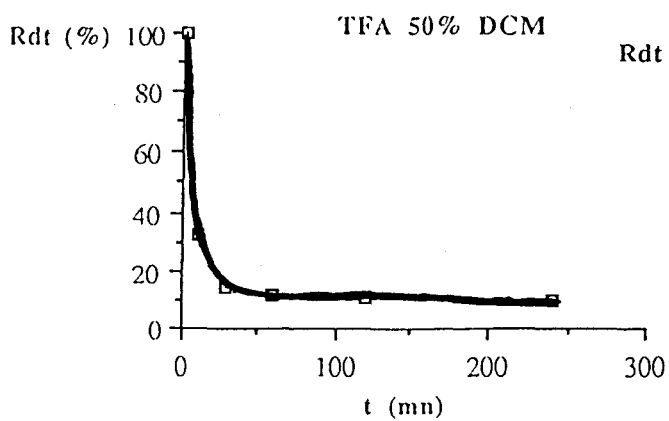
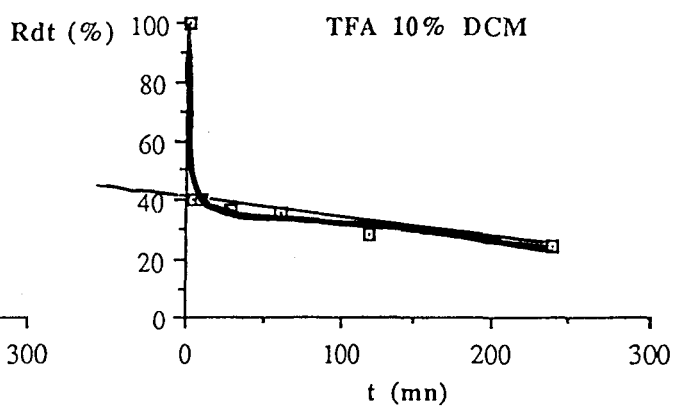
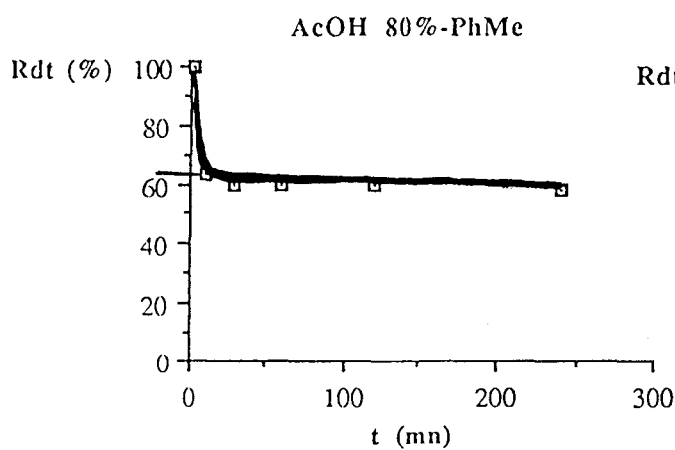
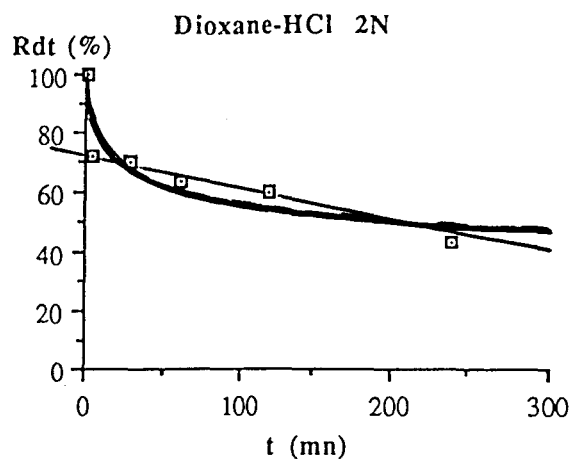
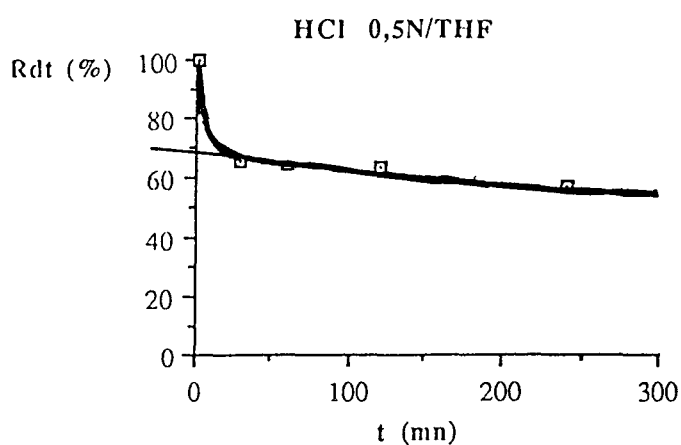
**Schéma 10 : Protection de la spermidine**



a) N-éthoxycarbonylphtalimide,  $\text{CHCl}_3$ , 45 min, ta ; b) polymère- $\text{OCOCl}$ , DIEA, DCM, 72h, ta ; c)  $\text{N}_2\text{H}_4$ , DCM, 10 min, ta ; d) TBDPS-Cl, TEA, MeCN, 4h, ta ; e) THF/HCl 0,5N 2/1 v/v, 15 min.

En utilisant ce réactif introduit par Nefkens<sup>14</sup>, nous avons obtenu, avec de bons rendements, la  $\text{N}_1, \text{N}_8$ -diphtaloylspermidine qui a pu ensuite être aisément couplée à la résine chlorométhylée. Cette première approche s'est cependant soldée par un échec car le lien spermidine-résine s'est montré instable dans les différentes conditions d'hydrazinolyse utilisées pour déprotéger les groupements « phtaloyl ».

Schéma 11 : Stabilité du lien résine-spermidine



Ceci nous a conduit à employer une autre protection spécifique des amines primaires, le groupement *tert*-butyldiphénylesilyl (TBDPS)<sup>15</sup>, (schéma 7, voie B) dont l'encombrement stérique important permet une introduction spécifique sur les fonctions amines primaires.

### II-3/ Stabilité du lien résine-spermidine et déprotection de la spermidine

Le clivage du groupe TBDPS a été étudié dans différentes conditions acides et pour des temps de réaction croissants. Nous avons constaté que dans les conditions acides, en même temps que la déprotection, une partie de la spermidine se décroche de la résine. La stabilité du lien spermidine-résine a été évaluée par détermination de la quantité de résidus amines présents sur la résine après déprotection comparé à la charge de la résine évaluée avant l'étape de déprotection. A cause de la labilité de la protection TBDPS dans les conditions acides, les valeurs rapportées correspondent à la fois à la somme des fonctions amines libres et des fonctions amines encore protégées.

**Tableau 1** : stabilité du lien résine-spermidine avec les différents agents de déprotection

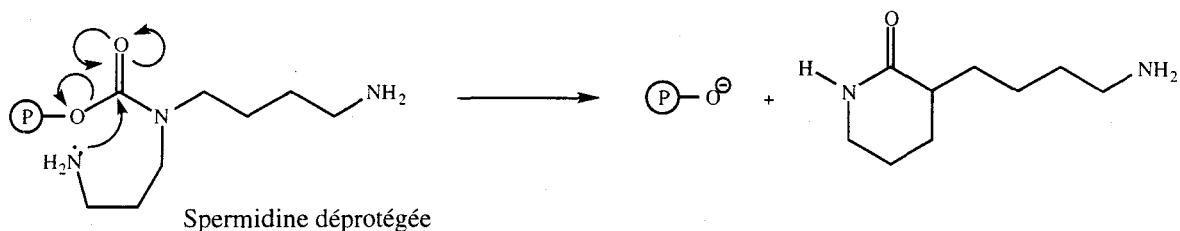
Réactifs de déprotection Temps	HCl 0,5N dans le THF	HCl 2N dans le dioxane	AcOH dans le toluène	TFA pur	TFA 50% dans le DCM	TFA 10% dans le DCM	Bu <sub>4</sub> N <sup>+</sup> F <sup>-</sup> 1M dans le THF
5	78	67	62	31	31	35	incomplet
10	72	67	58	28	29	35	incomplet
30	60	65	56	15	12	36	incomplet
60	59	59	56	11	11	35	incomplet
120	58	54	56	9	10	28	28
240	52	39	55	7	9	24	28

La qualité de la déprotection a été vérifiée en utilisant un test de Kaiser qualitatif<sup>16,17</sup> après couplage du premier aminoacide protégé (la Fmoc-glycine). La déprotection est complète après 5 minutes de réaction. Ci-contre, les courbes schématisent les données chiffrées (schéma 11). Elles montrent que, quelles que soient les conditions utilisées, le nombre de fonctions amine présentes sur la résine décroît avec le temps, ce qui confirme la labilité du lien spermidine-résine précédemment observée. Cependant, des rendements satisfaisants ont pu être obtenus en utilisant des conditions moyennement acides (HCl 0,5N/THF 1/2 v/v) et un court temps de déprotection (15 min), suivi immédiatement de l'étape de couplage. Nous avons choisi ce réactif. La nouvelle charge de la résine est calculée après

fixation du premier aminoacide et hydrolyse acide totale. La Fmoc-Gly-OH réagit en excès (2,5 éq. par rapport à la charge théorique de la résine), une analyse HPLC des aminoacides permet de connaître par unité de masse de résine la quantité de glycine fixée. La charge de la résine est alors calculée en mmol/g. La valeur est recalculée à chaque synthèse et permet d'ajuster la stoechiométrie des réactifs qui seront ensuite utilisés.

Pour expliquer la labilité du lien spermidine-résine, nous pouvons proposer un mécanisme de réaction intramoléculaire favorisée par la formation d'un cycle à 6 sommets comme le montre le schéma 12.

**Schéma 12 :** Réaction intramoléculaire de la spermidine et « auto-décrochage »

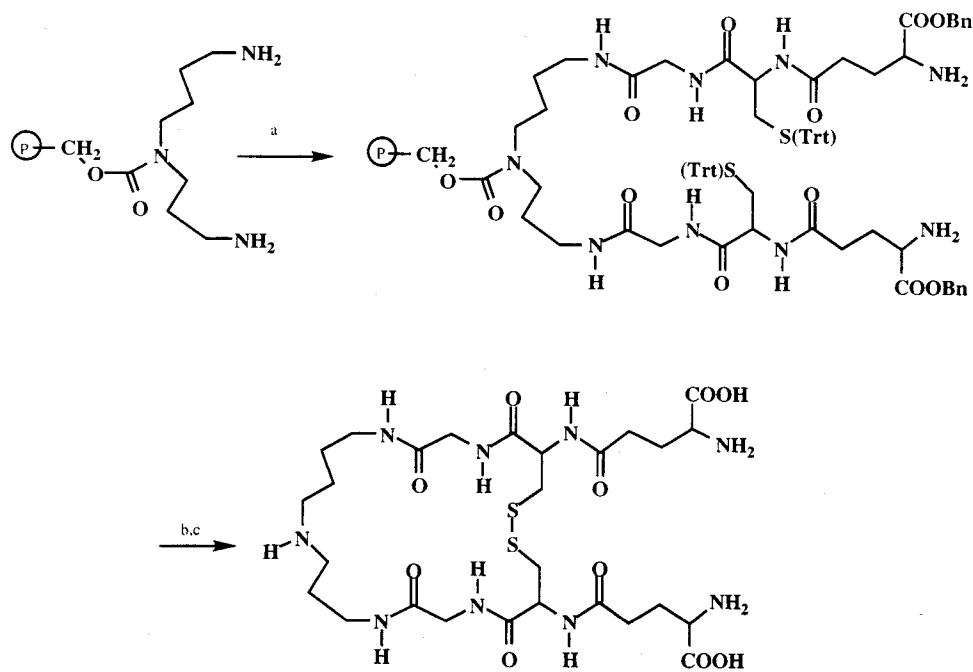


#### II-4/ Elongation de la chaîne peptidique

Après déprotection des fonctions amines primaires de la spermidine, la chaîne peptidique a été assemblée selon une stratégie utilisant le groupe protecteur Fmoc, labile en milieu basique, par le couplage successif de Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH et Z-Glu( $\gamma$ -OH)-OBn (schéma 8).



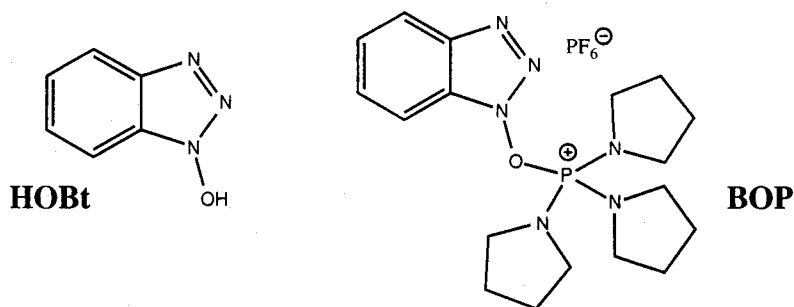
**Schéma 12 : Schéma de la synthèse du trypanothion en phase solide**



a) aminoacides (Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Cys(S-Trt)-OH, Z-Glu(OH)-O-Bn), HOBt, BOP, DIEA, DMF (HOBt/BOP/aminoacide protégé dans un ratio de 1/1/1) pendant 3 h, 2,5 éq. puis pipéridine/DMF 1/4 v/v pendant 30 min. b) HF, paracrésol, parathiocrésol, 1h à 0°C. c) oxydation par l'oxygène atmosphérique à ta, NH<sub>4</sub>OAc, pH à 8,5, 72 h.

Les réactions de couplage ont été faites dans le DMF en utilisant l'hydroxybenzotriazole (HOBt) et le benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino) phosphonium hexafluorophosphate<sup>xviii</sup> (BOP, schéma 14) comme agents de couplage, en présence de DIEA.

**Schéma 14 : l'Hydroxybenzotriazole (HOBt) et le benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino) phosphonium hexafluorophosphate (BOP)**



Le clivage des groupes protecteurs Fmoc a été réalisé par action de la pipéridine dans le DMF. Les rendements des couplages ont été déterminés après déprotection au moyen du test de Kaiser quantitatif. A la fin de la synthèse, une analyse d'acides aminés, après hydrolyse acide totale de la peptidyl-résine a permis de confirmer la bonne incorporation des aminoacides. La quantification de

l'acide glutamique, le dernier aminoacide incorporé sur la résine indique un rendement de 67% calculé sur la base de la charge initiale de la résine, la principale cause étant l'instabilité de la liaison résine-spermidine lors de la première déprotection (schéma 12).

## II-5/ Clivage, purification et rendement

La coupure de la peptidyl-résine a été réalisée selon les conditions standard de la coupure à l'acide fluorhydrique, le résidu acide a été lyophilisé. Le lyophilisat dihydrotrypanothion (TSH) a été aussitôt oxydé. L'oxydation est réalisée par l'oxygène atmosphérique à température ambiante et suivie par HPLC en phase inverse. Une fois l'oxydation terminée, une HPLC préparative a permis d'obtenir le trypanothion disulfure  $T(S)_2$  avec un rendement total en produit isolé de 38%.

La pureté du produit purifié a été vérifiée par HPLC en phase inverse et par électrophorèse capillaire. La co-injection du produit de la réaction avec un produit de référence obtenu en phase homogène selon la méthode de Fairlamb donne un pic unique. La spectrométrie de masse des produits oxydés et réduits donne effectivement les pics attendus respectivement à  $M/z = 723 (M+H^+)$  pour le produit oxydé et  $M/z = 725 (M+H^+)$  pour le produit réduit. Enfin, dans un test enzymatique avec la TR, une valeur de la constante de Michaelis ( $K_m$ ) de 50  $\mu M$  a pu être déterminée, ce qui correspond à la valeur publiée<sup>xix</sup>.

## III/ DISCUSSION

- Nous avons montré que l'utilisation de la phase solide est adaptée à la synthèse du trypanothion disulfure  $T(S)_2$ . Grâce à cette technique, nous avons non seulement amélioré le rendement de synthèse mais aussi considérablement raccourci le temps nécessaire à la synthèse qui n'est plus ici que de 2 jours.
- Puisque cette synthèse est relativement courte et aisée, cette méthode peut être adaptée à la préparation d'analogues de  $T(S)_2$ , de structure peptidique ou pseudo-peptidique, dans le cadre d'une approche rationnelle de synthèse d'analogues dont la structure est voisine de celle du substrat.
- $T(S)_2$  a toutefois le désavantage d'être une structure peptidique. Une mauvaise biodisponibilité par voie orale est prévisible pour les analogues dont la structure serait purement peptidique. L'identification d'une tête de série paraît difficile avec cette méthode rationnelle. En revanche, le criblage systématique a davantage de chances de rapidement fournir des pistes pour des têtes de série.

# CHAPITRE III :

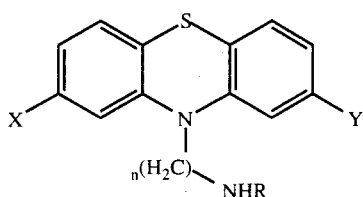
## PREMIERS RESULTATS DU TEST DE CRIBLAGE DU LABORATOIRE

Des milliers de composés ont déjà été évalués par le groupe de Christian Sergheraert sur le test d'inhibition de la TR mis au point au laboratoire. Parmi les têtes de série qui se sont distinguées au cours du test, les phénothiazines, leurs analogues amino-2-diphénylsulfures et les monoindolylmaléimides se sont révélés être de bons inhibiteurs de TR.

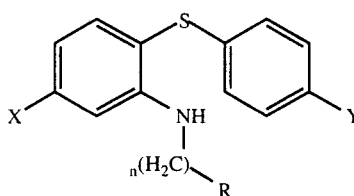
### I/ CAS DES AMINO-2-DIPHENYLSULFURES

Des composés de la famille des phénothiazines ont montré un pouvoir inhibiteur intéressant. Les capacités trypanocides de ces composés avaient déjà été décrites<sup>20</sup>. Malheureusement, les concentrations requises pour l'activité trypanocide de ces molécules sont largement supérieures aux concentrations auxquelles se manifeste l'effet neuroleptique, ce qui interdit toute utilisation clinique. Les amino-2-diphénylsulfures gardent, quant à eux, un pouvoir trypanocide tout en ne présentant pas d'activité neuroleptique significative. Une étude de relations structure/activité, réalisée par Sophie Girault, est en cours au laboratoire.

Schéma 15 : Phénothiazines et amino-2-diphényl sulfures



Phénothiazines

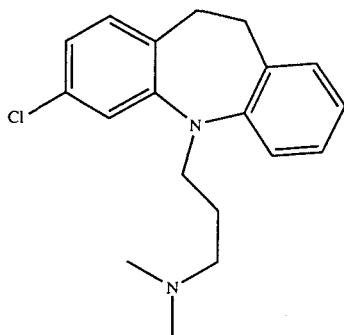


Amino-2-diphénylsulfures

## II/ CAS DES MONOINDOLYLMALÉÏMIDES

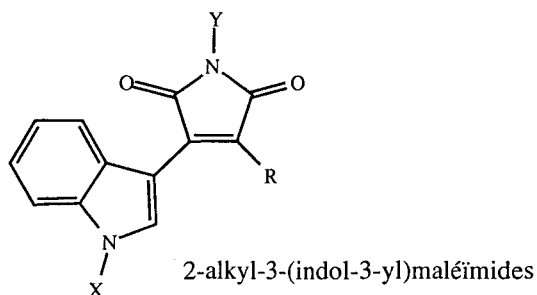
Les valeurs obtenues pour ces produits sont du même ordre que celles de la clomipramine (schéma 16), qui est la molécule de référence. Leur activité inhibitrice est en moyenne 10 fois meilleure que pour les amino-2-diphénylesulfures les plus intéressants.

Schéma 16 : la Clomipramine



Toutefois la structure monoindolylmaléïmide pose des problèmes en termes de synthèse. Des produits plus faciles à synthétiser, donc moins coûteux doivent être envisagés. C'est le travail de thèse de Laurence Salmon.

Schéma 17 : Monoindolylmaléïmides



En conclusion, le criblage systématique a déjà porté ses fruits puisque des molécules actives ont été identifiées. Toutefois, comme les molécules retenues ici ont encore quelques désavantages, il faut poursuivre la recherche de composés actifs par le criblage de nouvelles molécules.

## CONCLUSION DE LA PARTIE N°1

La *trypanothion réductase* est une cible intéressante pour trouver des médicaments antichagasiques puisque son action est spécifique. Nous avons fourni, par une synthèse rapide en phase solide, une quantité importante de ligand naturel nécessaire au test biologique. Cette synthèse est applicable à la préparation d'analogues du trypanothion. Il reste donc à identifier des inhibiteurs pertinents de l'enzyme.

Comme nous l'avons dit plus haut, il y a plusieurs origines possibles pour les molécules candidates au criblage : premièrement, les pharmacothèques des firmes pharmaceutiques (des collections de molécules préparées par les chimistes, souvent le reflet d'une politique de recherche particulière, comme les phénothiazines citées ci-dessus), deuxièmement, les molécules d'origine naturelle (provenant des règnes minéraux, végétaux et animaux, de jus de fermentations bactériennes, de champignons...) et enfin les bibliothèques de composés synthétisés par les chimistes avec un souci de diversité et de reproductibilité appelées les bibliothèques combinatoires.

Dans la mesure où des collaborations avec des firmes pharmaceutiques étaient en cours et allaient constituer le premier type d'approvisionnement du test TR, dans la mesure où également des collaborations avec, par exemple, l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération nous assuraient le deuxième type d'approvisionnement, nous avons décidé de nous tourner vers le troisième type d'approvisionnement, à savoir la préparation de bibliothèques combinatoires.

Parallèlement à ce travail, s'était développée au laboratoire une équipe de chimie combinatoire dès Juillet 1992. Elle présentait l'avantage de répondre au besoin en bibliothèques de composés chimiques diverses et reproductibles. C'est cette équipe que nous avons rejointe pour participer à ses travaux.

## SOLID PHASE SYNTHESIS OF TRYPANOTHIONE DISULFIDE

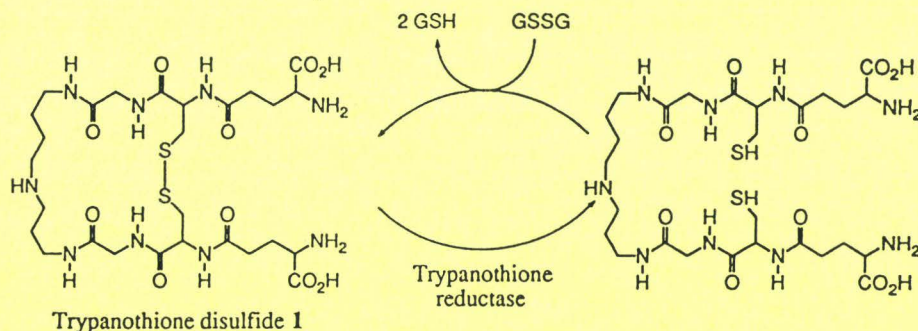
Valéry Fauchet, Line Bourel, André Tartar and Christian Sergheraert\*

Institut Pasteur de Lille, Service de Chimie des Biomolécules, URA CNRS 1309,  
 Faculté de Pharmacie de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France.

**Abstract :** The synthesis of trypanothione disulfide **1** was performed according to an original solid phase strategy. The key step involves the selective protection of the primary amines of spermidine with tertbutyldiphenylsilyl chloride followed by coupling the disilyl derivative on a methylchloroformylated polystyrene resin. After deprotection and assembly of the peptidic chain, treatment of the resin with HF, followed by oxidation and purification afforded **1** in 38% yield.

In mammalian cells, the tripeptide L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinylglycine (glutathione, GSH) plays a pivotal role against many types of potential cellular damage<sup>1</sup>, these reactions result in the oxidation of GSH to the disulfide form (GSSG). In order to complete the cycle, GSSG is in turn reduced by a specific *glutathione disulfide reductase*. Trypanosomidae, including the pathogenic species responsible for South American Chagas' disease and African sleeping sickness do not possess a classical GSH-based redox system. They use instead a glutathione-spermidine conjugate N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(glutathionyl)disulfide)spermidine named trypanothione disulfide **1** reducible by a *trypanothione disulfide reductase* (figure 1). Thus trypanothione itself and the enzymes that control its metabolism represent an important target for the development of new non-toxic anti-parasitic drugs.

Figure 1



<sup>0</sup> Up to now, only one synthesis of **1** in homogenous phase has been described, involving eight steps and an approximately 10% overall yield<sup>2,3</sup>. Here we report the preparation of **1** by a convenient solid phase peptide synthesis (SPPS) method. A key step of this synthesis is the selective protection of the N<sup>1</sup> and N<sup>8</sup> primary amino groups of spermidine **2** (figure 2) to allow its attachment to a resin through the N<sup>4</sup> secondary amino group. After deprotection of the primary amino groups, the symmetrical peptide chain elongation can be continued according to a classical SPPS procedure.

Few reports are available in which the amino group of an amino acid is linked to a resin for SPPS. As a linkage between polymer and secondary amine, a benzyl carbamate structure analogous to the benzyloxycarbonyl amino-protecting group appeared promising because this protection is compatible with both Boc and Fmoc<sup>4</sup> strategies and can be cleaved by treatment with anhydrous hydrogen fluoride. Although an

early paper on the use of a methylchloroformylated styrene divinylbenzene<sup>5</sup> resin has been published in 1970 by Merrifield<sup>6</sup> in an attempt to develop a  $\text{NH}_2 \rightarrow \text{COOH}$  stepwise elongation strategy for SPPS, the only other report which we found in the literature was made in 1993 and concerned the preparation of para-nitroanilides peptides<sup>7</sup>. To obtain this functionalized polymer, a chloromethylated resin (0.7 meq/g) is first treated with potassium acetate; the product is converted to the hydroxymethylated form by saponification and a final treatment with phosgene in toluene affords the methylchloroformylated resin in quantitative yield<sup>8</sup>.

A convenient and selective protection of the  $\text{N}^1$  and  $\text{N}^8$  primary amines of spermidine **2** has been reported using *N*-ethoxycarbonylphthalimide<sup>9</sup>. Using this reagent introduced by Nefkens<sup>10</sup>, we obtained in a good yield  $\text{N}^1, \text{N}^8$ -diphtaloylspermidine **3** which was easily coupled on the chloromethylated resin as judged by determination of chloride ions liberated from the resin and IR spectroscopy of the resulting polymer. However, the spermidine-resin linkage proved to be unstable to the different hydrazinolysis conditions used to deprotect the phtaloyl groups (figure 2).

Therefore, an other specific protective group of primary amines, the bulky *tert*-butyldiphenylsilyl (TBDPS)<sup>11</sup> was used. Spermidine **2** was treated with TBDPS-Cl (3 equivalents) and triethylamine (4.5 equivalents) in acetonitrile (figure 2).  $\text{N}^1, \text{N}^8$ -disilylated spermidine **4** was characterized by time of flight mass spectroscopy but was not stable enough to be purified and was thus directly coupled after addition of dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$  4/1 v/v) to increase the swelling of the resin. The efficiency of the coupling was determined by a quantitative Kaiser test<sup>12</sup> (the TBDPS protecting group is labile in these conditions); a quantitative yield (with respect to the initial load of the methylchloroformyl resin) was evaluated by measurement of the absorbance ( $\epsilon=30000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  for the spermidine-ninhydrine complex at 570 nm).

Regeneration of the primary amino groups from their TBDPS derivatives under various acidic conditions<sup>11</sup> [0.5N HCl/THF (1/2 v/v); 2N HCl (dioxane);  $\text{CH}_3\text{COOH}$ /toluene (4/1 v/v); pure  $\text{CF}_3\text{COOH}$  or  $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1/1 or 1/9 v/v)], as well as with 1M tetrabutylammonium fluoride (THF)<sup>13</sup> was studied using increasing reaction times. The stability of the spermidine-resin linkage in these conditions was evaluated by determination of amino groups available on the resin. Due to the lability of the silyl protective group in the Kaiser test conditions, these values correspond both to protected and deprotected primary amino groups (table 1).

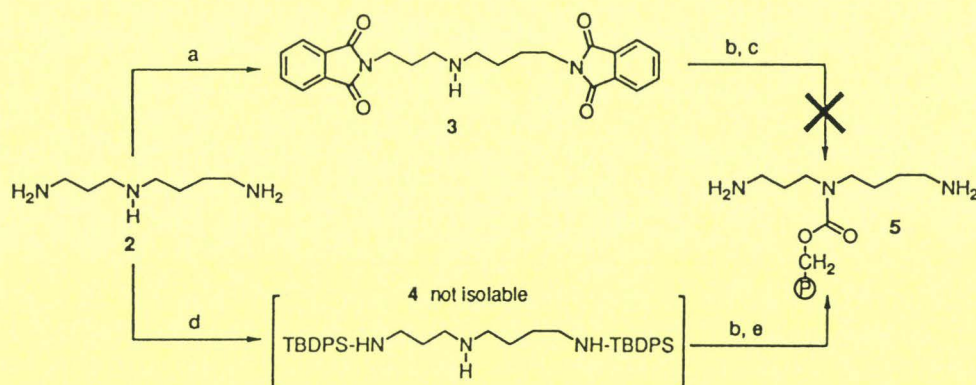
table 1 : Stability of the spermidine-resin linkage<sup>a</sup>.

reagents	HCl 0,5N <sup>b</sup>	HCl 2N <sup>c</sup>	$\text{CH}_3\text{COOH}$ 80% <sup>d</sup>	TFA	TFA 50% <sup>e</sup>	TFA 10% <sup>e</sup>	$\text{Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-$ <sup>f</sup>
time (mn)							
5	78	67	62	31	31	35	-g
10	72	67	58	28	29	35	-g
30	60	65	56	15	12	36	-g
60	59	59	56	11	11	35	-g
120	58	54	56	9	10	28	28
240	52	39	55	7	9	24	28

Notes: a: percentage of amino groups remaining on the resin after deprotection compared to the load evaluated before the deprotection step; b: in THF 1/2 v/v; c: in dioxane; d: in toluene; e: in dichloromethane v/v; f: 1M in THF; g: the deprotection of amino groups was not complete. Each value was the average value for four deprotection reactions, the coefficient of variation was less than 5%.

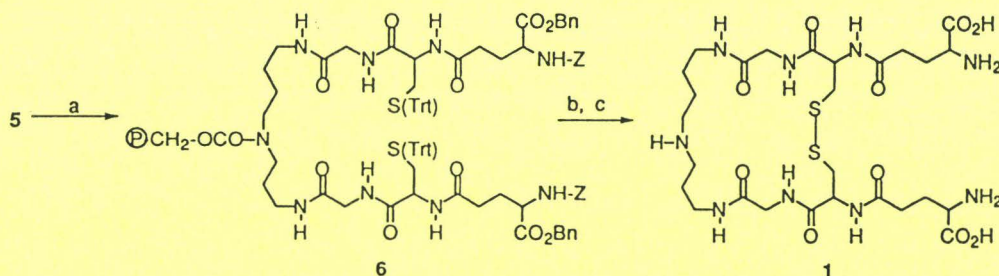
The efficiency of the deprotection was then checked using a qualitative Kaiser test after coupling of the first protected amino acid (Fmoc-glycine). Except for tetrabutylammonium fluoride, in all other cases the

deprotection was complete after a reaction time of 5 minutes. These results showed that, whatever the conditions used, the number of amino groups available on the resin decreases with time, confirming the previously observed lability of the spermidine-resin linkage. However, reasonable yields could be obtained using mild acidic conditions (HCl 0.5N/THF 1/2 v/v) and a short deprotection time, followed, as soon as possible by the coupling step.



**Figure 2:** Reagents and conditions: a) *N*-ethoxycarbonylphthalimide,  $\text{CHCl}_3$ , 45 mn, rt; b) polymer- $\text{OCOCl}$ , DIEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 72h, rt; c)  $\text{N}_2\text{H}_4$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 10 mn, rt; d) TBDPS-Cl, TEA, MeCN, 4h, rt; e) THF/HCl 0.5N 2/1 v/v, 15 mn.

The peptide chain was then elongated by successive coupling of Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH and Z-Glu-OBn( $\gamma$ -OH). Coupling reactions were performed in DMF using HOBt and BOP as coupling agents (HOBt/BOP/protected amino acid in a 1/1/1 ratio) and DIEA; Fmoc cleavages were achieved with piperidine in DMF (figure 3). Coupling yields were determined after deprotection by the quantitative Kaiser test. At the end of the synthesis, aminoacid analysis, performed after acidic hydrolysis of the peptidyl-resin yielded the expected ratio. Quantification of glutamic acid, the last amino acid incorporated on the resin indicated an overall 67% yield calculated on the basis of the initial load of the methylchloroformylated resin.



**Figure 3:** Reagents and conditions: a) amino acids [Fmoc-gly-OH, Fmoc-cys(S-Trt)-OH or Z-glu-OBn( $\gamma$ -OH)], HOBt, BOP, DIEA, DMF, 3h, rt then piperidine/DMF 1/4 v/v, 30 mn; b) HF, *p*-MePhOH, *p*-MePhSH, 1h, 4°C, c) air oxidation,  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH=8.5, 72h, rt.

The cleavage of the peptidyl-resin **6** was achieved according to the standard anhydrous hydrogen fluoride procedure (10 ml HF/g of resin bound peptide) with *para*-cresol (75 mg/ml HF) and *para*-thiocresol (25 mg/ml HF) as scavengers. After filtration and washing of the cleaved mixture (diethyl ether), the acidic extract (5%



aqueous acetic acid) was lyophilized. The resulting crude dihydrotrypanothione was directly oxidized. The oxydation was carried out at 0.1 mg/ml concentration in ammonium acetate 0.04M (adjusted to pH=8.5 with aqueous ammonia) under atmospheric oxygen at room temperature and monitored by reversed phase-HPLC<sup>14</sup> (RP-HPLC). Preparative RP-HPLC<sup>14</sup> affords trypanothione disulfide **1** with a 38% overall yield.

The purity was checked by analytical RP-HPLC and capillary electrophoresis<sup>15</sup>. Co-injection of the purified product with a sample synthesized according to Fairlamb<sup>2,3</sup> affords a single peak. The time-of-flight plasma desorption mass spectroscopy<sup>16</sup> of the oxidized and reduced trypanothione gave expected peaks at respectively 723 and 725 Da (MH<sup>+</sup>). The synthetic material has also shown to be fully active with recombinant *trypanothione disulfide reductase* from *T. cruzi*; the  $K_m$  for **1** was determined to be 50  $\mu$ M in good agreement with the value reported previously<sup>17</sup>.

In conclusion, we have shown that solid phase synthesis was suitable to prepare trypanothione disulfide **1** which offers an easy access to the preparation of various analogues.

**Acknowledgment:** We thank M. Moutiez for the  $K_m$  determination of trypanothione, B. Parmentier for his helpful advices and P.Sautière for amino acids analysis.

#### References and notes

1. Meister, A.; Anderson, M.E. *Ann. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 711.
2. Fairlamb, A.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B.T.; Cerami, A. *Science*. **1985**, *227*, 1485.
3. Henderson, G.B.; Ulrich, P.; Fairlamb, A.H.; Cerami, A. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1986**, 593.
4. Abbreviations: Boc, tert.butyloxycarbonyl; BOP, benzotriazol-1-yloxytrisdimethylaminophosphonium hexafluorophosphate; DIEA, diisopropylethylamine; DMF, N,N-dimethylformamide; Fmoc, fluorenyl-methoxycarbonyl; HOBt, 1-hydroxybenzotriazole; Trt, trityl; Z, benzyloxycarbonyl; Bn, benzyl.
5. Letsinger, R.L.; Koenet, M.J.; Mahadevan, V.; Jerina, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 5163.
6. Felix, A.M.; Merrifield, R.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 1385.
7. Burdick, D.J.; Struble, M.E.; Burnier, J.P. *Tetrahedron*. **1993**, *49*, 2589.
8. The yield was determined after coupling of  $\beta$ -alanine on the resin followed by total-acidic hydrolysis and aminoacid analysis. The I.R. spectra of the hydroxymethylated and methylchloroformylated resins were identical with those reported by Letsinger<sup>5</sup>. The use of the less harmful triphosgene in the last step of the synthesis did not yield the desired product.
9. Sosnovsky, G.; Lukszo, J. *Z. Naturforsch.* **1986**, *41b*, 122.
10. Nefkens, G.H.L. *Nature* **1960**, *187*, 309.
11. Overman, L.E.; Okazaki, M.E.; Mishra, P. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4391.
12. Kaiser, E.; Colescott, R.; Bossinger, C.D. *Anal. Biochem.* **1982**, *132*, 595.
13. Corey, E.J.; Ventakeswarlu, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190.
14. Chromatographic conditions: a) preparative Nucleosil C18 column (25 x 200 mm). Detection at 250 nm by UV absorbance. The solvent system used was as follows: solvent A was 0.05% TFA in water and solvent B was 50% acetonitrile in solvent A. The product **1** was eluted at 4.9 ml/min with a run of 35 min of solvent A then a linear gradient of 0.11%/min solvent B in solvent A during 90 min (rt=63.5 min). b) Analytical Nucleosil C18 column (4.6 x 250 mm) with a flow of 0.5 ml/min and a run of 5 min solvent A, then a linear gradient of 3.33%/min solvent B in A. UV detection at 215 nm: dihydrotrypanothione, rt=24.2 min; trypanothione disulfide, rt=23.4 min.
15. Capillary electrophoresis was performed on an Applied Biosystem 270 A-HT apparatus. Separation was carried at 30°C in a 20 mM sodium citrate buffer solution (pH=2.5) with a potential difference of 30 kV. Detection by UV absorbance at 200 nm.
16. PDMS analysis were performed with a Bio-Ion/Applied Biosystems 20K time-of-flight spectrometer using an accelerating voltage of 15 kV and a <sup>252</sup>Cf ionization source. Sample were adsorbed on the nitrocellulose target for analysis.
17. Shames, S.L.; Fairlamb, Cerami, A.; Walsh, C.T. *Biochemistry*. **1986**, *25*, 3519.

**PARTIE 2**

**CHIMIE COMBINATOIRE**

# **CHAPITRE II :**

## **LES BIBLIOTHEQUES ORTHOGONALES**

Comme le « positional scanning », mais contrairement à la déconvolution itérative, la stratégie des bibliothèques orthogonales permet une identification directe et sans resynthèse d'un composé actif au sein d'une bibliothèque combinatoire. Il s'agit d'une méthode originale de déconvolution que nous avons contribué à mettre au point. Le travail présenté ici a été en grande partie réalisé par Benoît Déprez et Xavier Williard.

### **I/ OBJECTIFS DE LA METHODE**

A l'origine de la mise au point de notre méthode de déconvolution, il y a un triple objectif :

- 1- La méthode doit être générale,
- 2- Les faux positifs doivent être minimisés,
- 3- La déconvolution doit être simple et respecter la confidentialité.

#### **I-1/ Généralité de la méthode**

Notre méthode doit être applicable à n'importe quelle série chimique, quelle que soit la méthode de synthèse (phase solide ou phase homogène).

#### **I-2/ Minimisation des faux positifs**

Il s'est rapidement avéré que l'un des défauts majeurs des méthodes qui consistent à tester des mélanges de produits est d'engendrer un nombre considérable de faux positifs. Le problème de ces positifs est que leur fausseté ne peut être déclarée qu'après une série d'expériences généralement longues et coûteuses. Ces expériences mobilisent non seulement les équipes de biologie mais aussi celles de chimie (de synthèse, dans le cas des déconvolutions itératives ou du « positional scanning », ou analytique dans le cas du « tagging »). Ces faux positifs, auxquels il est difficile -sinon impossible- d'attribuer une structure chimique, ont deux origines principales :

### *I-2-1/ origine liée à la diversité structurale*

La synthèse combinatoire engendre de façon systématique, simultanément et au même endroit, un grand nombre de composés différents (c'est-à-dire non identiques) au départ d'un nombre restreint de matières premières (ou variants, par exemple les 20 aminoacides naturels) en les combinant de différentes manières. Ces variants n'apportent donc qu'un nombre restreint d'éléments « pharmacophoriques ». Ainsi, dans une chimie d'assemblage, la diversité recélée par un mélange combinatoire sera liée à la diversité des variants ou plus exactement au rapport du nombre de variants nécessaires pour réaliser ce mélange au nombre de produits obtenus dans ce mélange :

*La diversité du mélange combinatoire est proportionnelle au nombre de variants utilisés et inversement proportionnelle au nombre de produits générés à partir de ces variants.*

Il apparaît que ce rapport devient défavorable dans le cas des bibliothèques oligomériques pour lesquelles, au départ d'une vingtaine de variants, des millions de produits sont fabriqués.

On peut citer l'exemple des peptides : 5 étapes utilisant à chaque fois 20 variants génèrent  $20^5 = 3,2 \cdot 10^6$  pentapeptides.

Cette redondance structurale ne serait pas un problème si chacun des produits était testé séparément. Mais elle le devient dès que ces produits peu divers sont retrouvés ensemble dans un mélange. En effet la capacité de « discernement » varie d'un récepteur à l'autre, mais n'est jamais parfaite. Un récepteur peut reconnaître, dans une famille de congénères structurellement proches et capables d'offrir un même pharmacophore, un seul et même type de molécule, d'une concentration égale à la somme des concentrations de tous les congénères. Si cette concentration « ressentie » par le récepteur est suffisante, un signal apparaît pendant le criblage biologique, et la déconvolution qui s'en suit ne permet pas de définir une structure active.

Pour éviter cet écueil, nous nous efforcerons donc de constituer des mélanges combinatoires les plus divers possibles.

### *I-2-2/ origine liée aux réactions secondaires*

Les réactions secondaires peuvent être divisées en deux catégories. *Premièrement*, les réactions qui intéressent un variant particulier traité dans les conditions de synthèse. *Deuxièmement*, les réactions secondaires qui n'ont lieu que lorsque deux variants sont présents simultanément.

*Le premier type* de réaction secondaire est le moins gênant, car le produit secondaire sera un « satellite » permanent du produit attendu. Jusqu'à l'étape ultime de déconvolution, tout se passe normalement, mais lors de la confirmation d'activité, il s'avère que le produit purifié est peu actif ou inactif. Il « suffit » alors de reprendre le milieu réactionnel non purifié, de le chromatographier, et d'évaluer l'activité de toutes les fractions. La fraction active est ensuite soumise à une élucidation structurale classique.

Gardons néanmoins à l'esprit que paradoxalement, plus le produit est actif, plus son seuil de détection est bas, et que dans ce cas, il est possible que des traces de produit soient biologiquement détectables mais qu'alors son élucidation structurale puisse être très difficile, voire impossible.

*Le deuxième type* de réactions secondaires peut être beaucoup plus gênant. En effet, tous les types de déconvolution sont basés sur des partitions de la bibliothèque initiale qui impliquent une séparation des variants. Si la réaction secondaire implique la présence simultanée de deux variants dans la même position variable, alors il est quasiment sûr que le sous-produit (et l'activité) sera perdu dès que l'on essaiera d'identifier le variant qui confère l'activité en cette position.

Si la présence d'un variant donné à une position (mais qui n'est pas le variant « pharmacophorique » en cette position) provoque la réaction secondaire sur un variant à une autre position, alors la déconvolution sera également stérile. Pour identifier ce type de situations, il faudrait procéder à des déconvolutions négatives. Pour chaque position variable, il faudrait constituer une série de sous-bibliothèques correspondant aux délétions successives des  $N$  variants de cette position. Chaque sous-bibliothèque contiendrait  $(N-1) N^{(n-1)}$  molécules. Ce type de déconvolution a été entrepris par Furka<sup>42</sup> et ses collaborateurs sans grand succès. Dans

le cas décrit précédemment, il apparaîtrait que deux sous-bibliothèques correspondant à une position variable sont inactives : celle correspondant au variant « pharmacophorique », et celle correspondant au variant engendrant la réaction secondaire.

Ainsi pour éviter ce deuxième écueil, nous utiliserons des chimies d'assemblage robustes et des stratégies de protection adaptées à l'ensemble des variants utilisés.

### **I-3/ Simplicité de la déconvolution et respect de la confidentialité**

La lourdeur inhérente à l'utilisation de la déconvolution itérative provient du dialogue que doivent entretenir biologistes et chimistes. Chaque étape de déconvolution compte nécessairement une étape de sélection et de décision bipartite qui nécessite la coordination d'équipes parfois distantes. D'autre part, dans le contexte pharmaceutique en particulier, les bibliothèques à déconvolution itérative posent un problème de confidentialité : le chimiste qui procède à la déconvolution connaît nécessairement la structure de la molécule active. Par contre ces problèmes ne se rencontrent pas dans le cas des bibliothèques appliquant la méthode du « positional scanning ». En effet, une seule lecture de la bibliothèque permet de déterminer la structure d'un produit potentiellement actif. Il ne reste plus ensuite qu'à synthétiser cette molécule, ce qui ne relève plus de la chimie combinatoire et peut être réalisé un laboratoire de chimie classique.

Dans ce sens, la méthode du « positionnal scanning » présente un réel avantage sur la déconvolution itérative.

Nous allons voir comment nous avons pu allier les avantages des deux méthodes et en éviter les inconvénients en utilisant le principe des bibliothèques dites « orthogonales ». Nous verrons aussi que cette méthode est très générale et qu'elle peut s'appliquer à des mélanges non combinatoires.

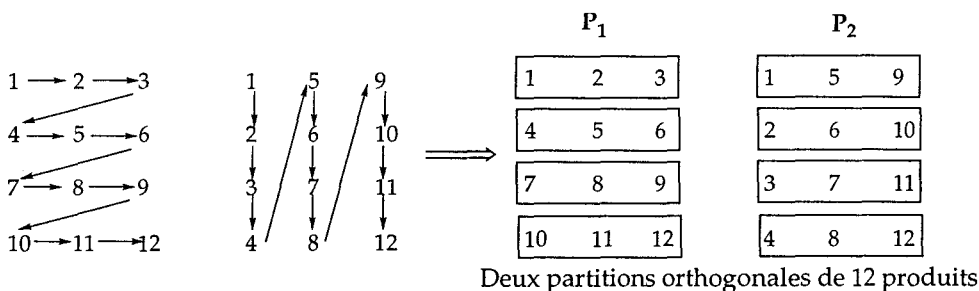
## II/ PRINCIPE GENERAL DES BIBLIOTHEQUES ORTHOGONALES

Le principe général des bibliothèques orthogonales implique la préparation de 2 « séries » ou, selon le terme mathématique « partitions », de la bibliothèque totale, quels que soient  $N$  et  $n$ . Ces deux séries contiennent chacune tous les congénères de la bibliothèque envisagée.

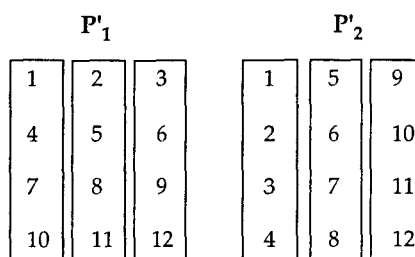
*Les sous-bibliothèques de ces deux séries sont telles que le nombre de composés par sous-bibliothèque est égal ou inférieur au nombre de sous-bibliothèques dans une série.*

Ceci est montré dans le schéma 32, dans un cas où une bibliothèque contenant 12 composés est « réparties » en 4 sous-bibliothèques de 3 composés chacune ( $3 < 4$ ).

Schéma 32 : Principe de la répartition orthogonale :



Pour réaliser une partition "orthogonalisable", les "parties" doivent être les petites colonnes de la matrice des produits



Nous dirons que les deux partitions  $P_1$  et  $P_2$  sont « orthogonales » car *deux composés d'une même sous-bibliothèque de  $P_1$  sont trouvés dans deux sous-bibliothèques de  $P_2$  et réciproquement.*

Les deux partitions  $P'_1$  et  $P'_2$  ne sont pas orthogonales : *chaque sous-bibliothèque de  $P'_1$  a deux composés en commun avec chaque bibliothèque de  $P'_2$ .*

Ainsi, chacun des 3 composés d'une sous-bibliothèque de la partition  $\mathbf{P}_1$  est trouvé dans une sous-bibliothèque *particulière* de la partition  $\mathbf{P}_2$ . La première étape consiste en un criblage des 4 sous-bibliothèques de l'une des deux partitions. Si l'une de ces 4 sous-bibliothèques est active, alors on procède à la deuxième étape qui consiste en un criblage de la deuxième partition, pour déterminer laquelle des 4 sous-bibliothèques de la première partition est active.

*Puisqu'entre deux sous-bibliothèques prises dans deux partitions orthogonales il n'y a qu'un composé en commun, un composé actif peut être immédiatement identifié comme le composé en commun entre les deux sous-bibliothèques actives.*



### III/ SYNTHÈSE ET UTILISATION DES DEUX BIBLIOTHÈQUES ORTHOGONALES DE 15625 TRIPEPTIDES CHACUNE

Le principe des bibliothèques orthogonales étant posé, nous avons conçu et préparé une bibliothèque modèle pour le valider expérimentalement. Sa préparation et son criblage biologique ont fait l'objet d'une publication :

« **Orthogonal combinatorial chemical libraries** »

B. Déprez, X. Williard, L. Bourel, H. Coste, F. Hyafil, A. Tartar

*Journal of the American Chemical Society*, **1995**, *117*, 5405-5406.

#### III-1/ Choix des molécules à synthétiser.

Un des avantages de la chimie combinatoire est de permettre, dès la conception d'une bibliothèque, la définition de certaines contraintes auxquelles devront répondre les composés qui la constituent. Un cahier des charges a été dressé pour les molécules, celles-ci doivent respecter les conditions suivantes :

1/ Leur masse moléculaire ne dépassera pas  $600 \text{ g.mol}^{-1}$ , limite supérieure généralement admise pour avoir une bonne disponibilité orale,

2/ Les molécules doivent pouvoir interagir fortement avec divers récepteurs et pour cela être capables de générer des liaisons intermoléculaires de différents types : liaisons hydrogènes, de Van der Waals, ioniques et hydrophobes,

3/ Elles doivent avoir une solubilité dans l'eau au moins égale à  $0,1 \text{ mg/mL}$  (environ  $0,2 \text{ mM}$ ),

4/ Elles doivent présenter une stabilité métabolique maximale,

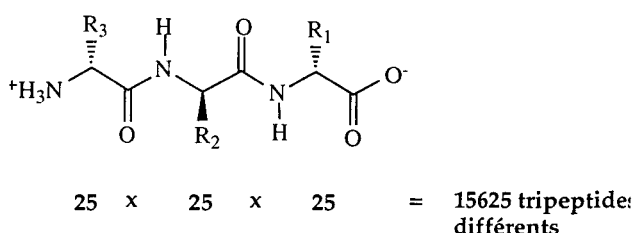
5/ Enfin, elles doivent pouvoir être synthétisées en mélange et testées en mélange.

Les techniques de synthèse en phase solide, dont nous possédons une bonne expérience au laboratoire, présentent de grands avantages lorsqu'il s'agit de manipuler des mélanges de produits, même si la synthèse considérée ne comporte qu'un nombre limité d'étapes.

Nous avons donc décidé de mettre à profit l'expérience de synthèse en phase solide acquise lors de notre premier travail pour la construction combinatoire de petites molécules organiques.

Pour démontrer la faisabilité de la bibliothèque combinatoire, nous avons choisi de préparer tous les tripeptides synthétisables à partir de 25 aminoacides de série D ou achiraux, chaque aminoacide pouvant être utilisé indifféremment dans chacune des 3 positions, soit  $25^3=15625$  tripeptides au total. (Schéma 33).

**Schéma 33** : *Squelette de base de la bibliothèque* :



Nous répondons ainsi aux différentes exigences imposées dans le cahier des charges :

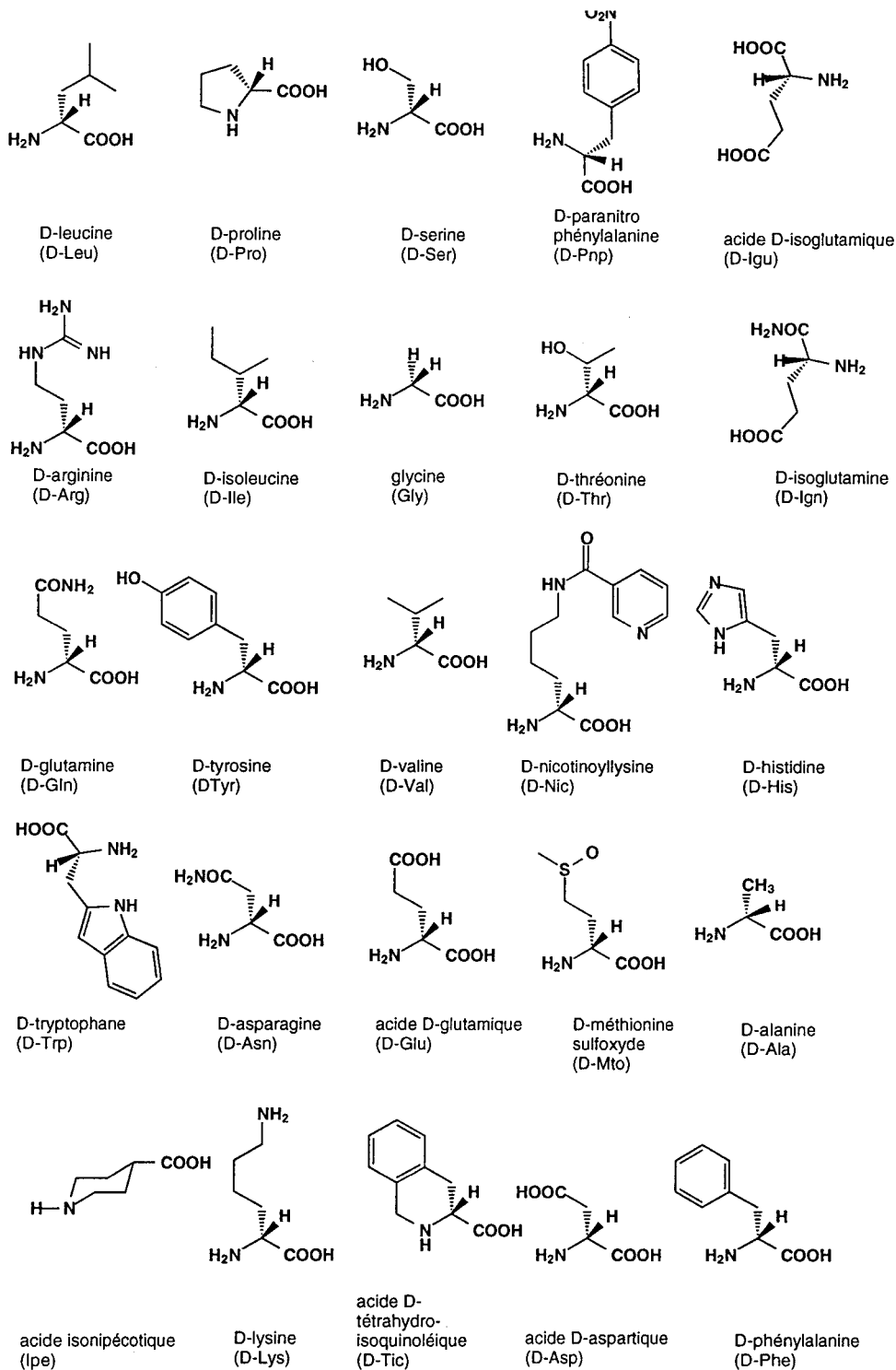
Par ce choix nous remplissons la condition 5 qui était la nécessité de synthétiser les produits en mélange. En effet, d'une part les techniques de couplage et les stratégies de protection et de clivage sont largement décrites dans la littérature et, pour la plupart d'entre elles, connues au laboratoire. D'autre part, l'analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale permet la caractérisation de produits purs, mais aussi de mélanges. L'emploi d'acides aminés permet également le contrôle de produits en mélange, par dégradation récurrente d'Edman.

Les extrémités des tripeptides seront libres, ce qui leur permettra d'être solubles dans l'eau et de remplir la condition 3.

L'utilisation d' $\alpha$ -aminoacides de série D n'implique aucun changement dans la synthèse ni dans l'analyse par rapport à la série L, puisque les réactifs utilisés, en dehors des aminoacides sont achiraux. Par contre, ces aminoacides confèrent aux tripeptides une meilleure résistance vis-à-vis des enzymes protéolytiques. De plus, les interactions ligand-récepteur susceptibles de s'établir avec des peptides constitués d'acides aminés de série D seront forcément différentes de

celles obtenues avec des peptides naturels. Des activités nouvelles sont donc attendues. 19 des 25 aminoacides portent les chaînes latérales trouvées naturellement dans les protéines, et 6 sont non-naturels (schéma 34) : nous remplissons ainsi la condition 4 qui imposait d'obtenir des molécules capables de présenter une stabilité métabolique maximale.

Schéma 34 : les 25 aminoacides de la bibliothèque :



Ce choix d'aminoacides répond à l'exigence 2 puisqu'il offre un large éventail de groupements capables d'interagir avec des récepteurs biologiques (donneurs et accepteurs de liaisons

hydrogène, charges négatives ou positives à pH 7, groupements aromatiques enrichis ou appauvris en électrons, chaînes aliphatiques). Des liaisons fortes et variées avec les macromolécules biologiques peuvent donc être attendues.

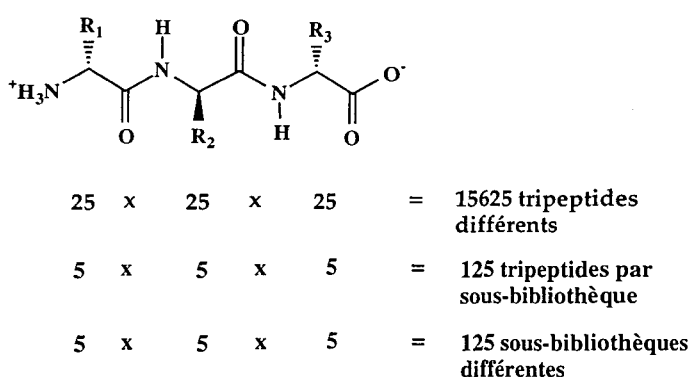
Les masses moléculaires des tripeptides obtenus par la combinaison de ces 25 aminoacides seront comprises entre 189 (H-Gly-Gly-Gly-OH) et 717 (H-DNic-DNic-DNic-OH). Nous remplissons ainsi la condition **1** qui voulait que les produits aient une masse moléculaire ne dépassant pas 600 g/mol.

### III-2/ Organisation générale des bibliothèques

Les tripeptides « de série D » sont destinés à être testés à des concentrations de 1 à 100 µg/mL. Ainsi, si l'on veut détecter aisément une molécule active à 100 nM dans un mélange de molécules totalement inactives, il convient de limiter à environ 100 le nombre de molécules présentes dans le mélange testé. La bibliothèque de 15625 tripeptides doit donc être « répartie » en une centaine de sous-bibliothèques.

Nous utilisons des mélanges de 5 aminoacides à chaque position de la synthèse. Les sous-bibliothèques ainsi obtenues comptent donc  $5^3 = 125$  tripeptides.

**Schéma 35** : Organisation de la bibliothèque



Les partitions orthogonales de la bibliothèque sont réalisées lors de la synthèse. Elles sont la conséquence des deux partitions orthogonales **A** et **B** réalisées sur les 25 aminoacides (schéma 36).

**Schéma 36 : Les 2 répartitions des 25 acides-aminés**

A1	A2	A3	A4	A5
D-Leu	D-Pro	D-Ser	D-Pnp	D-Igu
D-Arg	D-Ile	Gly	D-Thr	D-Ign
D-Gln	D-Tyr	D-Val	D-Nic	D-His
D-Trp	D-Asn	D-Glu	D-Mto	D-Ala
Ipe	D-Lys	D-Tic	D-Asp	D-Phe

**Partition A :**

<b>B1</b>	{	D-Leu	D-Pro	D-Ser	D-Pnp	D-Igu
<b>B2</b>	{	D-Arg	D-Ile	Gly	D-Thr	D-Ign
<b>B3</b>	{	D-Gln	D-Tyr	D-Val	D-Nic	D-His
<b>B4</b>	{	D-Trp	D-Asn	D-Glu	D-Mto	D-Ala
<b>B5</b>	{	Ipe	D-Lys	D-Tic	D-Asp	D-Phe

**Partition B :**

Les 2 partitions sont organisées de manière telle qu'au sein des groupes **An** et **Bn'** de l'ensemble de 25 aminoacides, on trouve des aminoacides structurellement très divers. Typiquement, prenons l'exemple du groupe **A3**, chaque partie contient un aminoacide hydrophobe (la valine), un aminoacide hydrophile non chargé (comme la sérine), un aromatique (comme l'acide tétrahydroisoquinoléinecarboxylique ou « Tic »), un aminoacide chargé (comme l'acide glutamique) ainsi qu'un aminoacide non naturel ou sans chaîne latérale (comme la glycine ici ou l'acide isonipécotique du groupe **A1**). Les sous-bibliothèques de tripeptides issues de la combinatoire d'aminoacides les plus divers sont par conséquent les plus diverses possible.

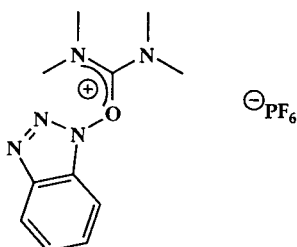
*Ainsi, si une sous-bibliothèque est active, il est peu probable que cette activité soit due au cumul des activités de congénères structurellement proches.*

Et il est raisonnable d'espérer trouver *une seule* structure active dans cette sous-bibliothèque.

### III-3/ Synthèse des deux bibliothèques<sup>43</sup>

Les deux bibliothèques ont été synthétisées selon les mêmes protocoles, utilisant les mêmes résines, le même agent de couplage, l'HBTU dont la structure est donnée au schéma 37 et les mêmes stratégies de protection (tBoc/benzyle)

Schéma 37 : l'Hydroxybenzotriazolyl tétraméthyluronium hexafluorophosphate « HBTU »



Le sulfoxyde de la D-Méthionine a été synthétisé. Une méthode originale a été mise au point à cette occasion pour l'obtenir directement au départ de la  $\alpha$ -tBoc D-méthionine<sup>44</sup>. Une oxydation ménagée du soufre a été réalisée par « titration » d'une solution tamponnée à pH 7 de tBoc-D-méthionine par une solution hydroalcoolique d'iode. Le léger excès d'iode est réduit par le bisulfite de sodium, et les iodures sont précipités par le nitrate d'argent. Un seul diastéréoisomère est obtenu (la RMN, la CCM et l'HPLC montrent en effet un produit unique). Sa configuration n'a pas été déterminée.

#### III-3-1/ Stratégie de protection des aminoacides

Les aminoacides commerciaux possédaient les protections suivantes : les acides carboxyliques et les alcools des chaînes latérales étaient protégés par le groupement benzyle, sous forme respectivement d'esters et d'éthers. Le phénol de la tyrosine était protégé par un groupement 2-bromobenzoyloxycarbonyle, qui prévient le risque de migration du cation benzylique sur le noyau aromatique. L'histidine était protégée par un groupement  $\pi$ -Bom (benzyloxyméthyle). Le tryptophane était protégé par un groupement formyle. Toutes ces protections sont clivables par l'acide fluorhydrique anhydre en présence de paracrésol et de parathiocrésol pour piéger les carbocations, à l'exception du groupement formyle qui se clive par action d'un nucléophile (par

exemple, la pipéridine à 10% dans le DMF). Cette dernière opération, ainsi que la déprotection du tBoc N $\alpha$ -terminal, sont réalisées avant la déprotection et le clivage de la liaison à la résine.

### *III-3-2/ Déroulement des couplages*

Les couplages sont réalisés avec les esters activés des acides, obtenus extemporanément grâce à l'HBTU en présence d'un équivalent d'HOBt, en milieu basique (DIEA). Afin d'éviter l'incorporation préférentielle des aminoacides ayant des cinétiques les plus favorables et puisque nous utilisons des mélanges de 5 aminoacides, nous avons réalisé les couplages avec 1,1 équivalents d'espèces acylantes. Il faut remarquer que si l'on évite la mauvaise incorporation d'un aminoacide lent, on ne peut éviter la formation de couples préférentiels, par exemple les couples bon nucléophile-bon électrophile et faible nucléophile-faible électrophile. La formation de ces couples préférentiels ne peut s'évaluer ni par analyse d'acides aminés, ni par séquençage des peptidylrésines. Le seul moyen de l'éviter est d'utiliser la méthode « division-couplage-mélange », définie au chapitre I, qui est beaucoup moins rapide.

Néanmoins, nous avons réalisé une analyse par HPLC d'une sous-bibliothèque et nous avons pu dénombrer plus de 100 pics d'intensités comprises dans une fourchette d'intensités relatives de 1 à 5. Ceci plaide en faveur de la réalisation d'un bon nombre des combinaisons attendues. Dans la majeure partie des cas, un seul couplage avec 1,1 éq. d'espèce acylante a été suffisant pour rendre négatif le test de détection d'amine selon Kaiser. Dans le cas où le couplage s'effectuait sur les groupes **A1**, **A2**, **B1** ou **B5** qui contiennent des amines secondaires, un test colorimétrique de Christensen à l'acétone/chloranyle a été réalisé<sup>45</sup>. Les analyses d'acides aminés réalisées sur 10 sous-bibliothèques déprotégées et clivées ont montré que la plupart des aminoacides étaient présents dans une fourchette de 10% autour de la valeur attendue, et que les plus divergents étaient à moins de 25% de la valeur attendue.

Toutes les sous-bibliothèques ont subi une étape de déformylation après la synthèse, qu'elles aient ou non contenu un tryptophane. En effet, si par exemple la pipéridine provoque une réaction secondaire sur un des aminoacides présents dans le groupe contenant le tryptophane dans la première partition (le groupe **A1**), nous désirons reproduire cette réaction secondaire



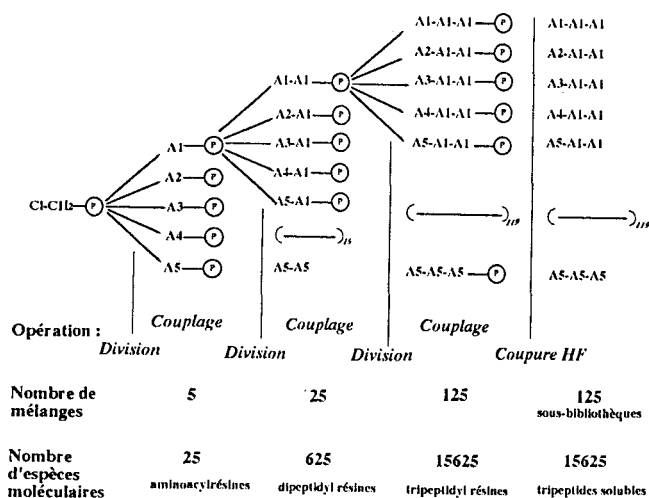
dans la partition orthogonale **B**. Or les aminoacides utilisés avec le tryptophane dans la première partition sont, par définition dans 4 groupes différents d'acides aminés dans la deuxième partition (respectivement les groupes **B1, B2, B3, B5**), nous appliquons donc la déformylation à toutes les sous-bibliothèques.

Après avoir subi une déprotection de l'amine  $\alpha$ -terminale, les 125 tripeptidyl-résines ont été soumises à un traitement par l'acide fluorhydrique anhydre contenant 7,5% de paracrésol et 2,5% de parathiocrésol, à 0°C, pendant 1 heure.

### III-3-3/ Schéma de la synthèse

Il s'agit d'une synthèse divergente où, à la première étape, la méthode dite de « division-couplage-mélange » a été appliquée. Le schéma montre la synthèse de la bibliothèque **A** où sont successivement incorporés les différents groupes de 5 acides aminés. La synthèse de la bibliothèque **B** suit le même schéma en utilisant les groupes de la partition **B**.

Schéma 38 : Synthèse de la bibliothèque



### III-4/ Conditions du criblage biologique

Les 250 sous-bibliothèques ont été utilisées dans une cinquantaine de tests de criblage. Préalablement à chacun de ces tests, dix mélanges pris au hasard ont été testés à 6,25 ; 25 et 125 mg/mL, et la concentration maximale donnant une moyenne d'activité nulle (c'est-à-dire un signal égal à une solution tampon) a été retenue pour tester les sous-bibliothèques.

## IV/ PREMIERS RESULTATS BIOLOGIQUES

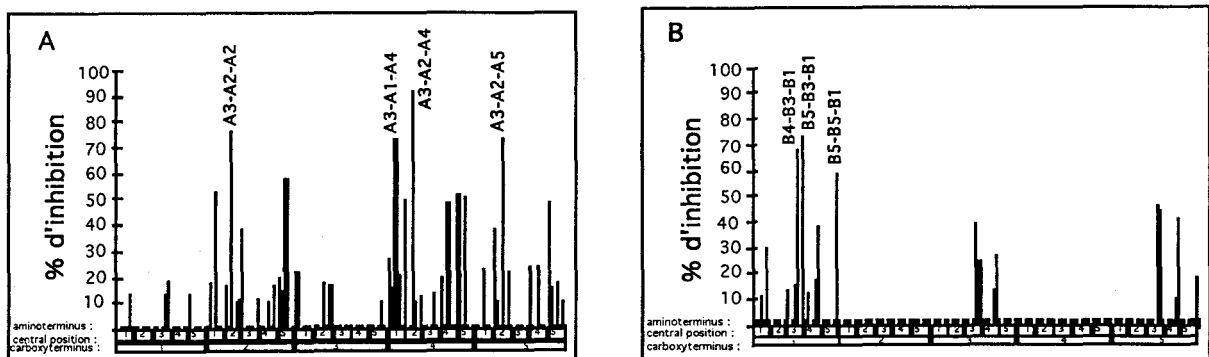
Nous détaillerons ici les résultats obtenus sur un test de déplacement de la vasopressine tritiée de son récepteur  $V_2$  porcine. Toutes les sous-bibliothèques ont été resolubilisées dans le DMSO, puis diluées dans le tampon d'expérimentation à une concentration de 25  $\mu\text{g/mL}$ , correspondant approximativement à 0,2 $\mu\text{g/mL}$  (0,5  $\mu\text{M}$ ) de chaque tripeptide. Il s'agit d'un test de binding : le déplacement de la vasopressine tritiée par le tripeptide étudié est évalué par comptage de la radioactivité restante.

### IV-1/ Détermination de la structure du tripeptide actif

Le criblage initial de la première bibliothèque A a permis de sélectionner 3 sous-bibliothèques capables d'inhiber à plus de 60% la liaison de la vasopressine tritiée à son récepteur. Le criblage de la bibliothèque B permet, quant à lui, de sélectionner 3 sous-bibliothèques capables de l'inhiber à plus de 60%.

Cette sélection définit 9 composés susceptibles d'être actifs. Afin de restreindre le choix, nous avons retesté ces 6 sous-bibliothèques à la concentration de 2,5 $\mu\text{g/mL}$  et, dans ces conditions, seule A3-A2-A4 reste active parmi les sous-bibliothèques de la première partition A, tandis que B5-B3-B1 et B4-B3-B1 restent toutes deux actives dans la deuxième partition B comme le montre le schéma 39.

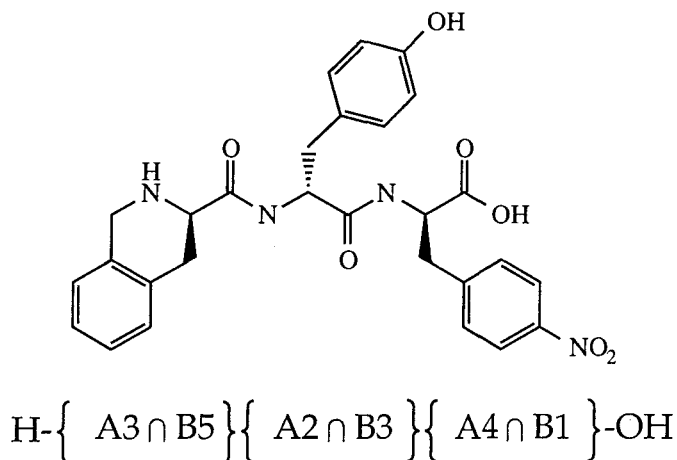
Schéma 39 : Résultats biologiques des 2 bibliothèques dans un essai de « binding » des récepteurs  $V_2$  porcins



Le tripeptide commun à A3-A2-A4 et B5-B3-B1, défini comme :

$\{A3 \cap B5\}-\{A2 \cap B3\}-\{A4 \cap B1\}$  est représenté dans le schéma 40.

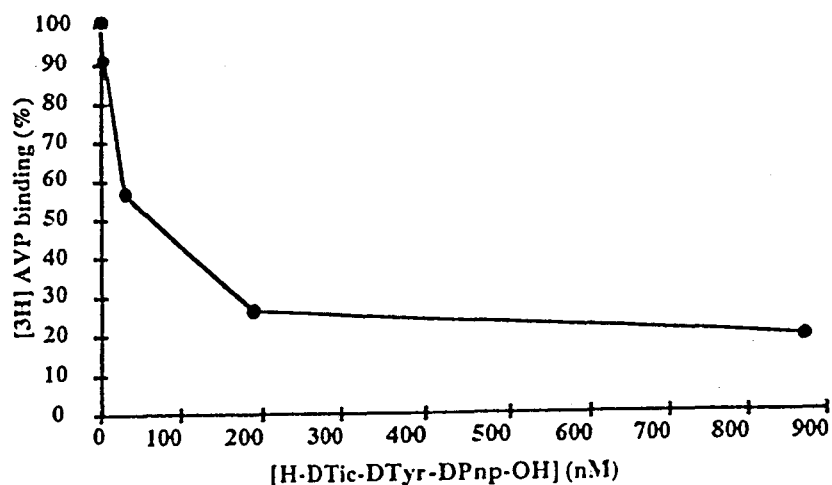
Schéma 40 : le tripeptide en commun H-DTic-DTyr-DPnp-OH (2):



Il s'agit de la tétrahydroisoquinoléincaroxytyrosylparanitrophénylalanine. La concentration déplaçant 50% de la vasopressine tritiée est de 210 nM.

Le tripeptide possède une courbe de binding représentée dans le schéma 41.

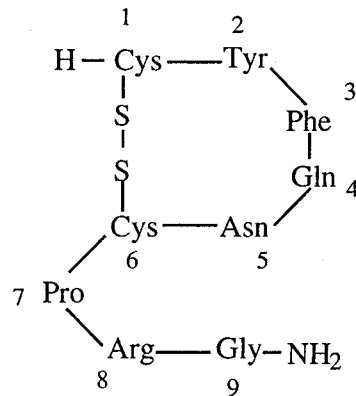
Schéma 41 : Déplacement de la vasopressine tritiée par H-DTic-DTyr-DPnp-OH



#### IV-2/ Intérêt thérapeutique de l'inhibiteur :

La vasopressine<sup>46</sup>, ou hormone antidiurétique ADH (schéma 42) est un neuropeptide cyclique de 9 aminoacides. Sa formule est apparentée à celle de l'ocytocine car ces deux nonapeptides ont le même précurseur et sont activés de la même façon.

Schéma 42 : la vasopressine



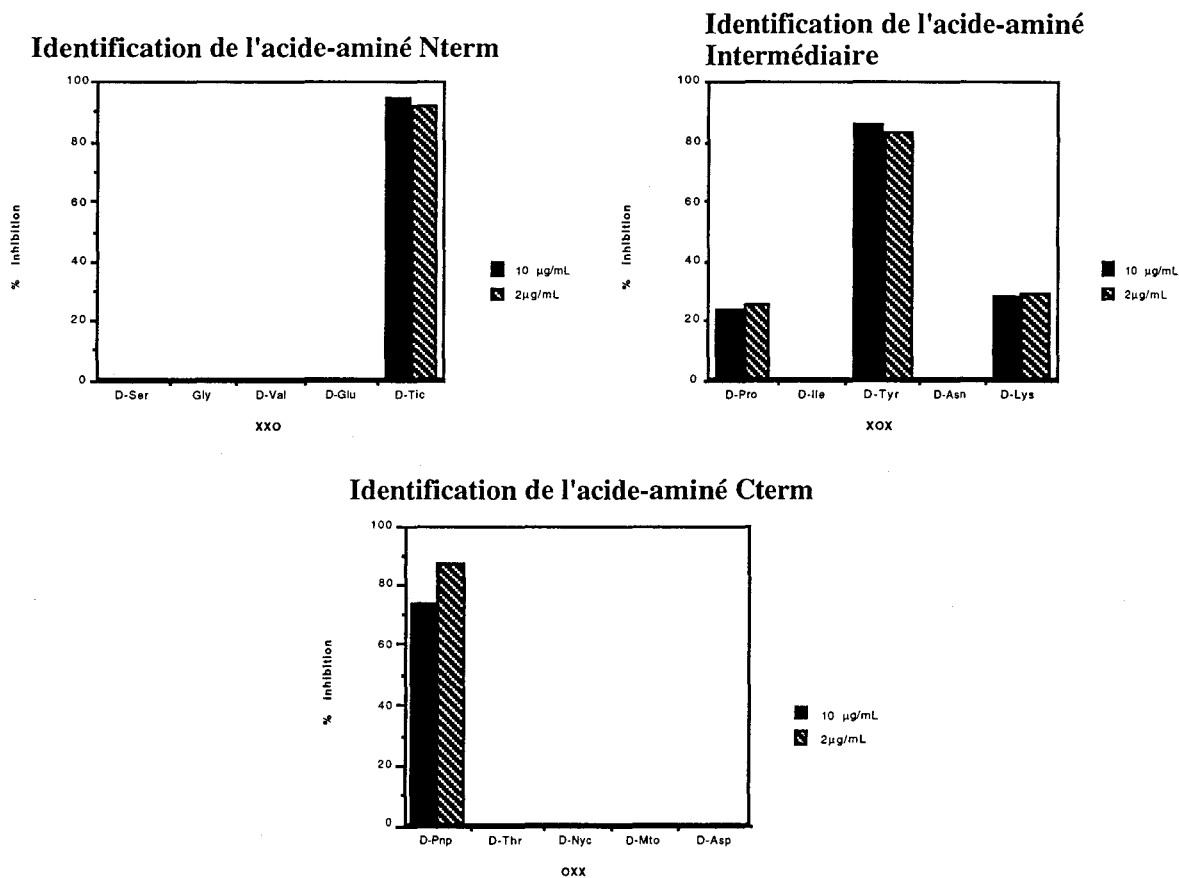
Il existe plusieurs sous-types de récepteurs où la vasopressine se fixe. Nous sommes intéressés ici par le type V<sub>2</sub>, présent au niveau du tube contourné distal rénal. La vasopressine joue un rôle clé dans la régulation de la volémie : elle entraîne une réabsorption de l'eau par le rein. L'antagoniste de la vasopressine que nous avons identifié présente un intérêt en chimie thérapeutique dans des stratégies de lutte contre l'hypertension artérielle ou le syndrome de sécrétion inappropriée d'ADH<sup>47</sup>.

#### V/ CONFIRMATION DE L'EFFICACITE DE LA METHODE ORTHOGONALE

L'expérience a pour but de vérifier la pertinence de la méthode orthogonale vis-à-vis d'une méthode de déconvolution qui a déjà fait ses preuves, la méthode du « positional scanning » (chapitre I-1-2). Effectivement, le tripeptide a été également mis en évidence par un « balayage positionnel » appliqué à la sous-bibliothèque A3-A2-A4 (Schéma 43).

En position N terminale, la seule activité est obtenue avec la sous-bibliothèque contenant l'acide D-tétrahydroisoquinoléique. En position intermédiaire, la D-tyrosine à la sous-bibliothèque qui la contient des résultats 3 fois supérieurs à celle où la D-proline la remplace. Enfin, en position C terminale, la sous-bibliothèque contenant la D-paranitrophénylalanine donne également les meilleurs résultats.

**Schéma 43 : Résultats du positionnal scanning à la sous-bibliothèque A3-A2-A4**



En revanche, le tripeptide en commun entre **A3-A2-A4** et **B4-B3-B1**, l'autre sous-bibliothèque de **B** active, est un analogue analogue du précédent tripeptide dans lequel le résidu D-Tic est remplacé par un acide D-glutamique. Il est totalement inactif. Il a été montré que le tripeptide actif dans la sous-bibliothèque **B4-B3-B1** était en fait H-D-Trp-D-Tyr-D-Pnp-OH. Nous avons en effet montré par la suite qu'il présentait une valeur d'IC<sub>50</sub> de 5 µM (ch. III-3-3).

## VI/ CONCLUSION

La méthode orthogonale apparaît comme une méthode de synthèse combinatoire très générale, qui permet d'inscrire des bibliothèques combinatoires de taille moyenne (environ 10 000 molécules) dans les programmes classiques de criblage pharmacologique conçus pour l'utilisation de molécules individuelles, caractérisées et solubles. Elle est applicable à la synthèse en phase solide ou homogène, de molécules peptidiques ou non, linéaires ou cycliques.

Cette méthode a permis l'identification d'un tripeptide antagoniste des récepteurs  $V_2$  porcins possédant un intérêt thérapeutique. Dans le but d'optimiser sa structure chimique une étude de relations structure/activité quantitatives a été entreprise. 30 composés analogues ont donc été synthétisés et testés sur ce récepteur.

## Orthogonal Combinatorial Chemical Libraries

Benoît Déprez, Xavier Williard, Line Bourel, Hervé Coste, François Hyafil, and André Tartar\*

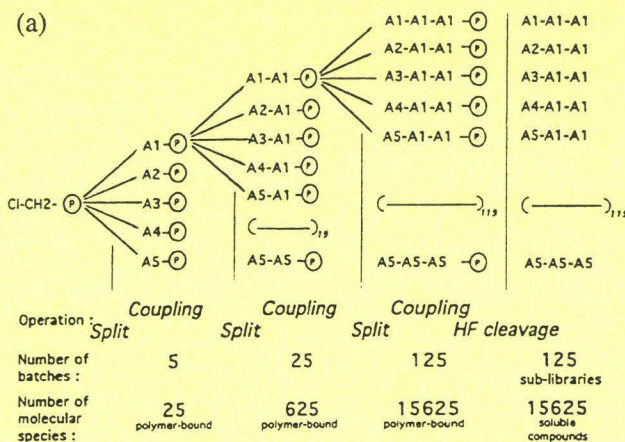
Department of Chemistry, Institut Pasteur de Lille  
 Rue Calmette, 59045 Lille, France  
 GLAXO Centre de recherches  
 Avenue du Québec, 91951 Les Ulis, France

Received November 2, 1994

Although knowledge-based *de novo* design of high-affinity ligands for receptors or enzymes appears to be the most rational approach to the discovery of new pharmacologically active substances, high-throughput random screening of compounds having no known structural similarity with the natural ligand has proved to be a highly efficient method. To increase the input of new molecules, methods of combinatorial synthesis have been considerably developed in recent years.<sup>1-4</sup> Much work has been devoted to the development of various strategies designed for the identification of the active compounds in a mixture.<sup>5</sup> These strategies often reduce the scope of the chemical combinations and the biological assays. To circumvent these difficulties, we have developed a general concept which we name "orthogonal libraries". Herein we describe the design, synthesis, and first use of a pair of such orthogonal libraries,<sup>6</sup> leading to the discovery of a nanomolar ligand to the V2 vasopressin receptor.

Using a classical solid phase procedure, we prepared two libraries<sup>7</sup> of the same soluble 15 625 trimers resulting from the combination of 25 synthons at each position, linked by two amide bonds (Figure 1a). The synthons were 23 D-amino acids and 2 nonchiral amino acids, glycine and isonipecotic acid (Figure 1b). Each library was partitioned into 125 sublibraries of 125 trimers. For the first library (A), the 25 synthons were partitioned in five groups, A<sub>1</sub>–A<sub>5</sub>. Each sublibrary resulted from the incorporation of one group, A<sub>n</sub> (n = 1–5), at each of the three variable positions of the synthesis (5<sup>3</sup> = 125). For the second library (B), the same 25 synthons were used, yielding the same 15 625 trimers. They were, however, partitioned *orthogonally* in five different groups, B<sub>1</sub>–B<sub>5</sub> (Figure 1b).

The important property of the couple of libraries A and B is that, for any given n and n', A<sub>n</sub> and B<sub>n'</sub> share only one synthon. Thus, any sublibrary from A and any sublibrary from B share only one trimer. In a given screen, an active trimer will confer



	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5
B 1	D-Leucine	D-Proline	D-Serine	(4-nitro)-D-phenylalanine	D-Isoglutamic acid
B 2	D-Arginine	D-Isoleucine	Glycine	D-Threonine	D-Isoglutamine
B 3	D-Glutamine	D-Tyrosine	D-Valine	D-ε-Nicotinoyl-L-lysine	D-Histidine
B 4	D-Tryptophane	D-Asparagine	D-Glutamic acid	D-Methionine sulfoxide	D-Alanine
B 5	Isonipecotic acid	D-Lysine	D-Tetrahydro-isoquinoleic acid (D-Tic)	D-Aspartic acid	D-Phenylalanine

**Figure 1.** Synthesis of the two libraries. (a) The two libraries were synthesized by solid phase synthesis.<sup>7</sup> (b) The 25 amino acids were partitioned into five groups of five amino acids, each named A<sub>1</sub>–A<sub>5</sub> for library A and B<sub>1</sub>–B<sub>5</sub> for library B. In each group, amino acids were selected to maximize the structural diversity. For the synthesis of library A, each group (A<sub>1</sub>–A<sub>5</sub>) was coupled to a chloromethylated Merrifield resin (Cl-CH<sub>2</sub>-Ⓢ), and the five mixtures of aminoacyl resins were split into five parts. To each part, one different group of amino acids were coupled. The resulting 25 dipeptidylresins were split again into five parts each and coupled with the mixtures of amino acids, leading, after deprotection and cleavage from the resin, to 125 sublibraries in a soluble form. Library B was prepared according to the same procedure, except that the orthogonal groups of amino acids, B<sub>1</sub>–B<sub>5</sub>, were used in this case.

activity to one single sublibrary of A and one single sublibrary of B. This active trimer can be unequivocally identified as the unique trimer shared between these sublibraries. The distribution of the 25 synthons in the groups A<sub>n</sub> or B<sub>n'</sub> has been made in such a way that the structural diversity within a group of synthons is as large as possible. This avoids the synthesis of sublibraries containing structurally related compounds which could generate cumulative biological activities. Typically, a group consisted of one hydrophilic, one aromatic, one charged, and one small-chain α-amino acid in addition to a nonnatural side chain amino acid. Thus, each sublibrary of A or B explores a wide structural space, and if one trimer confers an activity to its sublibrary, the 124 other trimers of this sublibrary are less likely to interfere with the biological assays. This structural diversity within the mixtures submitted to the screening procedure, together with the limited number of chemical entities present in each sample (125), allows a low background and an easy detection of biological activity.

According to our strategy, library A was screened initially in a series of assays. When a positive result was obtained in

(1) Houghten, R. A.; *et al. Nature* 1991, 54, 84–86.  
 (2) Lam, K. S.; *et al. Nature* 1991, 354, 82–84.  
 (3) Gallop, M. A.; *et al. J. Med. Chem.* 1994, 37, 1235–1251.  
 (4) Gordon, M. E.; *et al. J. Med. Chem.* 1994, 37, 1385–1401.  
 (5) Janda, K. D.; *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994, 91, 10779–10785.

(6) A related concept, named "indexed libraries" has recently been reported for the deconvolution of a mixture of 54 carbamates: Pirrung, M. C.; *et al. J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 1240–1245. Smith, P. W.; *et al. BioMed Chem. Lett.* 1994, 4, 2821–2824. This group describes a similar strategy for the screening of 1600 esters or amides.

(7) Boc-protected amino acids were esterified to a chloromethylated resin. Benzyl-based protections were used for the side chains of trifunctional amino acids. 1-Hydroxybenzotriazolyltetramethylisouronium hexafluorophosphate (HBTU) was used for the couplings of Boc-protected amino acids mixtures. To avoid the preferential incorporation of amino acids having the most favorable coupling rates, a first coupling was performed with only 1.1 equiv of acylating species for 1 equiv of amino groups available on the resin. A second coupling step was then performed to force the reaction to completion. Amino acid analysis of 10 sublibraries showed that most amino acids were within 10% of the mean value, the most divergent ratios being within 25% of this value. At the end of the synthesis, the 250 polymer-bound sublibraries were treated for 1.5 h at 0 °C with anhydrous hydrogen fluoride in the presence of *p*-cresol and *p*-thiocresol. The resulting mixtures of peptides were precipitated with a mixture of diethyl ether and pentane, dissolved in trifluoroacetic acid, reprecipitated, and lyophilized from acetic acid. (a) Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* 1963, 85, 2149–2154. (b) Tam, J. P.; Merrifield, R. B. *The peptides*; Academic Press: New York, 1987; pp 185–249.

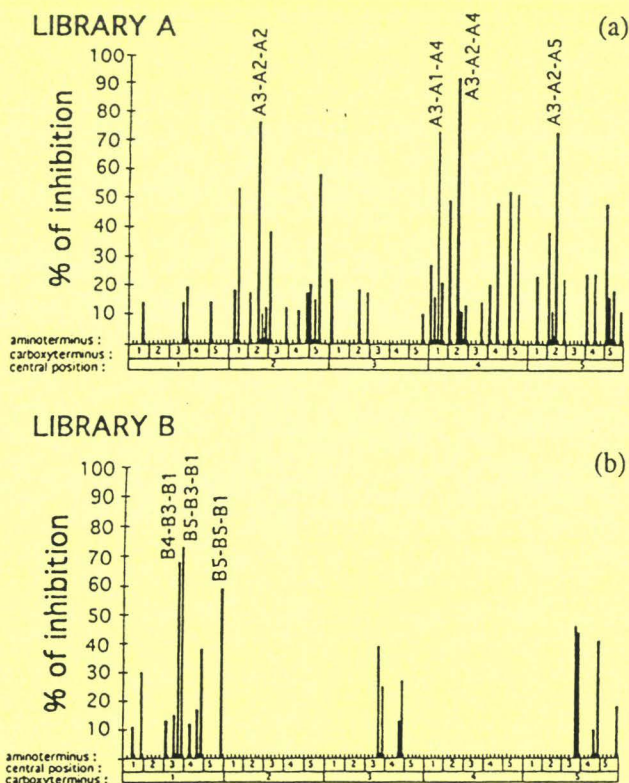


Figure 2. Biological activity of the two libraries in the V2 receptor binding assay. Cells were incubated in the presence of sublibraries from library A (a) or library B (b) at 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Each bar represents the percentage of inhibition observed for one sublibrary.

one assay, library B was screened under the same conditions. In addition to allowing a direct identification of the active compound, this approach provides an internal control, as this compound is associated with a different set of 124 trimers in library A and in library B. As an example, we report the discovery of a new ligand for the V2 vasopressin receptor. All sublibraries of library A were tested at a concentration of 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , corresponding roughly to 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of each individual compound. Activities were determined by the inhibition of binding of radiolabeled vasopressin to renal LLC-PK1 cells<sup>8</sup> (Figure 2a). The most active sublibrary was A<sub>3</sub>-A<sub>2</sub>-A<sub>4</sub>, with 92% inhibition; three other sublibraries gave inhibitions higher than 70%: A<sub>3</sub>-A<sub>2</sub>-A<sub>2</sub>, 76%; A<sub>3</sub>-A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub>, 73%; and A<sub>3</sub>-A<sub>2</sub>-A<sub>5</sub>, 73%, indicating that some replacements could be tolerated in the middle and carboxy-terminus positions, while in the amino-terminus position, A<sub>3</sub> contains a more stringent synthon. When the orthogonal library B was tested (Figure 2b), three sublibraries exhibited high activities, the most potent being B<sub>4</sub>-B<sub>3</sub>-B<sub>1</sub> with 73% inhibition, B<sub>5</sub>-B<sub>3</sub>-B<sub>1</sub> with 69%, and B<sub>5</sub>-B<sub>5</sub>-B<sub>1</sub> with 59%. This selection yielded 12 (4 × 3) possible inhibitors. To narrow the choice, we selected sublibraries on the basis of the dose-dependence of the inhibition and the potency at lower concentration. At 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , while only A<sub>3</sub>-A<sub>2</sub>-A<sub>4</sub> remained active in A (31% inhibition), in B, two sublibraries, B<sub>5</sub>-B<sub>3</sub>-B<sub>1</sub> (37%)

(8) Porcine kidney epithelial LLC-PK1 cells (American Type Culture Collection) were incubated with 3 nM [<sup>3</sup>H]AVP in the presence of inhibitors. Following incubation at 4 °C for 180 min, the cells were filtered and washed. Radioactivity was determined by liquid scintillation counting. Lutz, W.; Londowski, J. M.; Sanders, M.; Salisbury, J.; Kumar, R. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 1109–1115.

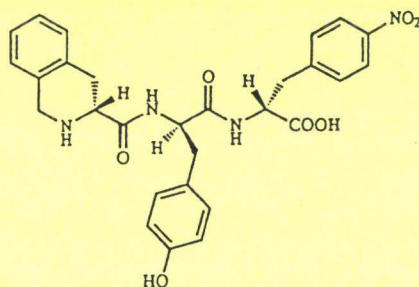


Figure 3. Structure of the trimer common to A<sub>3</sub>-A<sub>2</sub>-A<sub>4</sub> and B<sub>5</sub>-B<sub>3</sub>-B<sub>1</sub>, H-D-Tic-D-Tyr-(4-nitro)-D-Phe-OH.

and B<sub>4</sub>-B<sub>3</sub>-B<sub>1</sub> (31%) remained active. The trimer common to A<sub>3</sub>-A<sub>2</sub>-A<sub>4</sub> and B<sub>5</sub>-B<sub>3</sub>-B<sub>1</sub>, H-D-Tic-D-Tyr-(4-nitro)-D-Phe-OH (Figure 3), was synthesized and turned out to be a potent inhibitor (IC<sub>50</sub> = 63 nM) of vasopressin binding to LLC-PK1 cells. No inhibition of binding could be detected with the candidate common to A<sub>3</sub>-A<sub>2</sub>-A<sub>4</sub> and B<sub>4</sub>-B<sub>3</sub>-B<sub>1</sub>, H-D-Glu-D-Tyr-(4-nitro)-D-Phe-OH. It is thus possible that activity in the sublibrary B<sub>4</sub>-B<sub>3</sub>-B<sub>1</sub> resides in an unwanted byproduct when the reactions are performed in pools. The unambiguous identification of D-Tic as a necessary pharmacophore for V2 antagonism is further substantiated by a classical approach<sup>1</sup> to the identification of the active species in A<sub>3</sub>-A<sub>2</sub>-A<sub>4</sub>: among the five mixtures of 25 trimers where ambiguity at the first position has been resolved, only D-Tic-A<sub>2</sub>-A<sub>4</sub> (and not D-Glu-A<sub>2</sub>-A<sub>4</sub>) was active.

In summary, the use of orthogonal self-deciphering libraries offers several advantages: it allows the screening of compounds in their soluble form, it is not limited to polypeptides or other sequencable polymers, and it does not introduce any restriction to the chemical strategies used to generate the diversity. It can even be used for the rapid screening of existing libraries of individual compounds which can be organized as orthogonal mixtures. The interest of this approach increases with the number of screens to which the libraries are submitted, as once the libraries are prepared, no further step of deconvolution or analysis is required.<sup>9</sup> Moreover, orthogonal libraries also offer an internal validation, as any positive result detected in one library must be confirmed by a positive result in the orthogonal library, thus allowing the detection of false positive results.

**Acknowledgment.** We thank M. G. Néliat (CEREP, Poitiers, France) for performing the binding assays and Ms. Florence Loriolle for technical assistance. B.D. and X.W. are supported by a Region Nord-Pas-de-Calais grant.

JA943561X

(9) Although also based on partitioning the library into sublibraries, orthogonal libraries differ from the positional scanning described by R. Houghten (Pinilla, C.; *et al. Biotechniques* 1992, 13, 901–905) in several aspects. A positional scan in this case would have required the synthesis of 75 sublibraries (OXX, XOX, and XXO) instead of 250. However, each sublibrary consists of 25 × 25 = 625 compounds instead of 5 × 5 × 5 = 125, introducing a 5-fold dilution factor (although in each case, the libraries contain 15 625 different compounds, in the positional scanning, each compound is synthesized three times). Moreover, the 625 compounds share the same defined position, introducing the risk that among the different possibilities, the determination of the most active sublibrary will favor the defined residue (O) which is compatible with the greatest number of combinations in the two variable positions (X) and not the residue belonging to the most active molecular entity. This risk is greatly diminished with orthogonal libraries, which are organized to maximize the diversity within each sublibrary. Moreover, each compound is tested in the presence of two different sets of 124 compounds in libraries A and B.



# INTRODUCTION

## *La nécessité de disposer d'un grand nombre de molécules pour les soumettre aux tests de criblage*

Sensibilisés par le problème d'approvisionnement du test de criblage TR, nous nous consacrons maintenant à l'étude de la chimie combinatoire et à la préparation de ces bibliothèques de composés chimiques destinées à être « criblées » sur de nombreux tests biologiques.

Dans cette partie, nous ferons d'abord un bilan des différents travaux effectués jusqu'ici en chimie combinatoire, en nous basant sur une revue écrite à laquelle nous avons contribué. Puis, nous développerons en détails la technique originale mise au point au laboratoire, celle des « bibliothèques orthogonales », qui permet d'identifier rapidement une molécule active dans un mélange. Nous décrirons ensuite l'étude de relations structure/activité que nous avons entreprise sur un tripeptide actif identifié grâce à cette méthode. Enfin nous présenterons la conception et la synthèse d'une seconde bibliothèque combinatoire qui se différencie de la précédente par sa nature non peptidique.

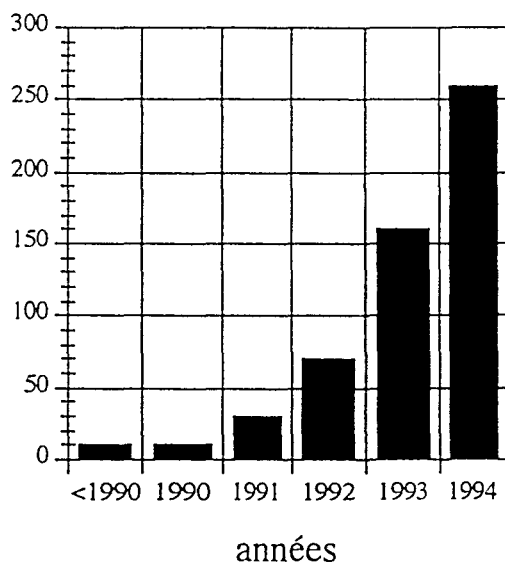
# CHAPITRE I

## LA SYNTHÈSE COMBINATOIRE :

### UN ACCES RATIONNEL A LA DIVERSITE

La chimie combinatoire est un sujet jeune mais a déjà suscité beaucoup d'intérêt<sup>21,22,23</sup>, le schéma 18 montre que le nombre de publications parues sur le thème de la diversité moléculaire est en croissance exponentielle depuis 4 ans.

Schéma 18 : Evolution annuelle du nombre de publications traitant de la diversité moléculaire



La chimie combinatoire a fait l'objet de nombreuses mises au point dont certaines, issues de notre laboratoire et auxquelles nous avons contribué<sup>24,25,26,27</sup>.

La présentation bibliographique ci-après reprend les principaux points d'une de ces revues intitulée « **Synthèse combinatoire : les autoroutes de la diversité** » par

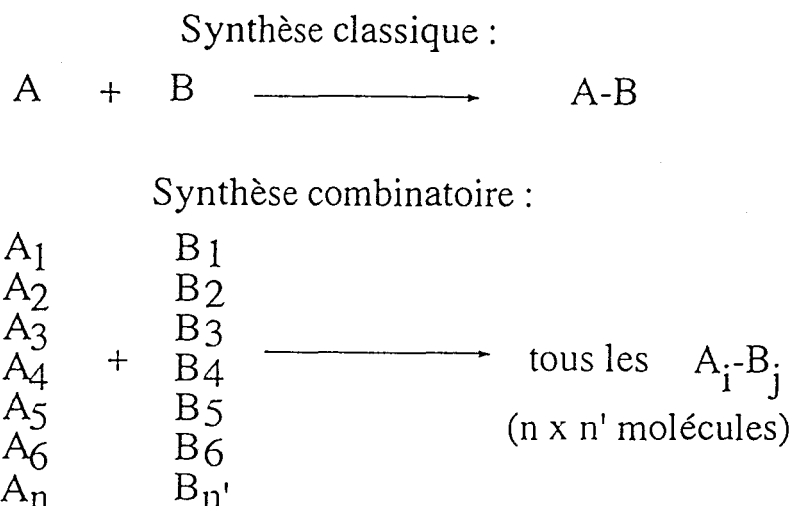
L. Bourel, X. Williard, I. Pop, R. Baudelle, D. Horvath, B. Déprez, P. Melnyk, A. Tartar

*L'actualité chimique*, déc. 1995, 33-40

## I/ DEFINITION ET PRINCIPE DE LA SYNTHÈSE COMBINATOIRE

Si en synthèse classique, un réactif **A** réagit avec un réactif **B** pour conduire au produit **A-B**, en synthèse combinatoire deux familles de réactifs ( $A_1, A_2 \dots A_i$ ) et ( $B_1, B_2 \dots B_j$ ) réagissent et toutes les combinaisons de  $A_1B_1, A_2B_1, A_1B_2 \dots$  jusque  $A_iB_j$  sont obtenues (schéma 19).

Schéma 19 : Principe de la synthèse combinatoire



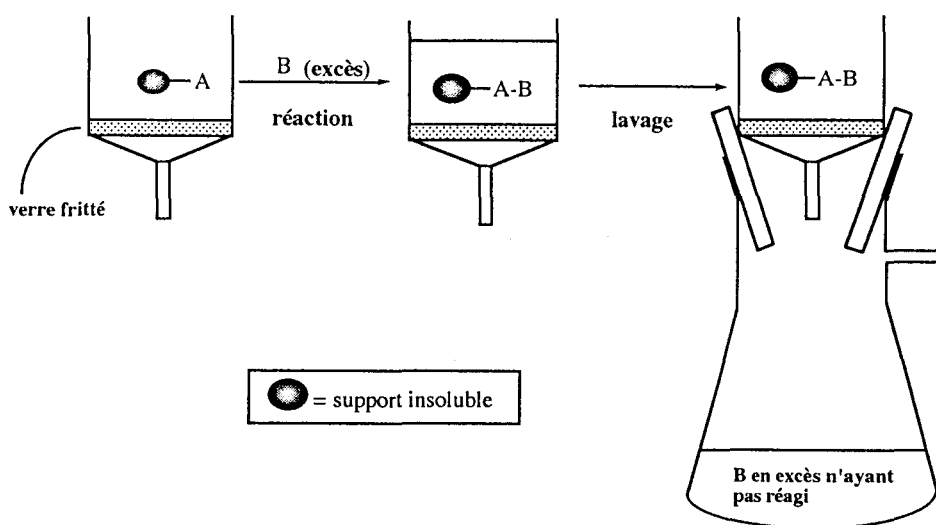
Cette définition exige d'utiliser des réactions qualifiées de « robustes », il s'agit de réactions dont les rendements sont élevés, engendrant peu de sous-produits, faciles à mettre en oeuvre et pouvant s'appliquer à un grand nombre de réactifs. L'ensemble des produits obtenus est appelé « bibliothèque » (ou « library » en Anglais).

Les produits peuvent être synthétisés en mélange ou individuellement. Historiquement, les produits ont été préparés en mélanges et les mélanges obtenus étaient soumis aux tests de criblage. Quand un mélange était actif, il s'agissait alors d'*identifier rapidement le produit conférant l'activité*.

La chimie combinatoire peut être effectuée en phase homogène (tous les réactifs sont alors en solution) ou en phase hétérogène (un des réactifs, ou une des familles de réactifs est

immobilisé(e) sur un polymère, qui peut être un polystyrène réticulé ou un polypropylène). Pour accéder rapidement à des produits différents en mélange, il est indispensable d'éviter toute réaction secondaire et d'avoir une technique de purification rapide et si possible universelle. C'est pourquoi la chimie sur support solide est quasiment toujours employée : elle permet d'utiliser des excès de réactifs et de les éliminer par filtration comme le montre le schéma 20.

Schéma 20 : Principe de la synthèse en phase solide



Le souci majeur de la synthèse combinatoire est de générer des molécules les plus diverses possibles. Pour qualifier les réactifs employés, on parlera dans la suite de ce mémoire indifféremment de « variants » ou de « synthons », ces deux mots synonymes définissent des molécules possédant à la fois une fonction réactive et une chaîne latérale intéressante en termes de diversité et d'interactions potentielles avec des systèmes biologiques macromoléculaires (récepteurs, enzymes...). Un choix judicieux des synthons génère des molécules diverses et donc une bibliothèque intéressante pour le criblage.

L'intérêt majeur de la chimie combinatoire est de permettre de *synthétiser rapidement un grand nombre de molécules très diverses pour les soumettre aux tests de criblage.*

Si le nombre de synthons (ou variants) employés à chaque étape est  $N$ , et s'il y a  $n$  étapes, le nombre total de produits générés est  $N^n$ .

Nous montrons dans le tableau 2 qu'à partir de 19 aminoacides naturels (la cystéine n'est pas utilisée),  $N=19$ , et d'un nombre d'étapes  $n$  égal à 2,  $19^2$ , c'est-à-dire 361 dipeptides sont synthétisés en une heure à peine. Si  $n = 3$  étapes,  $19^3$ , soient 6 859 tripeptides sont synthétisés dans le même ordre de temps.

**Tableau 2 :** Puissance de la synthèse combinatoire à partir de 19 variants

n	nombre de molécules	temps nécessaire
2	361	1 heure
3	6.859	
4	130.321	
5	2.476.099	1 journée
6	47.045.881	
7	893.871.739	
8	16.983.563.041	
9	322.687.697.779	3 jours
10	$6,1310663 \cdot 10^{12}$	
20	$3,7589974 \cdot 10^{25}$	

**n :** nombre d'étapes combinatoires

Plus généralement, la quantité totale de produits générés est égale au produit des quantités de réactifs employés à chaque étape, c'est-à-dire que si  $N$  est différent pour chaque étape, le nombre total de produits synthétisables est égal à  $N_1 \times N_2 \times \dots \times N_n$ .

Un très grand nombre de molécules peut ainsi être synthétisé rapidement. La méthode combinatoire permet de gagner beaucoup de temps.

Mais, par exemple 2 476 099 pentapeptides (lorsque  $n = 5$  dans le tableau 2) ne sont pas présentés aux tests de criblage en un mélange unique. Si c'était le cas, une molécule active aurait peu de chances d'être détectable parmi deux millions de molécules inactives. Lors de la synthèse de la bibliothèque, des mélanges de taille adaptée au criblage sont préparés : il s'agit de « sous-bibliothèques » ou « lots », dont l'effectif est d'environ 100 à 200 molécules. Dans ces

conditions, il est possible de détecter des molécules actives avec un rapport signal/bruit convenable. L'ensemble des « lots » ou « sous-bibliothèques » est soumis aux tests de criblage et constitue la bibliothèque totale.

Quand une activité est détectée dans un lot, il s'agit de procéder à l'identification du constituant responsable de cette activité. Cette opération est appelée « déconvolution » c'est-à-dire décodage.

La synthèse combinatoire a enfin l'avantage de permettre de tester des produits sans les isoler, les caractériser ou les purifier. Un travail de validation précède la synthèse de la bibliothèque proprement dite et un contrôle analytique ou colorimétrique suit chaque étape réactionnelle, mais les produits obtenus ne sont pas tous isolés et identifiés comme dans une approche classique. Ce n'est que lorsqu'une activité positive est détectée que le produit responsable est identifié, purifié et caractérisé : à ce niveau aussi, un temps important est gagné.

## **II/ LES PRINCIPALES STRATEGIES D'IDENTIFICATION STRUCTURALE :**

Ces techniques se séparent en deux groupes selon que les produits sont testés en solution ou toujours fixés au polymère qui a été leur support de synthèse.

### **II-1/ Les produits de la bibliothèque sont testés en solution**

Trois techniques principales ont été décrites :

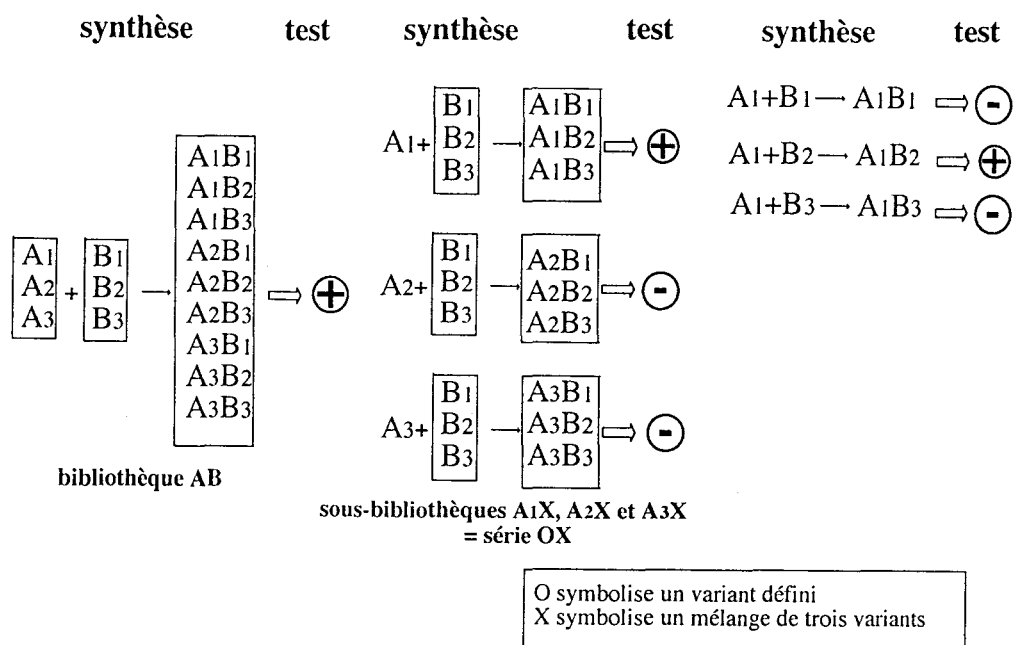
- La méthode itérative
- La méthode dite du « positionnal scanning »
- La méthode des bibliothèques orthogonales

#### ***II-1-1/ La méthode itérative***

Houghten *et coll.*<sup>28</sup> ont proposé les premières méthodes de « déconvolution » : la *déconvolution* est l'ensemble des opérations, resynthèses ou croisements nécessaires à l'identification d'un produit actif. La technique itérative est la première à avoir été décrite : par une suite de resynthèses où une position est fixée à chaque cycle, le doute est progressivement

levé sur la structure de la molécule active comme le montre le schéma 21 appliqué à une bibliothèque de 9 composés.

**Schéma 21** : Principe de la méthode itérative :



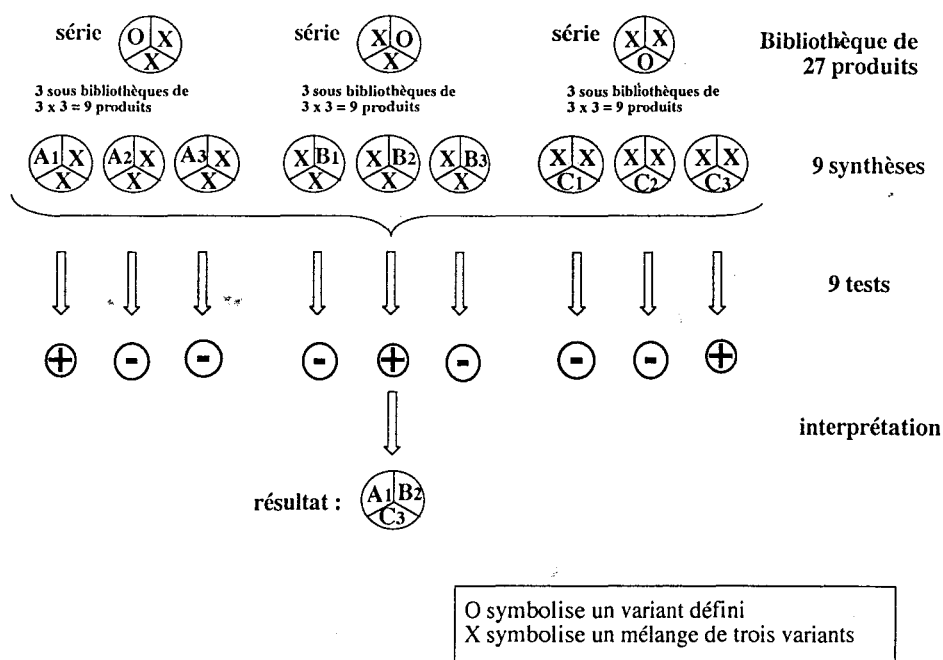
La bibliothèque **AB** est active, trois bibliothèques de taille plus petite vont être synthétisées : **A<sub>1</sub>** sur lequel réagissent **B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>** en mélange, **A<sub>2</sub>** sur lequel réagissent **B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>** en mélange et enfin **A<sub>3</sub>** sur lequel réagissent **B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>** en mélange. Les sous-bibliothèques **A<sub>1</sub>X**, **A<sub>2</sub>X** et **A<sub>3</sub>X**, (où **X** symbolise un mélange de synthons dans une position donnée) sont de nouveau présentées au test de criblage. Comme **A<sub>1</sub>X** possède encore une activité, il est procédé à l'élucidation de la deuxième partie de la molécule **A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>**, **A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>** et **A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>** sont synthétisés individuellement et après un nouveau test, la molécule active **A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>** est identifiée.

Cette technique a le désavantage de nécessiter des resynthèses, une constante interface entre la chimie et la biologie et d'être assez longue : il y a en effet **N x n** resynthèses à effectuer.

## II-1-2/ La méthode dite du « positionnal scanning »

Les mêmes auteurs ont proposé cette autre technique<sup>29,30</sup>, que nous pouvons traduire en Français par « balayage positionnel ». Cette fois, la bibliothèque est, dès le départ, organisée de telle sorte que dans chaque sous-bibliothèque, une des positions soit fixée au préalable. La lecture des résultats biologiques conduit alors immédiatement à l'identification de la structure du produit actif, puisqu'à chaque sous-bibliothèque testée, une des positions est identifiée, comme le montre le schéma 22 appliqué à une bibliothèque de 27 composés.

Schéma 22 : Principe du « positionnal scanning »



La bibliothèque est divisée en 3 fois 3 sous-bibliothèques de 9 produits chacune, testées en parallèle. Le nombre de sous-bibliothèques suit la même loi que dans la méthode précédente  $N \times n = 27$  mais l'interprétation des résultats biologiques confère immédiatement la structure du composé actif A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>.

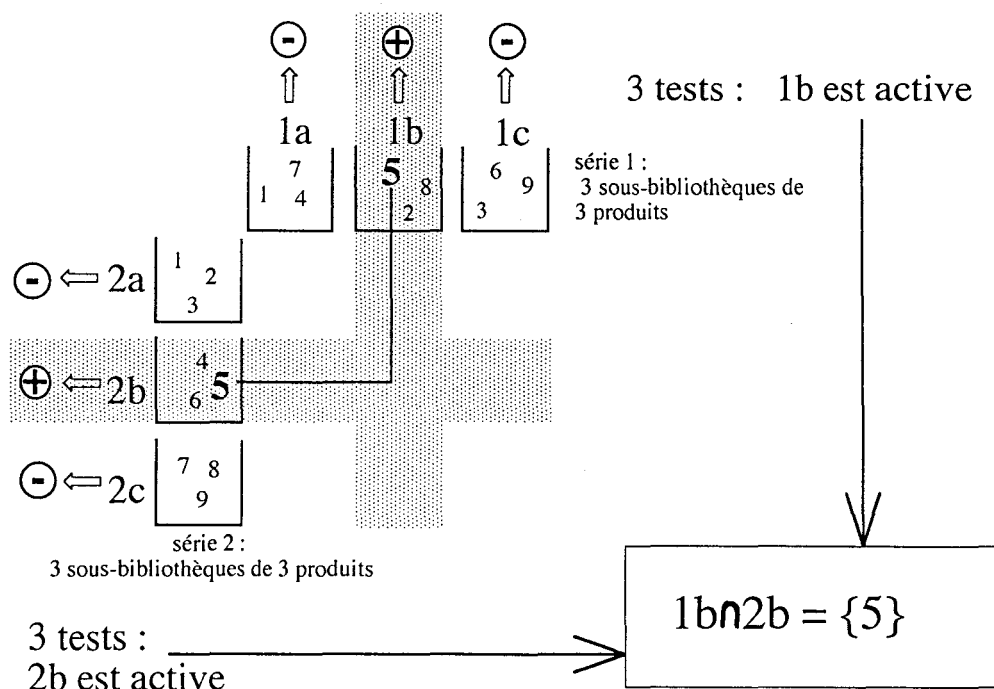
Cette méthode a l'avantage de ne pas nécessiter de resynthèse, ni d'interaction étroite entre la chimie et la biologie. Cependant, elle ne conduit pas systématiquement à l'identification du composé le plus actif car les différentes parties de la molécule sont identifiées indépendamment des autres.



### II-2-3/ La méthode des bibliothèques orthogonales

Déprez *et coll.*<sup>31</sup> ont proposé une technique d'identification de produits en solution ne nécessitant pas de déconvolution. Comme la méthode précédente, la méthode des « bibliothèques orthogonales » repose sur la répartition de la bibliothèque dès sa synthèse en deux séries de sous-bibliothèques **A** et **B**, préalablement définies : il s'agit de deux répartitions différentes de la même bibliothèque. Le nombre de composés par sous-bibliothèque de **A** est égal au nombre de sous-bibliothèques de **B** et inversement. La synthèse est organisée de telle sorte que les composés présents en mélange dans une sous-bibliothèque de **A** sont répartis à raison d'un composé seul par sous-bibliothèque de **B**. Ainsi, entre une sous-bibliothèque de **A** et une sous-bibliothèque de **B**, il n'y a qu'un composé en commun permettant l'identification d'un produit actif par croisement comme le montre le schéma 23 appliqué à une bibliothèque de 9 composés.

Schéma 23 : Principe de la partition orthogonale et de l'identification du produit actif



Le croisement d'une sous-bibliothèque active de **A** avec une sous-bibliothèque active de **B** permet l'identification immédiate, sans risque de faux positif, du produit actif.

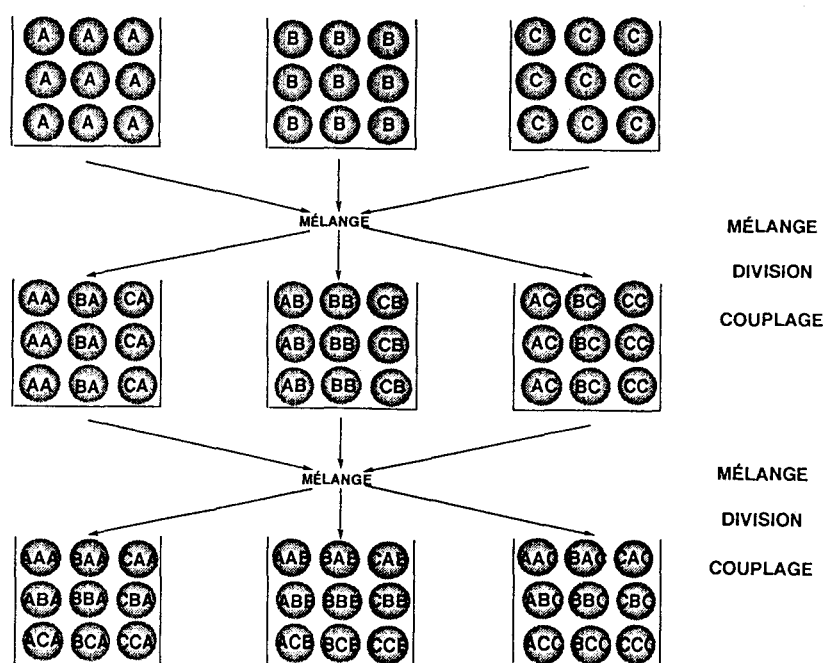
## II-2/ Les produits sont testés liés à un support insoluble

Quand les produits sont testés *encore immobilisés sur le polymère*, une autre technique peut être appliquée, celle de « l'étiquetage moléculaire » (en Anglais « tagging »), elle se base sur un principe de synthèse en phase solide où une bille de polymère porte un seul composé (en Anglais, « one bead-one compound »).

### II-2-1/ « Une bille-un composé »

Il s'agit d'une conséquence d'un principe de synthèse sur support solide appelé « division-couplage-mélange », (en Anglais, « split-mix »). Le polymère est divisé à chaque étape en autant de parties qu'il y a de réactifs à coupler comme le montre le schéma 24 où sont incorporés les composés de la famille chimique A à la première étape après avoir séparé le polymère en 3. Les billes sont remélangées et divisées en 3 pour incorporer les composés de la famille B individuellement à l'étape 2. Un deuxième remélange précède la division en trois parties de la résine et le couplage des composés de la famille chimique C.

Schéma 24 : Principe de la méthode « division-couplage-mélange »



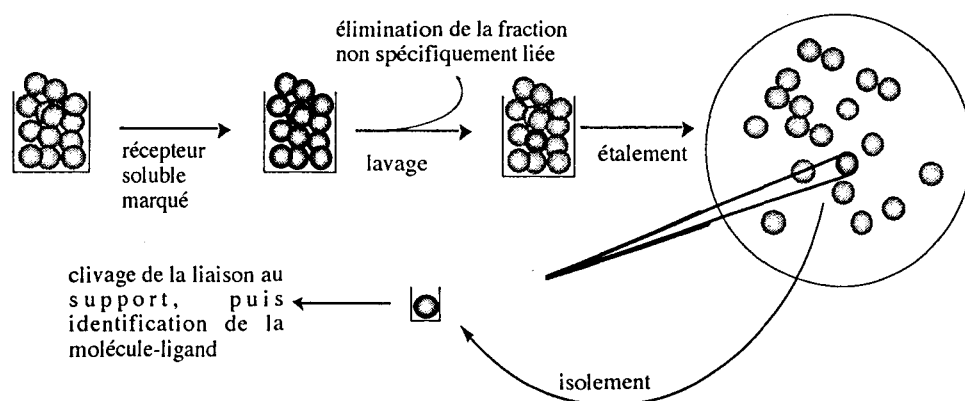
La conséquence de cette méthode est qu'une bille donnée a suivi un et un seul chemin et porte donc un et un seul composé à sa surface.

### II-2-2/ L'étiquetage moléculaire

La bille qui porte un et un seul produit à sa surface peut aussi porter une information retraçant l'historique de sa synthèse sous forme d'« étiquette chimique »<sup>32</sup>. Cette étiquette est couplée avant le synthon qu'elle code sur une petite fraction des sites réactifs et la méthode de « division-couplage-mélange » est appliquée.

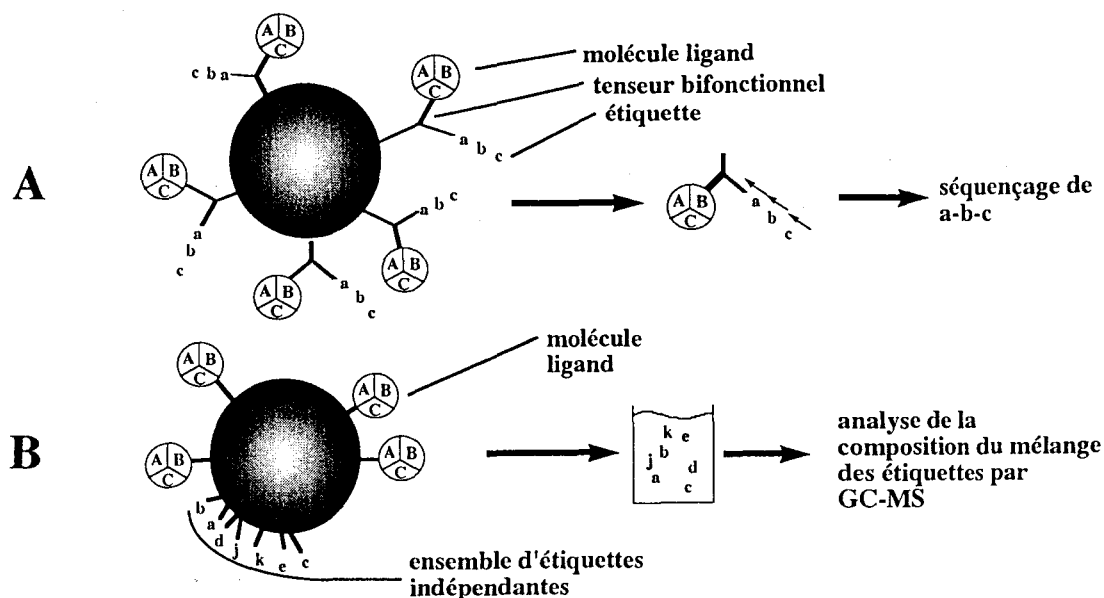
Si une activité est détectée sur une bille, celle-ci est séparée du mélange comme le montre le schéma 25, l'étiquette est « coupée », analysée et la structure de la molécule active portée par la bille est alors identifiée.

Schéma 25 : Criblage de composés liés à un support insoluble



Si la molécule est de nature peptidique, elle est séquençable et sa structure est connue par la dégradation d'Edman. Les premières « étiquettes » ont donc été les peptides eux-mêmes. Ceux-ci peuvent coder pour des molécules non peptidiques comme le montre le cas A du schéma 26. Mais le nombre de combinaisons s'étant révélé insuffisant, aujourd'hui les étiquettes ne sont plus uniquement de nature séquentielles et ne se limitent plus aux peptides. Dans le cas B, les étiquettes sont indépendantes et une coupure simultanée suivie d'une « lecture chromatographique »<sup>33</sup> permet l'identification de la molécule active.

Schéma 26 : Deux stratégies d'étiquetage moléculaire

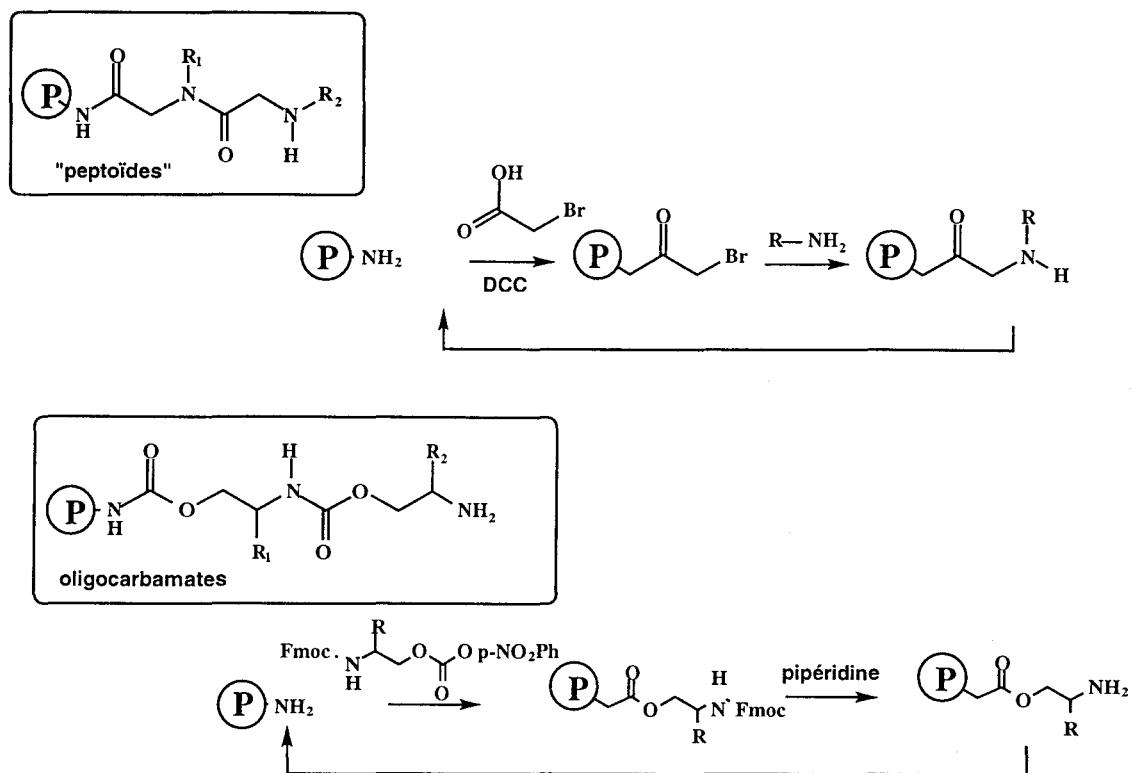


### III/ LA CHIMIE COMBINATOIRE, UN DEFI POUR LES ORGANICIENS

Puisque la synthèse combinatoire est exigeante en matière de « robustesse » des réactions et qu'elle utilise souvent la phase hétérogène, un grand intérêt est porté sur les méthodes de synthèse en phase solide, sur la nature des supports polymériques et sur les moyens d'accéder rapidement à la diversité. Le cas idéal est l'emploi de polymères à propriétés de gonflement les plus universelles possibles<sup>34</sup>, tout en utilisant des agents de coupure les plus doux possibles pour libérer le produit fini de la bille.

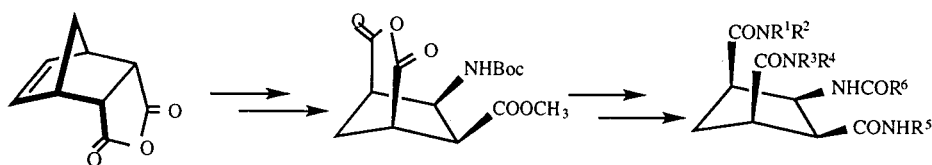
Les stratégies qui permettent d'accéder à la diversité sont multiples : l'oligomérisation, par exemple, (schéma 27) met en jeu des composés bifonctionnels habituellement rencontrés dans les polymères, ou les structures polyfonctionnelles comme les peptoides<sup>35,36</sup> ou les oligocarbamates<sup>37</sup>.

Schéma 27 : Peptoides et carbamates : Structure et synthèse



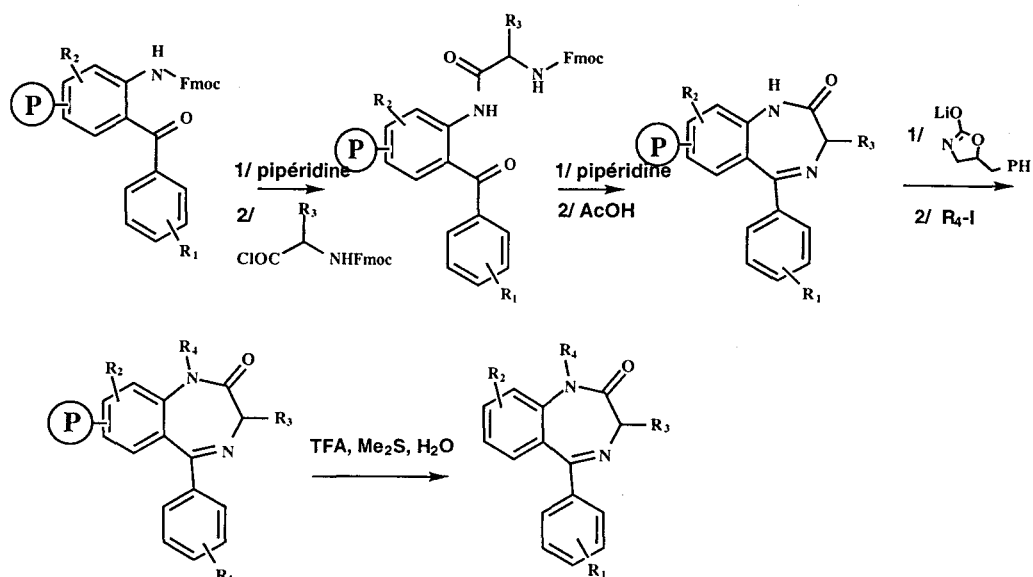
Les squelettes décorés ou « template » (schéma 28), quant à eux, sont de grosses molécules fonctionnalisables qui imposent une conformation précise<sup>38</sup>.

Schéma 28 : Décoration d'un squelette



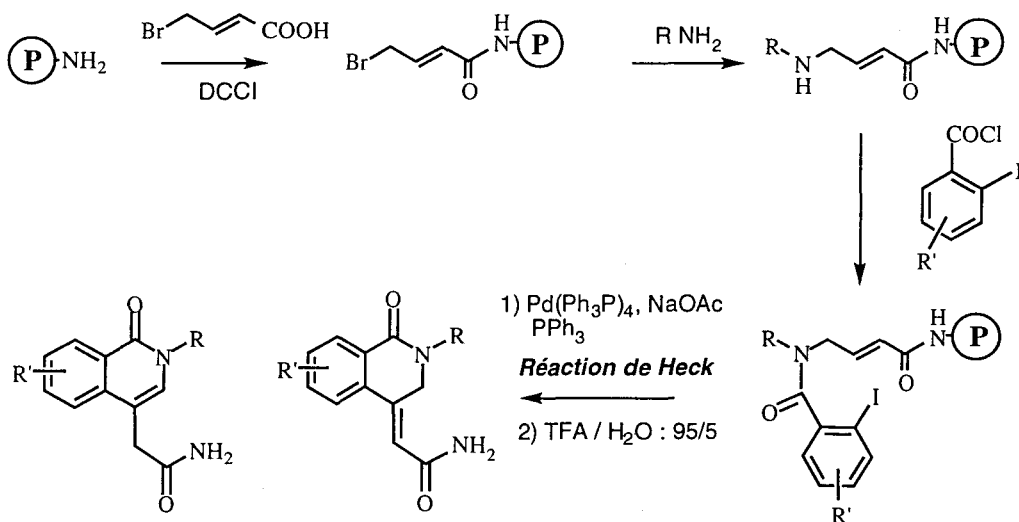
Enfin, un gros effort est entrepris en matière de chimie hétérocyclique : la motivation est que plus de 50% des médicaments commercialisés comportent au moins un hétérocycle. Des hétérocycles comme les hydantoïnes et les benzodiazépines<sup>39</sup> sont synthétisés en phase solide tout en utilisant des réactifs simples et porteurs de chaînes latérales diverses (schéma 29).

**Schéma 29 : Synthèse d'une bibliothèque de benzodiazépines**



D'abord basée sur la chimie du peptide et de la liaison amide, la chimie combinatoire s'oriente aujourd'hui vers des réactions plus complexes impliquant la création de liaisons carbone-carbone, des réactions de Wittig-Horner<sup>40</sup>, de Michaël, de Mitsunobu, de Heck<sup>41</sup>(schéma 30)... le tout en phase solide.

**Schéma 30 : Synthèse d'une bibliothèque d'isoquinolinones**



Si la synthèse sur support solide, autrefois réservée à la chimie du peptide, a permis à la chimie combinatoire de réaliser ses objectifs et de générer de la diversité, aujourd'hui, grâce à la chimie combinatoire les chimistes « non peptidistes » s'intéressent de près à cet outil.

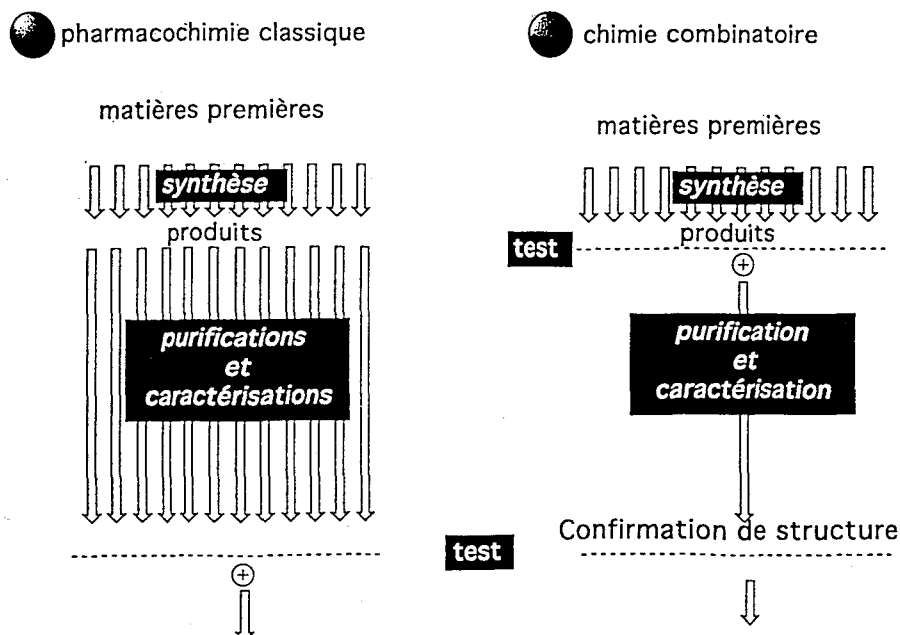
## IV/ CONCLUSION

Les méthodes de synthèse combinatoire ont suscité beaucoup d'intérêt ces dernières années parce que d'une part, les capacités du criblage ont augmenté et qu'il faut alimenter les tests, et d'autre part, parce qu'elles ont déjà donné des résultats intéressants. Aujourd'hui, ces bibliothèques de composés sont incontournables puisqu'elles sont pensées, conçues et synthétisées avec le souci du test biologique en aval. Leur émergence risque de faire augmenter le nombre de « touches » issues des tests de criblage et il faudra alors choisir la meilleure en termes de stabilité, de biodisponibilité potentielle.

L'outil informatique est devenu indispensable puisqu'il permet de prédire et plus tard de retraiter les informations qui affluent.

Enfin, le gros avantage de la chimie combinatoire est que la barrière du test biologique est placée immédiatement après la synthèse, ce qui permet un gain de temps considérable par rapport à l'approche classique, où le test biologique n'intervient qu'après purification de tous les produits. Le Schéma 31 montre que la « surface » de travail passé à la purification et à la caractérisation (l'ensemble des flèches parallèles) est invariable dans l'approche classique et importante qu'il y ait ou non présence d'un composé actif. Dans la stratégie combinatoire, cette « surface » de travail se limite dans un premier temps à la synthèse. Si un composé positif est détecté, il sera le seul à être purifié et caractérisé, le gain de temps se situe à ce niveau.

**Schéma 31** : Comparaison entre la pharmacochimie « classique » et la pharmacochimie combinatoire



# Synthèse combinatoire

## Les autoroutes de la diversité

Line Bourel\* pharmacien doctorant, Xavier Williard\* pharmacien doctorant, Iuliana Pop\* ingénieur doctorant, Romuald Baudelle\* ingénieur, Dragos Horvath\* ingénieur, Benoît Déprez\* pharmacien, Patricia Melnyk\* docteur ingénieur, André Tartar\* et\*\* professeur

En l'espace de quelques années, l'émergence des méthodes de synthèse combinatoire est en passe de révolutionner une étape clé dans le processus complexe de découverte d'un nouveau médicament : l'identification d'une nouvelle tête de série (lead compound) [1, 2]. Cette tête de série, après une suite d'optimisations structurales, conduira au candidat requis, tant au point de vue toxicologique que pharmacologique, pour entrer en développement clinique.

Alors que d'importants efforts étaient entrepris dans le "design" rationnel de nouvelles molécules, l'industrie pharmaceutique n'a jamais abandonné l'approche purement empirique reposant sur le criblage systématique de grands nombres de composés, méthode qui a conduit et conduit encore à la découverte de la majorité des têtes de série identifiées.

Devant les succès remportés par cette méthode, des efforts considérables ont été consacrés à l'amélioration des performances des tests de criblage : l'augmentation du nombre et de la diversité des cibles est rendue possible par les avancées de la biologie moléculaire mais surtout par l'accroissement considérable de la capacité des tests (les ensembles robotisés disponibles actuellement peuvent évaluer plusieurs centaines de milliers de composés par an).

Traditionnellement, les composés testés provenaient des échantillons des sociétés pharmaceutiques, alimentées au fil des années par la production des chimistes ou par les substances naturelles, qu'elles soient issues de plantes, d'animaux ou de fermentation microbienne. Depuis quelques années, le facteur limitant est devenu l'alimentation des tests de criblage en composés nouveaux. D'une part, les échantillons chimiques sont périssables, de réapprovisionnement problématique (les chimistes ayant réalisé les synthèses ont souvent quitté la société) et surtout de faible diversité structurale, car elles sont le reflet des grands programmes

développés antérieurement. Le nombre de composés appartenant à la famille des benzodiazépines ou des  $\beta$ -lactames, pour lesquels les tests de criblage ont récemment mis en évidence des activités totalement inattendues, s'explique probablement en grande partie par leur surreprésentation au sein des échantillons.

A l'opposé, les produits d'origine naturelle sont une source beaucoup plus importante de diversité structurale. Par contre, ils exigent des étapes longues et difficiles de purification et d'analyse structurale, pouvant conduire *in fine* à des composés que leur complexité chimique peut rendre difficilement exploitables (synthèse totale difficile, faible nombre d'analogues accessibles).

Ce problème de la diversité moléculaire est donc crucial comme en témoigne le nombre de publications s'y reportant, en croissance exponentielle (figure 1).

Pour résoudre ce problème, les chimistes ont été conduits depuis quelques années à proposer des solutions originales et rationnelles pour répondre aux exigences du criblage. Il s'agit, en fait, de synthétiser le plus rapidement possible un grand nombre de molécules, très différentes les unes des autres.

Afin d'accélérer le processus, la purification et l'identification structurale n'interviennent que si une activité intéressante a été détectée.

A la base de toutes ces solutions originales se trouve le concept de synthèse combinatoire.

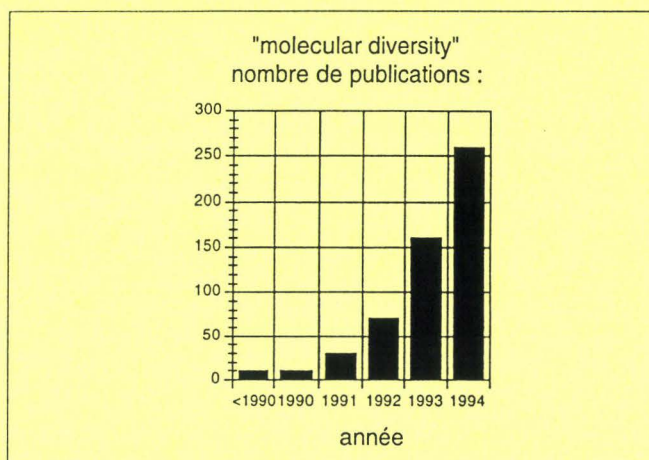


Figure 1 - Évolution annuelle du nombre de publications traitant de la diversité moléculaire.

\* Institut Pasteur de Lille, Chimie des biomolécules, URA CNRS 1309, 1 rue du Pr Calmette, 59019 Lille Cedex. Tél. 20.87.71.96. Fax : 20.87.73.77.

\*\* Faculté de pharmacie, rue du Professeur Laguesse, 59045 Lille Cedex.



## Définition et principe de la synthèse combinatoire

Le principe général de la synthèse combinatoire est schématisé sur la *figure 2*. Traditionnellement, en synthèse organique, deux réactifs A et B sont mis en réaction l'un avec l'autre dans des conditions conduisant à un produit A-B sinon unique, pour le moins majoritaire.

A l'opposé, en synthèse combinatoire, les réactions mettent en jeu des ensembles de réactifs : en général, un ensemble de composés d'une réactivité A ( $A_1$  à  $A_n$ ) sera opposé à un ensemble de composés de l'autre réactivité B ( $B_1$  à  $B_{n'}$ ) conduisant à toutes les combinaisons possibles de  $A_1-B_1$  à  $A_n-B_{n'}$ . Ainsi, par exemple, deux composés  $A_1$ ,  $A_2$  réagiront avec deux composés  $B_1$ ,  $B_2$  pour conduire à quatre produits  $A_1B_1$ ,  $A_1B_2$ ,  $A_2B_1$  et  $A_2B_2$  obtenus sous forme d'un mélange. D'une manière générale, la réaction de  $n$  composés A avec  $n'$  composés B conduira à un mélange contenant  $n \times n'$  produits. Aucune purification n'est réalisée à ce stade, le mélange étant directement soumis aux tests biologiques. Si l'un d'eux s'avère positif, on procédera à l'identification du composé responsable de l'activité détectée au sein du mélange.

Une telle stratégie n'est pas sans entraîner de sévères contraintes au niveau des méthodes chimiques mises en jeu. Plus encore qu'en synthèse organique classique, il sera important que les réactions utilisées soient robustes, s'appliquant de manière générale à une grande variété de réactifs A ou B et conduisant selon un même chemin réactionnel à une structure générique A-B unique avec de bons rendements. Dans le cas inverse, on aboutira à des mélanges inextricables

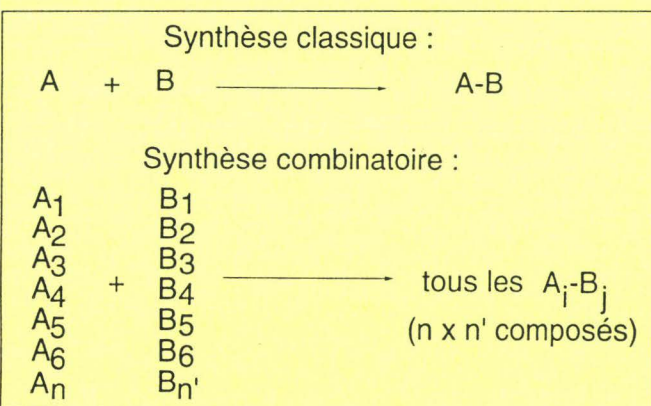


Figure 2 - Principe de la synthèse combinatoire.

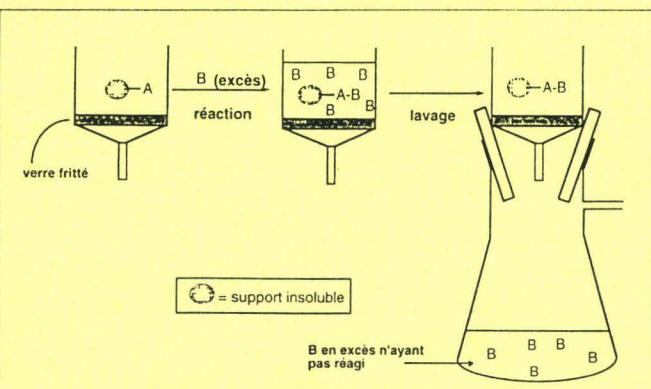


Figure 3 - Principe de la synthèse en phase solide.

rendant illusoire toute tentative d'identification structurale d'un composé actif.

Dans ce contexte, les méthodes de synthèse sur support solide apportent un avantage considérable. Le principe en est simple : au départ, l'un des réactifs (ou famille de réactifs) A est lié de manière covalente à un polymère insoluble. Le second réactif (ou famille de réactifs) B est amené en solution. A l'issue de la réaction, le produit A-B, lié de manière covalente au polymère est facilement séparé des solvants, catalyseurs... par une simple opération de filtration (*figure 3*).

L'un des avantages de la synthèse combinatoire sur support solide est d'éviter que certains des composés obtenus ne soient perdus lors d'étapes de précipitation, extraction ou autres, ce qui serait inévitablement le cas si les réactions étaient réalisées en phase homogène (méthode utilisée classiquement en synthèse organique). L'autre avantage est que de gros excès de réactifs peuvent être employés de manière à rendre les réactions rapides et totales, puisqu'il sera facile de les éliminer par la suite. Ainsi la complexité des mélanges finals sera limitée et leur prédictibilité améliorée.

Selon les cas, les produits de réactions seront testés directement, encore liés de manière covalente au polymère ou libérés de ce dernier par clivage de la liaison qui les associe au polymère et testés sous forme soluble.

C'est d'abord à ce niveau que se différencient les méthodes permettant d'identifier la structure des composés actifs.

## Stratégies d'identification structurale

Elles seront directement conditionnées par la façon dont les bibliothèques ont été conçues.

### Mélanges de produits en solution

Les mélanges issus du clivage de la liaison les reliant au polymère seront testés de manière classique, comme pour tout composé individuel soumis au criblage. La principale différence par rapport aux mélanges issus des produits d'origine naturelle est que le format sous lequel est présenté un mélange combinatoire sera conçu, dès le départ, de manière à permettre l'identification d'un composé actif sans avoir à recourir au schéma classique de purification et d'élucidation structurale. Le principe général consiste à jouer sur la subdivision de l'ensemble des composés (la "bibliothèque"), par la préparation d'une série de sous-ensembles (les "sous-bibliothèques") qui seront évaluées séparément. Selon les cas, cette subdivision interviendra dès la synthèse de la bibliothèque ("positional scanning", "orthogonal partition") ou après la détection d'une activité biologique (déconvolution itérative).

Plusieurs méthodes ont ainsi été proposées.

### La déconvolution

La déconvolution, développée initialement par Houghten [3] est une méthode efficace, mais présente le désavantage d'exiger une nouvelle série de synthèses pour chaque activité détectée. Le principe est illustré sur la *figure 4* : l'association covalente de trois réactifs  $A_1$ ,  $A_2$  et  $A_3$  avec trois réactifs  $B_1$ ,  $B_2$  et  $B_3$  conduit au mélange de neuf produits. Si une activité est détectée au sein de ce mélange, l'identification du produit actif

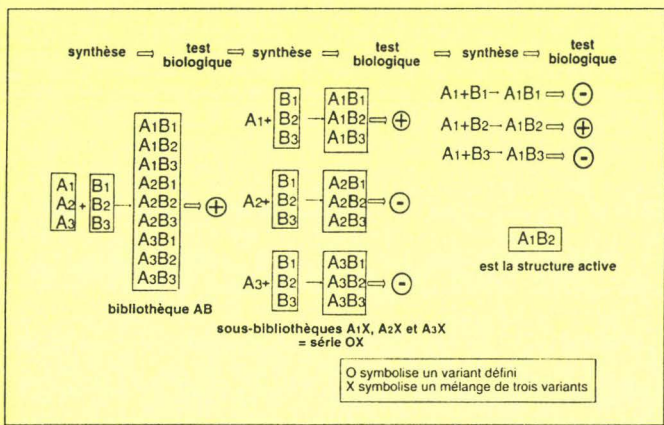


Figure 4 - Principe de la déconvolution itérative appliqué à une bibliothèque de 9 composés.

se fera en deux étapes successives : dans un premier temps, trois mélanges différents sont synthétisés : au lieu d'employer le mélange  $A_1$ ,  $A_2$  et  $A_3$ , un seul de ces réactifs sera utilisé mais il sera couplé au mélange de  $B_1$ ,  $B_2$  et  $B_3$ . Chacun des trois mélanges ainsi engendré contiendra donc trois produits ayant en commun  $A_1$ ,  $A_2$  ou  $A_3$ . L'évaluation de leur activité biologique permet de déterminer dans lequel de ces mélanges se trouve le produit actif  $A_1-(B_1-B_2-B_3)$  ici.

Dans un deuxième temps,  $A_1$ , identifié à l'étape précédente, sera couplé séparément à  $B_1$ ,  $B_2$  ou  $B_3$  permettant, par évaluation biologique, de déterminer la nature du produit actif.

Par un processus itératif de ce type, il a été possible d'élucider la structure d'un composé actif au sein de mélanges issus d'un nombre même important d'étapes combinatoires et de réactifs en mélange [3].

**Le "positional scanning"**

Également proposé par Houghten [4] [5], son principe repose sur une répartition de la bibliothèque, dès sa synthèse en séries de sous-bibliothèques. Pour chaque position, on prépare autant de sous-bibliothèques qu'il y a de composants en cette position. Dans chacune de ces sous-bibliothèques, un des composants, différent à chaque fois, est incorporé seul, alors que les autres positions sont occupées par des mélanges. La bibliothèque est donc divisée en  $n \times m$  sous-bibliothèques,  $n$  représentant le nombre d'étapes combinatoires et  $m$  le nombre de composants utilisés dans les mélanges. L'ensemble des

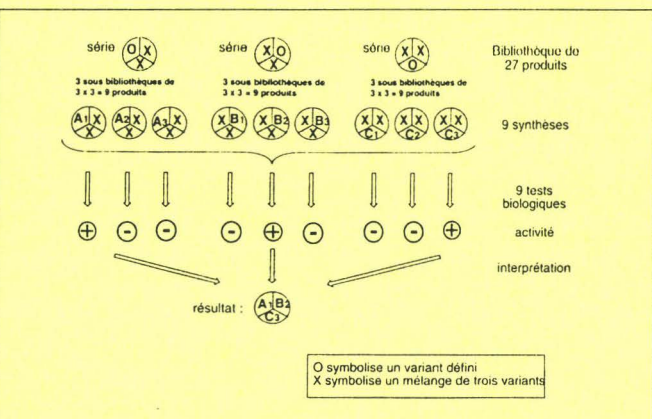


Figure 5 - Principe du "Positional scanning" appliqué à une bibliothèque de 27 composés.

sous-bibliothèques est évalué dans le test de criblage, de manière à identifier, position par position, la nature du composant unique conférant l'activité maximale (la figure 5 exemplifie ce principe dans le cas où  $n = m = 3$ ).

Si cette méthode présente l'avantage par rapport à la précédente de ne pas nécessiter d'étape supplémentaire de synthèse (hormis celle du produit ainsi défini), elle présente le risque non négligeable de ne pas conduire au composé le plus actif. Cette stratégie a permis l'identification de plusieurs peptides, ligands nanomolaires des récepteurs des opiacées [4].

**La partition orthogonale**

Comme la précédente, elle repose sur la répartition de la bibliothèque, dès sa synthèse, en séries de sous-bibliothèques préalablement définies. Deux séries de sous-bibliothèques sont préparées, correspondant chacune à deux répartitions différentes de l'ensemble des composés de la même bibliothèque. Une propriété importante de ces sous-bibliothèques est que le nombre de composés par sous-bibliothèque est égal au nombre de sous-bibliothèques dans chaque série. La synthèse sera organisée de telle sorte que les composés présents en mélange dans une même sous-bibliothèque de la première série se voient répartis à raison d'un composé et un seul dans chacune des sous-bibliothèques de la seconde série. Ainsi, entre une sous-bibliothèque de la première série et une sous-bibliothèque de la seconde, il n'y a qu'un seul composé en commun, permettant l'identification directe d'un produit actif (figure 6). Cette stratégie a été appliquée à la préparation d'une bibliothèque de 15 625 tripeptides non naturels pouvant être évaluée à partir de deux séries de 125 sous-bibliothèques (chaque sous-bibliothèque comportant 125 composés). Testée dans un modèle d'inhibition de la liaison de la vasopressine au récepteur V2, elle a permis l'identification d'un inhibiteur nanomolaire de structure originale [6].

**Produits liés à un support insoluble**

Comme nous l'avons signalé précédemment, il est possible de tester les molécules encore liées de manière covalente au support solide qui a été utilisé lors de la synthèse.

**Le principe du "one bead-one compound"**

Il s'agit d'une conséquence inattendue du principe de synthèse sur support solide. L'utilisation classique de gros

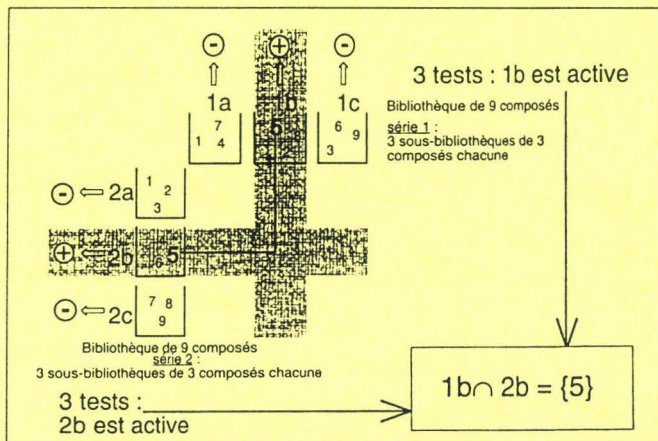


Figure 6 - Partition orthogonale d'une bibliothèque de 9 composés.

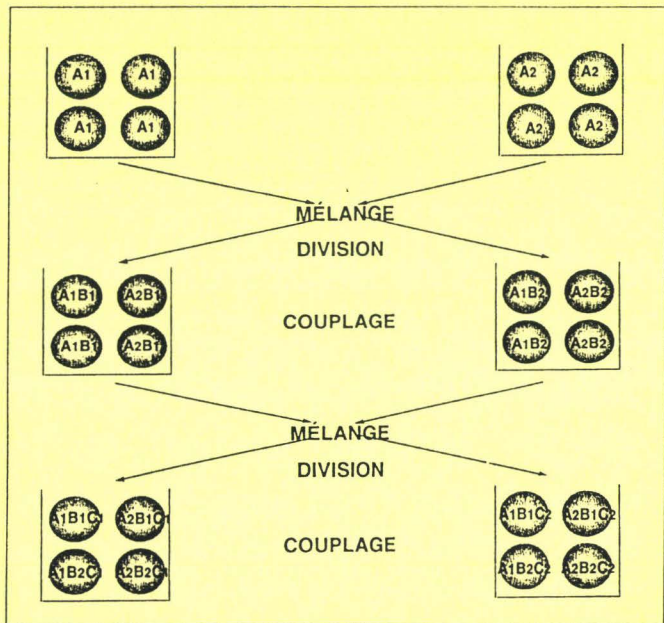


Figure 7 - Méthode "Split" ou "division-couplage-mélange".

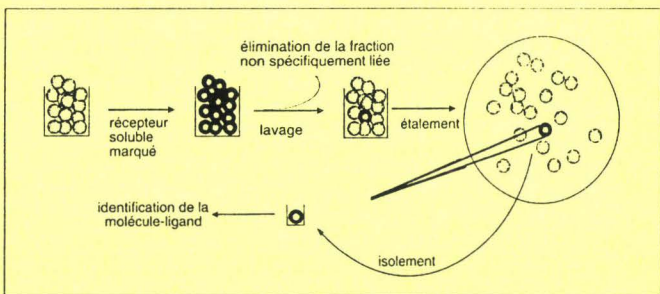


Figure 8 - Criblage de composés liés à un support insoluble.

excès de réactifs permettant d'améliorer les cinétiques et les rendements se heurte, en synthèse combinatoire, au risque de voir les composés les plus réactifs du mélange être surreprésentés par rapport aux composés les moins réactifs. La solution à ce problème, désignée sous le terme de "Split Synthesis", est simple (figure 7). Préalablement à chaque étape combinatoire, le polymère est divisé en autant de lots que de réactifs introduits au cours de cette étape. Chacun des réactifs est alors mis en réaction individuellement, dans un réacteur séparé, permettant d'en employer de gros excès. En fin de réaction, les contenus de chacun des réacteurs sont remélangés avant l'étape suivante. Si cette stratégie n'a pas d'effet majeur sur la composition macroscopique du mélange final, elle a un profond retentissement au niveau microscopique. En effet, les polymères utilisés pour la synthèse sur support solide sont constitués de petites billes de polystyrène dont le diamètre va de 50 à 100 microns et sur lesquelles les composés sont fixés de manière covalente. Lors de l'étape de division de la résine, chaque bille de résine sera dirigée vers l'un des réacteurs pour y recevoir un seul des réactifs du mélange. Ce phénomène se répétera à chaque division de la résine. En fin de synthèse, chaque bille aura donc suivi un chemin réactionnel unique et portera donc une seule espèce moléculaire [7]. A la différence d'une synthèse incorporant à chaque étape des mélanges de réactifs et fournissant des billes portant chacune à leur surface le mélange des différents composés possibles, les billes issues

d'une synthèse avec division de résine ne porteront à leur surface qu'une espèce moléculaire unique. Cette observation a permis le développement de nombreuses méthodes d'identification très ingénieuses. En effet, la quantité de composé présente sur une bille standard, de l'ordre de quelques nanomoles, est suffisante pour en permettre aussi bien l'évaluation biologique que l'identification structurale. Les premiers travaux dans ce domaine concernaient des molécules de nature purement peptidique. Ainsi, pour identifier le peptide, reconnu par un anticorps monoclonal, les billes sont étalées sous forme d'une monocouche et mises en présence de l'anticorps marqué. Les billes portant à leur surface un peptide reconnu par l'anticorps sont ainsi facilement repérées et isolées (figure 8). La séquence du peptide peut alors être déterminée par dégradation récurrente d'Edman, directement à partir d'une bille de polymère, au moyen d'un microséquenceur commercial.

Cette méthode, très élégante, a connu de nombreuses améliorations en l'espace de quelques années.

En effet, certains tests biologiques ne pouvant se faire sur des molécules liées à des supports, des stratégies faisant appel à des ancrages au polymère de stabilité différente, permettant de libérer une partie des composés présents à la surface des billes pour les tester, ont été mises au point, tout en laissant une autre partie fixée, de manière à permettre d'identification structurale.

### L'étiquetage moléculaire

On a aussi reproché à cette méthode "one bead - one compound" de ne s'appliquer qu'à des molécules de nature peptidique, seules susceptibles d'être identifiées par dégradation d'Edman, ce qui est un inconvénient majeur en termes de diversité structurale. C'est pour élargir son champ d'application que se sont développées les méthodes d'étiquetage moléculaire des billes de résine ou "tagging" [8]. Le principe consiste à dissocier les fonctions de liaison aux cibles biologiques, pour lesquelles on cherchera à atteindre la plus grande diversité moléculaire, de la fonction d'identification structurale pour laquelle, au contraire, on souhaitera un système simple, robuste et aussi universel que possible. Pour cela, à chaque division du support de synthèse (voir méthode "split", figure 7), on assemblera sur les billes non pas un mais deux composés : une molécule "ligand" dont on évaluera la fonction biologique et une molécule "codante", qui permettra d'en déterminer indirectement la structure (figure 9). Les premiers

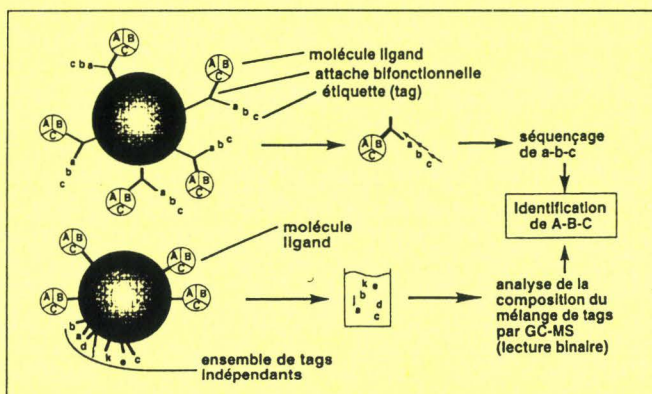


Figure 9 - Deux stratégies d'étiquetage moléculaire.

systèmes d'étiquetage moléculaire faisaient appel au séquençage peptidique : à chaque maillon correspond un amino-acide identifiable lors de la dégradation d'Edman. Quand une bille a été identifiée par sa capacité à lier une cible biologique, le séquençage du peptide qu'elle porte à la surface permet de déduire la structure du composé "ligand" qui lui est associé. La nouvelle génération d'étiquetage moléculaire repose sur le codage non séquentiel : l'historique complet de la synthèse du composé liant est enregistré sur chaque bille sous forme d'un codage chimique binaire. Selon ce principe, qui n'est pas sans rappeler celui du code-barre, N marqueurs chimiques différents permettent de coder de manière non séquentielle 2N événements (nature des composants, ordre d'incorporation). Quand une bille "ligand" a été sélectionnée, l'ensemble des marqueurs qu'elle porte est clivé simultanément (généralement par photolyse) et analysé en une seule étape de chromatographie en phase gazeuse. La sensibilité de cette méthode permet de limiter à moins de 1 % la part de la charge de la bille affectée à l'étiquetage.

## La chimie combinatoire : un défi pour les organiciens

Comme on l'a vu, le principe de la synthèse sur support solide est particulièrement bien adapté aux exigences de la synthèse combinatoire. Il n'est donc pas surprenant, compte tenu de l'expérience considérable qui existait dans ce domaine, que les premiers composés synthétisés aient été de nature peptidique. Il est néanmoins très vite apparu que ces structures peptidiques ne représentaient pas des têtes de séries idéales (problèmes de biodisponibilité en particulier) et ne permettaient d'explorer qu'une partie très restreinte de la diversité moléculaire. L'accès a donc été mis sur des structures différentes du squelette peptidique permettant de développer des stratégies combinatoires et sur l'augmentation de l'éventail des réactions chimiques susceptibles d'être utilisées en phase solide. Nous développerons ici quelques exemples des évolutions récentes concernant la nature des polymères utilisés, les stratégies d'accès à la diversité et donnerons quelques exemples de réactions chimiques adaptées.

### Les supports de phase solide

Par ses propriétés physico-chimiques ("gonflement" dans les solvants, stabilité vis-à-vis des réactifs) et par la nature de l'ancrage covalent qui le lie aux molécules en cours d'assemblage, le polymère joue un rôle capital dans la définition de la stratégie chimique.

#### Nature des polymères

Ils devront associer une bonne stabilité mécanique et chimique, une insolubilité totale dans une large gamme de solvants organiques tout en y ayant une forte capacité de "gonflement", nécessaire pour assurer une bonne diffusion des réactifs. Leur nature chimique devra également se prêter facilement à la fonctionnalisation et à l'ancrage des synthons. Utilisés initialement par Merrifield, les copolymères de styrène et de divinylbenzène, qui se présentent sous forme de billes de 50 à 100 microns de diamètre, restent l'un des polymères les plus

couramment utilisés. Très résistants chimiquement, ils se fonctionnalisent facilement et avec d'excellents rendements. Leur principal défaut est de ne "gonfler" correctement que dans les solvants les moins polaires et de manière insuffisante dans les solvants les plus polaires (eau, alcools et éthers). Pour remédier à ce problème, des résines de seconde génération, dont le cœur est constitué de polystyrène réticulé greffé par des chaînes de polyéthylène glycol, ont été utilisées. Ces nouvelles résines "gonflent" indifféremment dans tous les solvants, protiques ou aprotiques, et permettent d'élargir considérablement la gamme des réactions possibles. En plus de ces résines, des supports divers tels que du coton, des feuilles de papier, des lamelles de verre ou des baguettes de polypropylène greffé par des polyamides sont utilisés. Tous ces supports, compatibles avec des solutions aqueuses, présentent l'avantage de pouvoir être, en plus du support de synthèse, compatibles avec des essais biologiques (le plus souvent des essais de liaison directe entre les molécules-ligand fixées et le récepteur marqué en solution).

#### Fonctionnalisation des polymères

C'est de cette fonctionnalisation que dépendra la nature de la liaison entre le polymère et les molécules qui seront assemblées. Trop fragile, elle limitera l'éventail des réactions utilisables. Trop stable, elle exigera en fin de synthèse d'employer des conditions de clivage qui risqueront d'endommager les composés synthétisés (sauf dans le cas où ceux-ci sont criblés encore fixés sur le polymère).

#### Fixation par une liaison ester

L'introduction de groupements chlorométhyle donne facilement accès à des esters de type benzylique d'excellente résistance chimique, permettant de faire appel à une grande variété de protections orthogonales, mais nécessitant des conditions assez drastiques pour libérer les peptides (acide fluorhydrique anhydre). Pour éviter ce traitement, qui peut endommager des structures fragiles, des liaisons au moyen d'esters plus sensibles aux acides ont été proposées tels sont les acides qui interviennent avec la résine de Wang, clivable par action de l'acide trifluoroacétique.

#### Fixation par une liaison amide

Dans sa forme la plus simple, cette liaison amide, dérivée de la résine aminométhylée, est une liaison particulièrement stable qui sera généralement choisie pour fixer de manière permanente les molécules pour les tester encore liées au polymère. Par contre, si l'on souhaite pouvoir cliver le lien au polymère, on fera appel à des liaisons amides dont la stabilité a été diminuée, comme les benzhydrylamides plus ou moins modifiées.

D'autres types de fonctions peuvent être envisagées pour permettre la fixation au support polymérique (carbamate...).

### Stratégies d'accès à la diversité

#### Oligomérisation

Cette stratégie met en jeu des composés bifonctionnels. La première génération d'oligomères synthétisés était constituée de peptides et de biopolymères linéaires. Une bibliothèque composée d'hexapeptides, utilisant 19  $\alpha$ -aminoacides (la cystéine n'est pas incorporée en raison des problèmes d'oxyda-

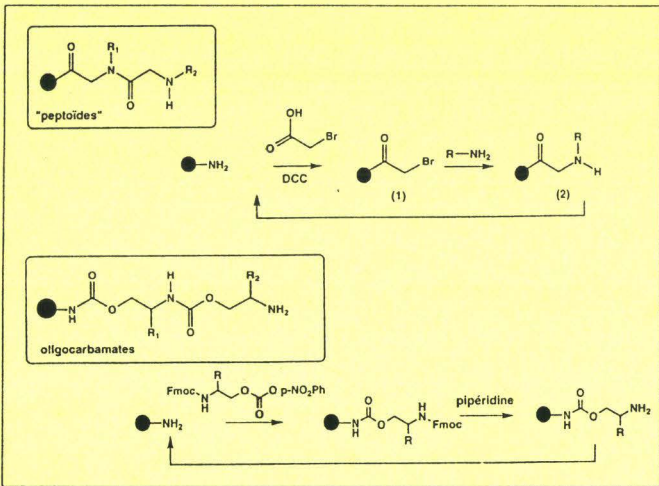


Figure 10 - Peptoïdes et oligocarbamates : structure et synthèse.

tion en disulfure), a été synthétisée, permettant l'identification de ligands nanomolaires des récepteurs aux opiacées [4]. Cependant, la mauvaise biodisponibilité orale et les courtes demi-vies plasmatiques des peptides ont rapidement orienté les recherches vers d'autres types de liaisons. C'est ainsi qu'une deuxième génération d'oligomères, chimiques cette fois, a été créée, parmi lesquels on peut citer les polyglycines N-substituées (peptoïdes), les carbamates, les pyrrolinones...

La synthèse des peptoïdes [9] (figure 10) met en jeu les réactions suivantes : couplage de l'acide bromoacétique au moyen d'une carbodiimide conduisant à l'amide bromé (1) puis substitution nucléophile du brome par une série d'amines primaires RNH<sub>2</sub> conduisant à une amine secondaire (2) liée au support, sur laquelle une nouvelle molécule d'acide bromoacétique pourra être fixée. Outre l'accès à un squelette résistant aux enzymes, cette stratégie a l'avantage de puiser sa diversité au sein d'une des familles chimiques les plus vastes, celle des amines primaires. Cette stratégie a permis de découvrir des ligands nanomolaires de différents récepteurs de grand intérêt pharmacologique [10].

Dans le cas des oligocarbamates [11], la liaison peptidique est remplacée par une liaison carbamate moins sensible à la protéolyse. Pour cela, les amino-acides N-protégés sont d'abord transformés en β-aminoalcools. Ceux-ci, traités par le chlorocarbonate de paranitrophénol conduisent à des esters activés qui sont facilement couplés à une fonction amine. Après déprotection de la fonction amine, un nouveau cycle peut être réalisé. De nombreux autres exemples d'oligomérisation non peptidique ont été décrits (figure 11).

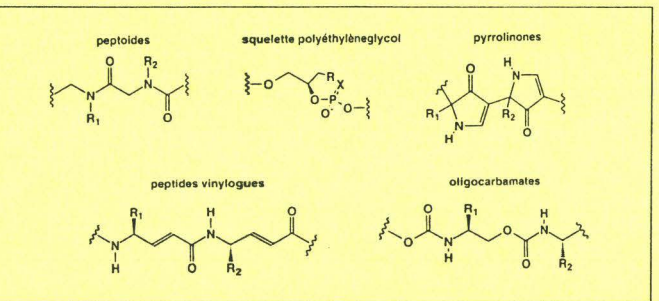


Figure 11 - Oligomères chimiques.

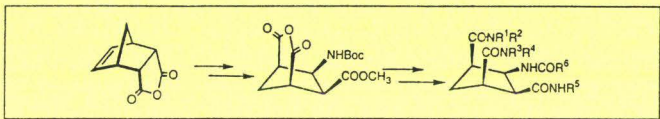


Figure 12 - Décoration d'un squelette.

Les squelettes "décorés"

Si les oligomères présentent l'avantage d'être facilement synthétisables et de permettre un accès rapide à un grand nombre de composés par simple répétition des cycles de synthèse combinatoire (le nombre de composés dans un mélange augmente à puissance du nombre d'étapes combinatoires), leurs défauts majeurs sont leur trop grande flexibilité ainsi qu'un manque de véritable diversité structurale. Pour y remédier, se sont développées des stratégies basées sur des squelettes polyfonctionnels rigides ("templates") susceptibles d'imposer des contraintes strictes en termes d'orientation spatiale des synthons. Chacune des fonctions du "template" est alors modifiée par une série de synthons diversifiés. Un excellent exemple de ce type d'approche consiste à "décorer" de manière individuelle chacune des fonctions générées à partir d'un anhydride à structure norbornène (figure 12) [12].

L'assemblage d'hétérocycles

Le domaine le plus exploré actuellement en chimie combinatoire sur support solide est celui des hétérocycles. Parmi les raisons historiques à cet engouement, on citera le fait que plus de 50 % des médicaments actuellement commercialisés comportent au moins un hétérocycle. La première synthèse d'hétérocycles sur support solide, celle d'une benzodiazépine, a été réalisée il y a plus de 20 ans, bien avant l'émergence de la chimie combinatoire. Cette synthèse est, de manière paradoxale, restée relativement méconnue. Reprise récemment [13], elle permet, au cours de l'assemblage de faire appel à une large diversité de synthons appartenant à des séries chimiques bien représentées : α-aminoacides pour R<sub>3</sub>, dérivés halogénés pour R<sub>4</sub> (figure 13). Un autre exemple est la synthèse d'hydantoïnes [13], illustrée sur la figure 14. Exploitant la diversité des α-aminoacides (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>) à celle des isocyanates (R<sub>3</sub>), elle associe, lors de la dernière étape, le clivage de la liaison avec le polymère et la cyclisation intramoléculaire, conduisant directement aux composés solubles. D'autres hétérocycles ont été synthétisés parmi lesquels on peut citer les pipérazines diones, les benzopyranes, oxazolones, acylpipéridines...

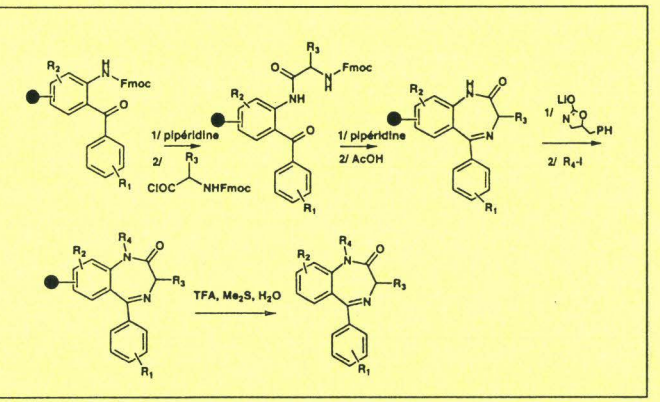


Figure 13 - Synthèse d'une bibliothèque de benzodiazépines.

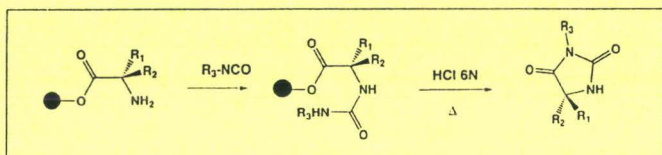


Figure 14 - Synthèse d'une bibliothèque d'hydantoïnes.

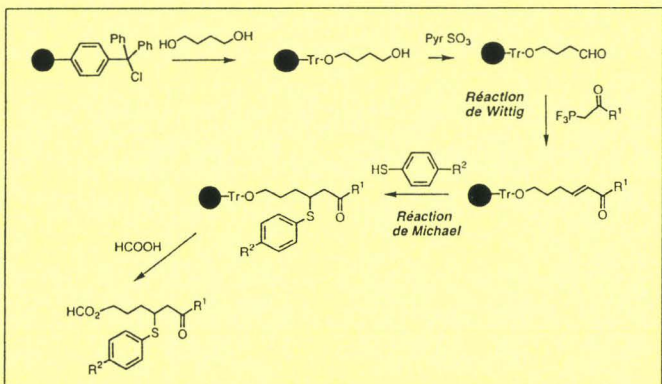
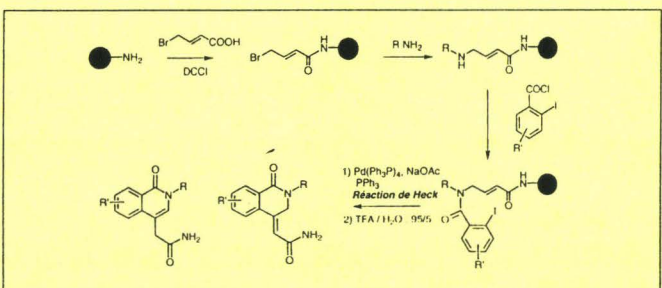
Figure 15 - Synthèse d'une bibliothèque de  $\beta$ -mercaptocétones.

Figure 16 - Synthèse d'une bibliothèque d'isoquinolinones.

### Évaluation de la diversité

En employant l'éventail des méthodes indiquées précédemment et en faisant appel aux composés disponibles à partir de sources commerciales (plus de 60 000 molécules différentes sont actuellement accessibles dans ACD), le chimiste aura la capacité, inconnue jusqu'alors, de créer un nombre impressionnant de molécules. Il lui faudra très rapidement s'interroger sur l'intérêt réel de ces molécules. Pour cela, il convient d'être très vigilant sur la véritable diversité chimique des composés ainsi générés : six cycles combinatoires mettant en jeu les 20 acides  $\alpha$ -aminés naturels conduisent au nombre impressionnant de  $20^6$  (64 millions) composés différents qu'il convient de tempérer par leur très faible diversité structurale. C'est pourquoi, des efforts considérables ont été entrepris ces dernières années pour élaborer des outils informatisés, basés sur les techniques de modélisation moléculaire pour quantifier et optimiser la diversité structurale apportée par une stratégie combinatoire nouvelle.

### La chimie organique supportée

La nécessité d'augmenter sans cesse la diversité structurale des molécules accessibles à la synthèse combinatoire sur support solide a été un moteur très puissant pour l'adaptation de nombreuses grandes réactions organiques aux exigences de la synthèse en phase solide. Parmi les exemples les plus connus, on citera des réactions telles que Suzuki, Mitsunobu,

Wittig... Une petite bibliothèque de  $\beta$ -mercaptocétones [14] a été synthétisée en utilisant la réaction de Wittig-Horner d'ylures stabilisés sur un aldéhyde, fixé sur support solide (figure 15). L'addition de Michael de thiophénols sur les cétones  $\alpha,\beta$ -insaturées, suivie d'une étape de clivage acide permet de libérer les produits du support pour les tester sous forme soluble.

Récemment, l'équipe de Zuckerman a décrit une synthèse d'isoquinolinones [15] utilisant la réaction de Heck (figure 16). Ces travaux n'en sont encore qu'à leur début et il est probable qu'avec le développement conjoint des nouveaux supports et de nouvelles fonctionnalisations, l'éventail des réactions réalisables en phase solide va augmenter exponentiellement dans les prochaines années.

### Conclusion

Les méthodes de synthèse combinatoire ont fait l'objet d'efforts intenses ces dernières années. Elles offrent la possibilité d'engendrer, à relativement bas prix, de très grandes collections de composés organiques, et ce, dans de nombreuses séries chimiques. Ces bibliothèques, présentées dans des formats adaptés aux techniques de criblage rapide, sont maintenant considérées comme des éléments incontournables dans le processus de découverte de nouvelles têtes de séries, étape clé dans la recherche de nouveaux médicaments. Le foisonnement de structures, issues de l'activité combinatoire, nécessite d'ores et déjà la mise en place de nouveaux outils de traitement de l'information. On craint en effet un engorgement des procédures classiques chargées de gérer la multitude de composés synthétisés et d'enregistrer les données biologiques qui leur sont associées. En outre, des programmes nouveaux d'évaluation de la diversité structurale sont actuellement développés. Ces programmes, en tenant compte de paramètres importants en pharmacochimie (poids moléculaire, hydrophobie, aromaticité, liaisons hydrogène, charges...), sont capables de comparer des structures chimiques entre elles, mais aussi d'évaluer la pertinence de l'acquisition, ou de la synthèse, de telle ou telle bibliothèque. Certains de ces programmes, capables d'intégrer des notions de prédiction de toxicité ou d'instabilité métabolique, sont des aides précieuses pour le choix des meilleures matières premières d'une bibliothèque.

Si les techniques combinatoires tiennent leurs promesses, de très nombreuses têtes de séries pharmaceutiques devraient voir le jour ; le problème du choix des molécules à développer deviendrait alors crucial. Seules des molécules minimisant le risque d'échec dans les étapes cliniques seront conservées. Par contre, l'amélioration de ces têtes de séries fera toujours appel aux méthodes classiques de la chimie thérapeutique qui s'en trouveront confortées. Simultanément et grâce à l'implication croissante des biologistes moléculaires dans le domaine de la pharmacologie, un nombre sans cesse croissant et pertinent de cibles sera amené au stade du criblage systématique, conduisant à des avancées majeures dans des domaines jusqu'à présent peu explorés.

### Références

- [1] Gordon E.M., Barrett R.W., Dower W.J., Fodor S.P.A.,

- Gallop M.A., *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, p. 1385-1401.
- [2] Gallop M.A., Barrett R.W., Dower W.J., Fodor S.P.A., Gordon E.M., *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, p. 1233-1251.
- [3] Houghten R.A., Pinilla C., Blondelle S.E., Appel J.R., Dooley C.T., Cuervo J.H., *Nature*, **1991**, *354*, p. 84-86.
- [4] Pinilla C., Appel J.R., Blanc P., Houghten R.A., *Biotechniques*, **1992**, *13*, p. 901-905.
- [5] Dooley C.T., Houghten R.A., *Life Sci.*, **1993**, *52*, p. 1509-1517.
- [6] Déprez B., Williard X., Bourel L., Coste H., Hyafil F., Tartar A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, p. 5405-5406.
- [7] Lam K.S., Salmon S.E., Hersh E.M., Hruby V.J., Kazmierski W.M., Knapp R.J., *Nature*, **1991**, *354*, p. 82-84.
- [8] Janda K.D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, p. 10779-10785.
- [9] Zuckermann R.N., Kerr J.M., Kent S.B.H., Moos W.H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, p. 10646-10647.
- [10] Zuckerman R.N., Martin E.J., Spellmeyer D.C., Stauber G.B., Shoemaker K.R., Kerr J.M., Figliozzi G.M., Goff D.A., Siani M.A., Simon R.J., Banville S.C., Brown E.G., Wang L., Richter L.S., Moos W.H., *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, p. 2678-2685.
- [11] Cho C.Y., Moran E.J., Cherry S.R., Stephans J.C., Fodor S.P.A., Adams C.L., Sundaram A., Jacobs J.W., Schutz P.G., *Science*, **1993**, *261*, p. 1303-1305.
- [12] Patek M., Drake B., Lebl M., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, p. 9169-9172.
- [13] Hobbs de Witt S., Kiely J.S., Stankovic C.J., Schroeder M.C., Reynolds Cody D.M., Pavia M.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, p. 6909-6913.
- [14] Chen C., Ahlbergrandall L.A., Miller R.B., Jones A.D., Kurth M.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, p. 2661-2662.
- [15] Goff D.A., Kuckerman R.N., *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, p. 5748-5749.



CENTRE NATIONAL  
DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

## CNRS Formation

au service de l'Entreprise

du 20 au 24 mai 1996 à MONT ST AIGNAN (76)

**Microscopie et microanalyse des matériaux**

du 20 au 24 mai 1996 à BONDY (93)

**Spectrométrie d'absorption atomique perfectionnement**

du 20 au 24 mai 1996 à ORSAY (91)

**Spectrométrie de masse en chimie et biologie**

du 20 au 24 mai 1996 ORSAY (91)

**Formation de la personne compétente à la radioprotection  
(option IIB sources non-scellées)**

Catalogue, programmes et inscriptions :

**CNRS Formation**

1 place Aristide Briand- 92195 MEUDON Cedex - FRANCE

Téléphone : (33-1) 45 07 56 72 - Télécopie : (33-1) 45 07 59 00

## CHAPITRE III

### ETUDE DE RELATIONS STRUCTURE/ACTIVITE

#### POUR H-DTic-DTyr-DPnp-OH

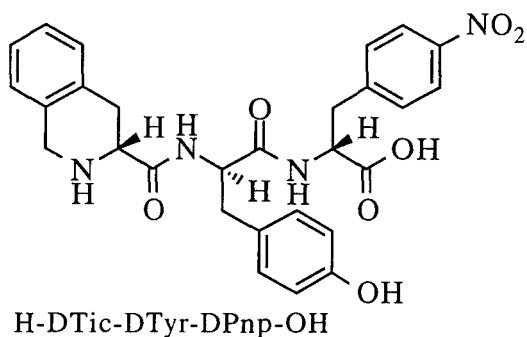
Nous avons réalisé une étude de relations structure/activité sur le tripeptide obtenu au chapitre précédent. A l'issue du criblage d'une bibliothèque combinatoire, deux possibilités s'offrent au pharmacochimiste : soit il sélectionne de nouveaux synthons proches des synthons composant le produit actif et resynthétise une bibliothèque combinatoire dite « focalisée », soit il abandonne la stratégie combinatoire et entreprend un travail classique de synthèse. Dans le cas où l'activité mise en évidence au cours d'un criblage primaire est faible, il est judicieux de réaliser une seconde bibliothèque combinatoire focalisée, pour explorer très rapidement, mais grossièrement, l'espace des structures chimiques proches de la structure active. Par contre, dans un cas comme le nôtre où une activité nanomolaire est directement détectée lors du criblage, il semble préférable d'entreprendre directement une étude classique de relations *quantitatives* entre les structures et les activités. Pour réaliser cette étude quantitative, il faut non seulement que les produits testés soient purs et caractérisés (ce qui peut se faire de manière automatique et combinatoire) mais aussi que l'on puisse en évaluer la quantité mise en jeu dans chaque test. Dans ce cas, seule la pesée des produits permet de les quantifier, puisqu'ayant affaire à des produits nouveaux, nous ne disposons d'aucune caractéristique physicochimique commune ( $\lambda_{\text{max.}}$ ,  $\epsilon$ ...) permettant cette qualification.

30 composés ont été synthétisés et testés pour leur capacité à inhiber la liaison de la vasopressine au récepteur  $V_2^{48}$ . Nous avons cherché à exploiter au mieux les résultats de la bibliothèque : 15625 molécules ont, en effet, déjà été testées sur le récepteur. Les résultats positifs nous renseignent sur les directions à prendre et d'autre part, (ceci est tout aussi important) les résultats négatifs nous indiquent les directions à ne pas prendre.



Un résultat très général était qu'au sein de la bibliothèque, les tripeptides à chaînes latérales aromatiques donnaient les meilleurs résultats. Les cycles aromatiques ont donc été substitués par des cycles isostères.

**Schéma 44** : *H-DTic-DTyr-DPnp-OH* (2), antagoniste du récepteur  $V_2P$ , est la base de l'étude



De même les centres asymétriques ont été inversés un à un et les 7 isomères optiques ont été testés. Des analogues plus courts ont été synthétisés, ainsi que des analogues dans lesquels les charges amino et carboxyterminales ont été masquées.

## I/ EXPLORATION STRUCTURALE

Si l'absence d'activité notable des autres tripeptides de la bibliothèque est une indication précieuse en ce qui concerne les directions à ne pas prendre, nous avons choisi de répondre à trois questions pour lesquelles les réponses ne pouvaient pas être déduites des résultats du criblage primaire.

### I-1/ Quelle est l'importance des extrémités N et C terminales dans la molécule ?

La bibliothèque est constituée de tripeptides dont les extrémités N et C terminales sont libres.

L'acétylation de la position N terminale et la préparation du carboxamide en position C terminale permettront de répondre à cette question.

### I-2/ La chiralité joue-t-elle un rôle déterminant dans l'activité du produit ?

La bibliothèque est constituée uniquement d'aminoacides de chiralité « D ».

La synthèse des 8 diastéréoisomères de H-Tic-Tyr-Phe-OH permettra de confirmer cette idée.

### I-3/ Quel est le rôle joué par la chaîne latérale de chacune des 3 positions ?

Un aminoacide a été décliné à la fois, en laissant inchangé le reste de la molécule et en se basant sur les résultats des questions 1/ et 2/ posées ci-dessus.

Nous exposons la chimie employée et les activités biologiques des différents analogues préparés pour répondre à ces trois questions.

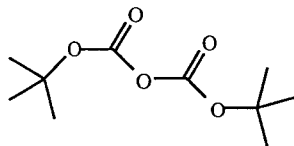
## II/ STRATEGIE DE SYNTHÈSE

Pour tous les analogues synthétisés, une chimie supportée sur polymère, d'après le principe élaboré par R.B. Merrifield<sup>49</sup> a été utilisée pour introduire successivement les 3 aminoacides. Nous sommes fidèles aux conditions utilisées dans les bibliothèques orthogonales pour les temps de couplages et de déprotection, le choix des agents activateurs ou des agents de déprotection...

### II-1/ La stratégie de protection

Selon la stratégie de protection tBoc/Benzyle que nous avons adoptée, les fonctions amines des aminoacides ont été temporairement protégées par un groupement protecteur temporaire de type tBoc, labile en présence d'acide trifluoroacétique. Le groupement tBoc a été introduit par action du pyrocarbonate de tertiobutyle (schéma 45) sur l'aminoacide en solution hydroalcoolique. Des groupements benzyliques ont été utilisés comme protections permanentes des fonctions réactives des chaînes latérales. Ces groupements sont clivables par l'action de l'acide fluorhydrique anhydre.

**Schéma 45** : le pyrocarbonate de tertiobutyle (*tBoc-O-tBoc*)



## II-2/ Utilisation de deux types de résines

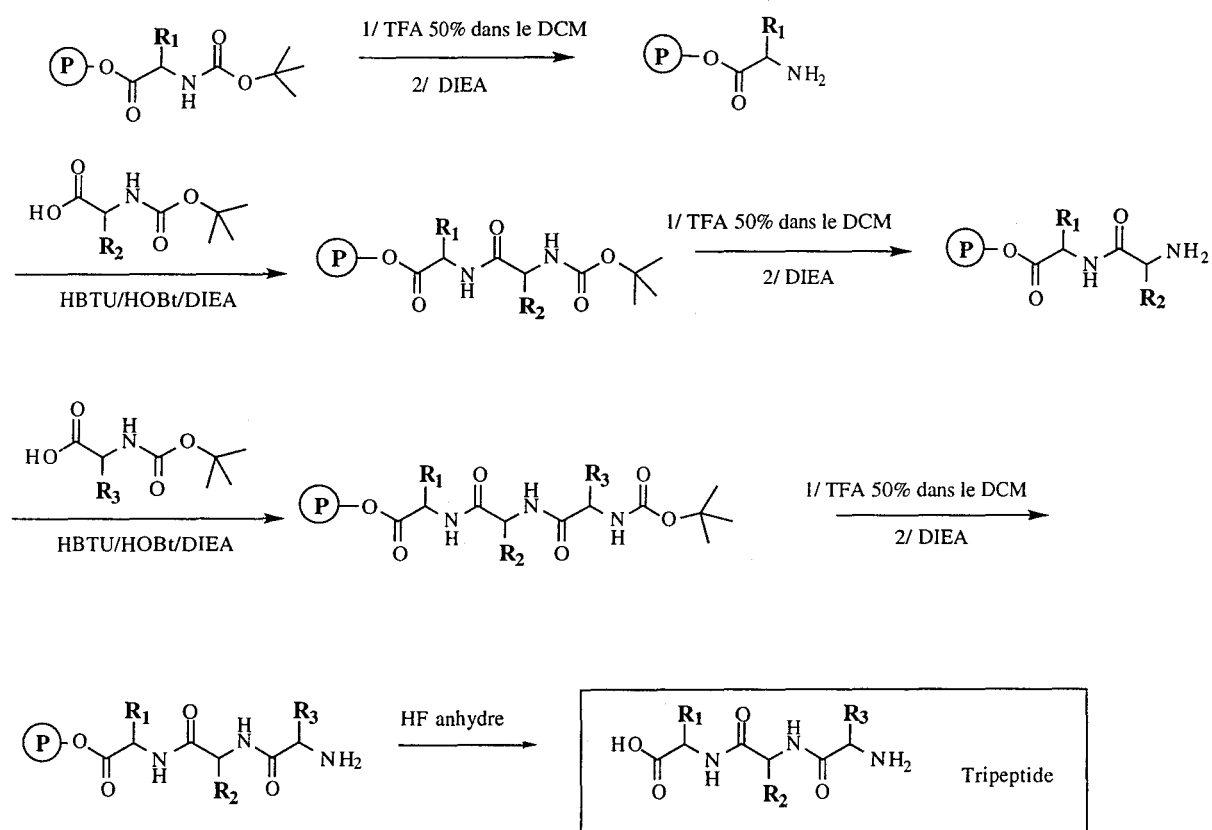
La résine chlorométhylée dite « de Merrifield » et la résine de type méthylbenzhydrylamine (ou MBHA) ont été utilisées. Dans le premier cas, le clivage de la liaison ester entre le peptide et la résine conduit à une fonction acide carboxylique COOH libre alors que dans le second cas, une fonction carboxamide CONH<sub>2</sub> est obtenue.

La résine de Merrifield est fonctionnalisée grâce à un sel de césium du tBoc aminoacide, la résine MBHA est acylée par un tBoc aminoacide activé par un mélange HBTU/HOBt (50/50).

## II-3/ Principe de la synthèse des tripeptides (schéma 46) :

Le principe de synthèse que nous avons adopté, dont le schéma général est donné ci-après, est celui de la synthèse peptidique en phase solide selon une stratégie de protection Boc/Benzyle :

Schéma 46 : Synthèse des tripeptides



Le premier tertibutyloxycarbonyl aminoacide (tBocAA<sub>1</sub> de chaîne latérale R<sub>1</sub>) est lié à la résine par sa fonction carboxylique, et le groupement α-aminé est déprotégé par action de l'acide

trifluoroacétique. Sur cette fonction amine, un second tBoc aminoacide AA<sub>2</sub> (de chaîne latérale R<sub>2</sub>) est couplé en excès. La liaison amide est obtenue par formation *in situ* d'un ester activé d'hydroxybenzotriazole par action de l'HBTU et de l'HOBt, en présence de DIEA, le couplage est évalué par le test de Kaiser et, s'il est négatif, la synthèse se poursuit par la déprotection du deuxième aminoacide à l'acide trifluoroacétique. Le couplage du 3e tBoc aminoacide AA<sub>3</sub> (de chaîne latérale R<sub>3</sub>) est effectué en présence d'HBTU, d'HOBt et de DIEA et évalué par le test de Kaiser.

Après une déprotection de la fonction amine terminale par le TFA, le clivage et la déprotection des chaînes latérales du tripeptide sont réalisés simultanément par l'acide fluorhydrique anhydride.

Tous les produits bruts issus de coupure par HF ont été purifiés par précipitation et lavages dans l'éther éthylique, puis par solubilisation dans l'acide trifluoroacétique et reprécipitation dans l'éther sous forme de trifluoroacétate. Après resolubilisation dans l'acide acétique et filtration, les tripeptides sont lyophilisés. Les rendements sont calculés après pesée des lyophilisats.

#### **II-4/ Méthodes de purification et d'analyse :**

Les analogues de cette étude ont été synthétisés en utilisant les mêmes protocoles que lors de la synthèse des bibliothèques orthogonales, avec un souci de rapidité et d'efficacité, pour disposer rapidement des résultats biologiques. Tous les produits ont été caractérisés par spectrométrie de masse et par HPLC. Seuls les produits les plus actifs ont été étudiés par RMN.

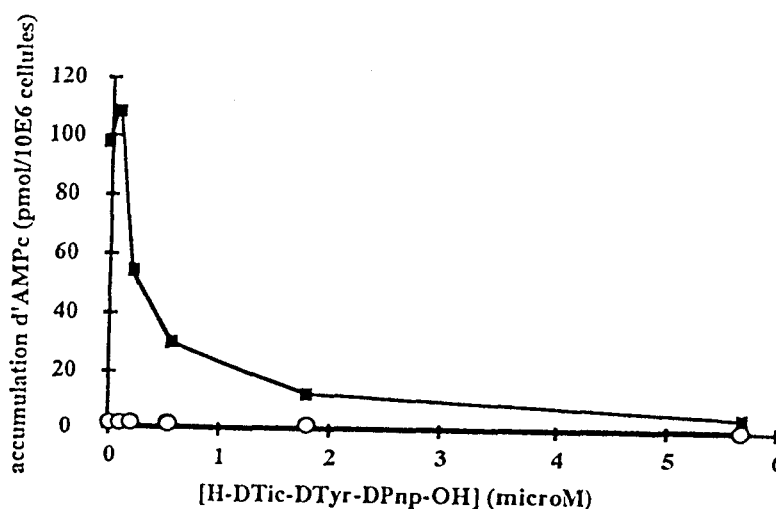
### **III/ RÉSULTATS BIOLOGIQUES :**

#### ***Principe du test biologique :***

Il s'agit d'un test fonctionnel. Dans les conditions physiologiques, la vasopressine se fixant sur le récepteur V<sub>2</sub>P déclenche un signal post-membranaire qui est la libération d'un second messager : l'AMPC. En l'absence d'inhibiteur, la quantité d'AMPC libérée est mesurée et la valeur de 100% lui est attribuée.

Chacun des analogues synthétisés est testé sur le récepteur  $V_2P$  en présence de vasopressine. En compétition avec un inhibiteur des récepteurs  $V_2P$ , la vasopressine se fixe moins facilement sur son récepteur. La quantité d'AMPC libérée est moindre comme le montre le schéma . Plus le produit testé est inhibiteur, plus la quantité d'AMPC libérée est faible.

**Schéma 47 :** Exemple type de test fonctionnel



Les résultats sont exprimés en «  $IC_{50}$  » qui est la concentration de produit testé qui inhibe 50% de la libération d'AMPC post-membranaire (en  $\mu\text{mol/l}$ ).

Nous rapportons ci-après la nature des différents composés synthétisés, la raison pour laquelle ils ont été choisis et leurs activités biologiques. Les résultats répondent successivement aux trois questions posées dans le chapitre I :

### III-1/ Etude du rôle des fonctions N et C terminales (tableau 3) :

L'intérêt de cette étude était double : d'une part, nous voulions connaître le rôle joué par les extrémités dans l'interaction du tripeptide avec le récepteur  $V_2$  et d'autre part, nous souhaitons savoir s'il était possible d'introduire des substituants supplémentaires en l'une ou l'autre de ces positions.

Les tripeptides suivants ont alors été préparés :

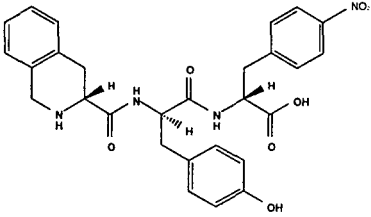
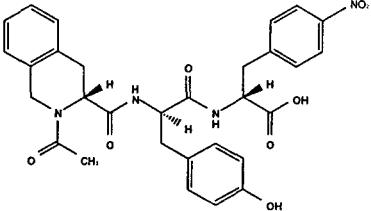
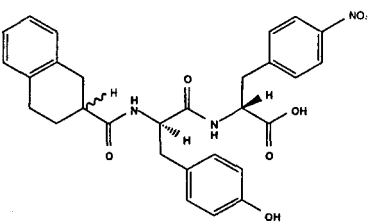
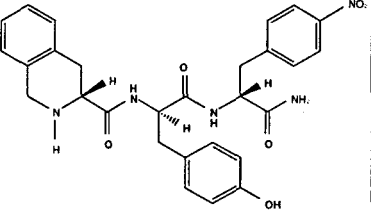
- **Acétyl-DTic-DTyr-DPnp-OH (3)** : l'extrémité N terminale est acétylée, donc non protonable.

- **Thn-DTyr-DPnp-OH (4)** : le Tic est ici remplacé par l'acide  $\beta$ -tétrahydronaphtalène carboxylique, c'est-à-dire qu'un  $\text{CH}_2$  remplace un  $\text{NH}$  selon les règles de l'isostérie.

- **H-DTic-DTyr-DPnp-NH<sub>2</sub> (5)** : l'extrémité C terminale est engagée dans une fonction carboxamide.

Les résultats biologiques sont les suivants :

**Tableau 3 : importance des extrémités N et C terminales libres**

Nom	Structure de la molécule	N°	IC <sub>50</sub> $\mu\text{M}$
<b>H-DTic-DTyr-DPnp-OH (référence)</b>		2	0,5
<b>Ac-DTic-DTyr-DPnp-OH</b>		3	>10
<b>Thn-DTyr-DPnp-OH</b>		4	>10
<b>H-DTic-DTyr-DPnp-NH<sub>2</sub></b>		5	>50

## Discussion :

Dans les 3 cas étudiés, la modification des fonctions terminales entraîne une perte d'activité importante. Le perte d'activité de **3** montre que la fonction amine secondaire du Tic ne peut être acylée ni être engagée dans une liaison amide avec un autre aminoacide. Le cas du tripeptide **4** montre également qu'elle ne peut être remplacée par son isostère CH<sub>2</sub>. L'analogue **5**, lui aussi n'est plus antagoniste, ce qui montre que l'extrémité carboxy-terminale doit elle aussi être libre pour que la molécule soit active.

Pour être antagoniste, le tripeptide a donc besoin d'extrémités N et C terminales libres, ce qui nous interdit toute tentative de modulation d'activité par allongement de la chaîne peptidique.

### III-2/ Etude du rôle de la chiralité

La D-phénylalanine a été employée en position C terminale à la place de la para nitrophénylalanine, pour laquelle nous ne possédions que l'isomère D au moment de l'étude. Nous savions cependant que le remplacement de la D-Pnp par la D-Phe maintenait en partie l'activité inhibitrice, même si celle-ci était diminuée : H-DTic-DTyr-DPhe-OH possède, en effet, une IC<sub>50</sub> de 1,3 µM contre 0,5 µM pour la référence de l'étude.

Évalués dans le test fonctionnel, les 8 diastéréoisomères de H-DTic-DTyr-DPhe-OH ont conduit aux résultats suivants :

**Tableau 4 : Résultats biologiques des 8 diastéréoisomères :**

Tripeptide	N°	IC <sub>50</sub> µM
H-DTic-DTyr-DPhe-OH	<b>6</b>	1,30
H-DTic-DTyr-LPhe-OH	<b>7</b>	>50
H-DTic-LTyr-DPhe-OH	<b>8</b>	>50
H-DTic-LTyr-LPhe-OH	<b>9</b>	>50
H-LTic-DTyr-DPhe-OH	<b>10</b>	<50
H-LTic-DTyr-LPhe-OH	<b>11</b>	>50
H-LTic-LTyr-DPhe-OH	<b>12</b>	>50
H-LTic-LTyr-LPhe-OH	<b>13</b>	Agoniste faible

## Discussion :

La chiralité "D" de l'ensemble des aminoacides du tripeptide est indispensable à l'activité de la molécule puisque l'isomérisation d'un ou de plusieurs centres asymétriques entraîne une élévation considérable de la valeur de l'IC<sub>50</sub>. De manière étonnante, nous avons constaté que l'énantiomère "L" est un agoniste faible. Nous pouvons supposer que ce tripeptide « mime » les trois premiers aminoacides de la vasopressine (<sup>1</sup>Cys-<sup>2</sup>Tyr-<sup>3</sup>Phe, schéma 42). En effet, le Tic pourrait interagir avec une poche hydrophobe du récepteur où « se loge » habituellement le pont disulfure de la vasopressine, tandis que les 2 aminoacides Tyr et Phe peuvent utiliser les mêmes sites de fixation que les aminoacides 2 et 3 de la vasopressine.

### III-3/ Etude du rôle joué par les chaînes latérales des 3 aminoacides :

L'intérêt de la bibliothèque, outre celui de permettre l'identification d'un produit actif, est de nous donner des renseignements sur 15625 analogues avant même de commencer l'étude de relations structure/activité. Toutes les combinaisons entre les aminoacides suivants ont déjà été testées :

- H-DLys-OH, H-(Nicotinoyl)-DLys-OH, H-DArg-OH, H-DHis-OH, (basiques)
- H-DAsp-OH, H-DGlu-OH, H-DIgu-OH, Ipe, (acides)
- H-DPhe-OH, H-DPnp-OH, H-DTyr-OH, H-DTrp-OH, H-DTic-OH, (aromatiques)
- H-Gly-OH, H-DAla-OH, H-DVal-OH, H-DIle-OH, H-DLeu-OH, H-DPro-OH, (aliphatiques)
- H-DGln-OH, H-DIgn-OH, H-DAsn-OH, (neutres)
- H-DMto-OH, H-DThr-OH, H-DSer-OH, (polaires)

Parmi les 15625 combinaisons de 3 aminoacides aucune n'est meilleure inhibitrice que H-DTic-DTyr-DPnp-OH. Ces renseignements sont très précieux, puisqu'ils nous évitent d'évaluer des analogues à chaînes latérales basiques, acides, aliphatiques, neutres ou polaires.

Notre choix a donc été orienté vers des analogues aromatiques de H-DTic-DTyr-DPnp-OH. Les aminoacides de cette étude remplissent aussi les conditions imposées par les réponses données



aux deux premières questions : la chiralité sera de type « D » et les extrémités seront libres et par conséquent ionisables.

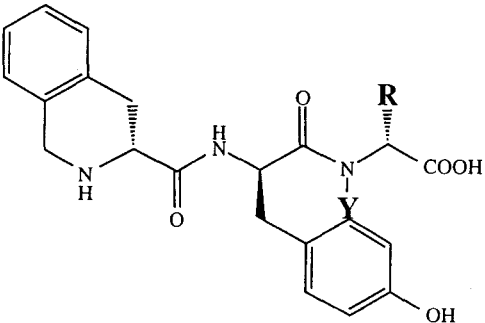
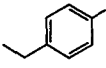
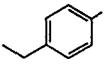
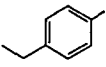
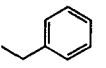
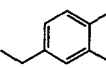
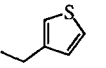
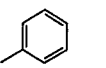
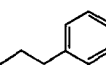
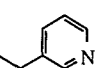
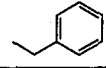
Les valeurs des IC<sub>50</sub> des analogues où successivement la position C terminale, intermédiaire, puis N terminale ont été déclinées sont indiquées dans les tableaux qui suivent.

### *III-3-1/ Modulation de la position C terminale*

L'examen des résultats du criblage primaire a orienté notre choix vers des chaînes latérales de nature aromatique. Nous savions que la présence d'un groupement NO<sub>2</sub> augmentait l'activité par rapport au noyau benzénique non substitué (H-DTic-DTyr-DPhe-OH était présent dans le criblage primaire mais moins actif que H-DTic-DTyr-DPnp-OH, ce que nous avons confirmé par la suite) ou substitué par un donneur mésomère (H-DTic-DTyr-DTyr-OH était présent également dans le criblage primaire). Nous nous sommes donc tournés vers des aminoacides comme la parafluorophénylalanine (**15**) ou la parachlorophénylalanine (**14**), porteurs de groupements électroattracteurs. Nous avons également cherché à connaître la distance optimale entre le noyau aromatique et la chaîne peptidique pour cela, nous avons substitué la phénylalanine par l'homophénylalanine (**19**) et la phénylglycine (**18**). Enfin, nous avons voulu vérifier si d'autres systèmes aromatiques, non évalués dans la bibliothèque primaire pouvaient influencer l'activité : la naphtylalanine à noyau aromatique encombré (**16**), la β-thienylalanine (**17**) à noyau aromatique enrichi en électrons, la 3-pyridylalanine (**20**) à noyau appauvri en électrons capable de générer des liaisons nouvelles au sein du récepteur ont toutes trois été incluses dans l'étude.

L'ensemble des résultats de cette modulation est contenu dans le tableau 5.

**Tableau 5 : Relations structure/activité pour l'acide aminé en position « C terminale »**

	Y = H, R =	Nom	N°	IC <sub>50</sub> μM
		H-DPcp-OH	14	0,1
		H-DPnp-OH (référence)	2	0,5
		H-DPfp-OH	15	1
		H-DPhe-OH	6	1,3
		H-DNaa-OH	16	<5
		H-DThi-OH	17	5
		H-DPhg-OH	18	>10
		H-DHph-OH	19	>10
		H-DPya-OH	20	>50
	H = CH <sub>3</sub> , R =	Nom	N°	IC <sub>50</sub> μM
	H-N(Me)DPhe-OH	21	>10	

### Discussion :

En position carboxyterminale, le meilleur résultat est obtenu avec la parachlorophénylalanine (14), un acide aminé substitué par un groupe électriquement attracteur et mésomère donneur. La parafluorophénylalanine montre un effet bénéfique plus limité. La longueur de la liaison entre le squelette peptidique et le noyau aromatique doit être obligatoirement d'un méthylène CH<sub>2</sub> le remplacement de la phénylalanine par la phénylglycine (18) ou l'homophénylalanine (19) conduit à des analogues inactifs. La présence d'une liaison amide secondaire nuit aussi à l'activité puisque le tripeptide 21, où la N-méthylphénylalanine a été employée n'est pas inhibiteur alors que le tripeptide 6 contenant la phénylalanine l'est. La présence d'un noyau aromatique plus volumineux fait aussi disparaître l'activité. Enfin, la présence d'une structure aromatique particulière : enrichie en électrons comme dans la β-thienylalanine (17) ou appauvrie

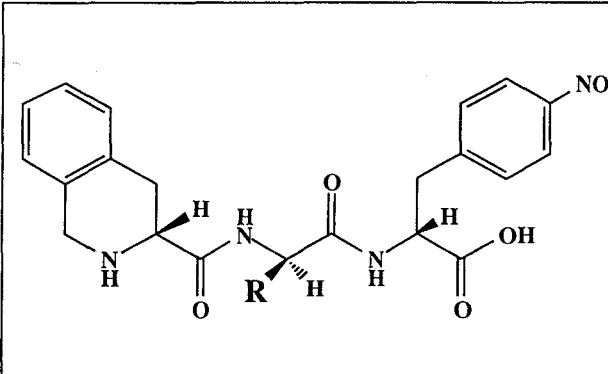
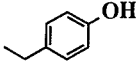
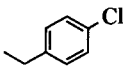
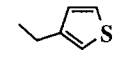
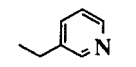
et ionisable comme dans la 3-pyridylalanine (20) se montre également très défavorable. Il faut donc respecter des contraintes spatiales d'encombrement et de distances bien précises et ne pas utiliser n'importe quel cycle isostère si on veut maintenir l'activité du tripeptide.

### III-3-2/ Modulation de la position intermédiaire :

L'acide aminé intermédiaire a lui aussi été modifié. Pour connaître l'influence d'un substituant électriquement attracteur et mésomère donneur sur le cycle aromatique, nous avons remplacé la tyrosine par la parachlorophénylalanine. Des cycles isostères, enrichis comme la  $\beta$ -thienylalanine ou appauvris comme la 3-pyridylalanine ont également été évalués.

Les résultats sont contenus dans le tableau 6.

**Tableau 6 :** Relations structure/activité pour l'acide aminé en position « intermédiaire »

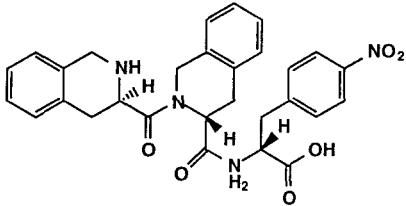
	R =	Nom	N°	IC 50 $\mu$ M
		H-DTyr-OH (référence)	2	0,5
		H-DPcp-OH	22	1
		H-DThi-OH	23	5
		H-DPya-OH	24	<50

### Discussion :

En position intermédiaire, la tyrosine semble être importante à l'activité mais sa substitution par la parachlorophénylalanine n'a qu'un effet modéré sur l'activité inhibitrice qu'elle diminue de moitié. En revanche, la substitution par la  $\beta$ -thienylalanine ou la 3-pyridylalanine fait perdre l'activité. En position intermédiaire, une exigence sur la nature des cycles isostères employés existe là aussi mais les substitutants en para du cycle semblent jouer un rôle moins déterminant.

Une dernière substitution en position intermédiaire a été l'emploi du DTic, introduisant une contrainte stérique au niveau du positionnement du noyau aromatique ainsi que de la liaison peptidique. Pour cela, le tripeptide H-DTic-DTic-DPnp-OH a été synthétisé. Même s'il était présent dans la bibliothèque, nous ne disposons pas de données chiffrées pour son activité. Le résultat biologique figure dans le tableau 7 ci-après.

**Tableau 7 :** *Substitution par un DTic en position intermédiaire*

Nom	Structure de la molécule	N°	IC <sub>50</sub> μM
H-DTic-DTic-DPnp-OH		25	>50

#### Discussion :

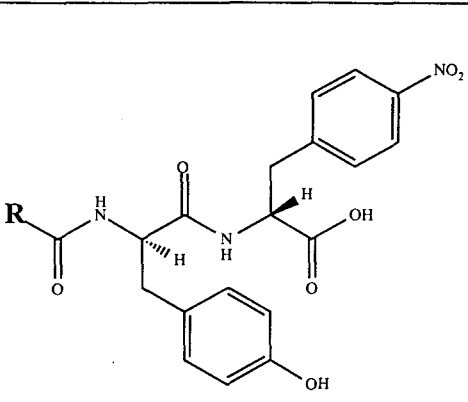
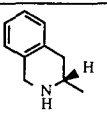
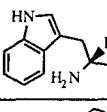
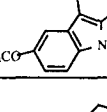
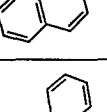
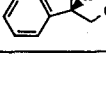
L'analogue étudié perd complètement son activité, probablement par l'effet du DTic sur la conformation adoptée par la molécule.

#### *III-3-3/ Modulation de la position N terminale*

Nous avons utilisé ici des aminoacides dont l'encombrement des chaînes latérales était comparable à celui du Tic comme la naphtylalanine. Le tryptophane, présent dans la bibliothèque, a cependant été incorporé à nouveau pour connaître quel niveau d'activité il confèrait car nous ne connaissions pas la valeur d'IC<sub>50</sub> de H-DTrp-DTyr-DPnp-OH individuellement. Un aminoacide non naturel dérivé du noyau tétrahydro-β-carboline, l'acide 6-méthoxy-1,2,3,4-tétrahydro-9H-pyridine(3,4,b)-indole-1 carboxylique (Mpi), a aussi été employé. Enfin, nous avons utilisé en position intermédiaire un aminoacide protégé par un groupement Fmoc qui résiste aux conditions de coupure et persiste donc dans le produit final. Cette fonction présente l'intérêt d'être encombrée et de ne pas avoir la même distance entre le

squelette peptidique et le noyau aromatique. Nous souhaitons connaître son influence sur l'activité. Les résultats sont contenus dans le tableau suivant.

**Tableau 8 : Relations structure/activité pour l'acide en position « N terminale »**

	R =	Nom	N°	IC <sub>50</sub> μM
		<b>H-DTic-OH</b> (référence)	2	0,5
		<b>H-DTrp-OH</b>	26	5
		<b>H-Mpi-OH</b>	27	non chiffrée produit inactif
		<b>H-DNaa-OH</b>	28	>10
		<b>Fmoc</b>	29	>10

### Discussion :

En position N terminale, il n'a pas été possible d'améliorer l'activité, le tripeptide de référence, portant l'acide tétrahydroisoquinoléique (Tic) demeure le produit le plus actif. Le tryptophane fait diminuer l'activité d'un facteur 10. Quant au produit provenant de la substitution par l'acide dérivé de la carboline, aucun pouvoir inhibiteur n'a pu être mis en évidence. Le Fmoc-DTyr-DPnp-OH n'est pas actif non plus, le cycle étant probablement trop volumineux et la distance entre le squelette peptidique et le noyau aromatique inappropriée.

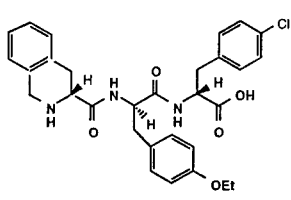
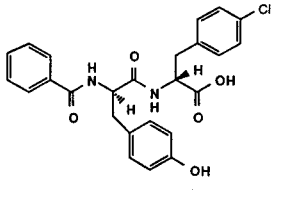
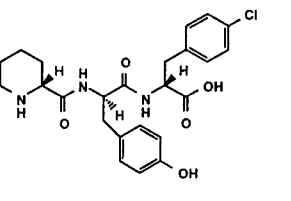
Comme la position C terminale, la position N terminale apparaît difficile à moduler, DTic étant un acide indispensable à l'activité.

### III-4/ Analogues de H-DTic-DTyr-DPcp-OH (tableau 9) :

Une nouvelle série d'analogues a été synthétisée prenant en compte l'effet bénéfique de la présence de la parachlorophénylalanine dans H-DTic-DTyr-DPcp-OH dont l'IC<sub>50</sub> est de 0,1 μM.

De nouvelles substitutions ont été évaluées au niveau des deux autres positions. Nous avons tenté d'optimiser encore cette molécule. Tout d'abord, en position intermédiaire, nous avons remplacé la tyrosine par une paraéthoxytyrosine pour étudier l'influence de la disparition du proton phénolique et sa substitution par un groupement alkyle<sup>50</sup>. Nous avons aussi utilisé l'acide pipécolinique, qui est un analogue du Tic sans noyau aromatique. Nous avons enfin utilisé un groupement benzoyl à la place du Tic car nous voulions vérifier que ce qui est vrai pour H-DTic-DTyr-DPnp-OH (comme la nécessité d'avoir des extrémités libres et ionisables) l'était aussi pour H-DTic-DTyr-DPcp-OH.

**Tableau 9** : Dérivés de H-DTic-DTyr-DPcp-OH :

Nom	Structure de la molécule	N°	IC <sub>50</sub> μM
H-DTic-DTyr(OEt)-DPcp-OH		30	>1
Bzl-DTyr-DPcp-OH		31	>10
H-DPip-DTyr-DPcp-OH		32	>10

### Discussion :

Le remplacement de la tyrosine par une paraéthoxytyrosine fait diminuer l'activité d'un facteur 10. D'autre part, les résultats obtenus confirment que ce qui était applicable à H-DTic-DTyr-DPnp-OH le reste pour H-DTic-DTyr-DPcp-OH : les extrémités doivent d'abord être libres et ionisables, ensuite le Tic est un élément nécessaire à l'activité, non seulement par sa fonction

amine protonable mais aussi par sa chaîne latérale aromatique. Les renseignements donnés par la bibliothèque sont transposables ici.

#### III-4/ Conclusion de cette étude :

De ces résultats, il est à noter qu'un seul des 30 analogues préparés s'est révélé meilleur que le produit issu du criblage. Il s'agit du tripeptide H-DTic-DTyr-DPcp-OH où la paranitrophénylalanine est remplacée par la parachlorophénylalanine. La valeur de l' $IC_{50}$  de ce composé est de 100 nM, ce qui fait de ce produit *un antagoniste puissant des récepteurs  $V_2P$  de la vasopressine.*

#### Ces résultats démontrent que :

- la méthode combinatoire est efficace et a permis d'identifier un produit antagoniste de structure *a priori* imprévisible sur la base du ligand naturel, la vasopressine.
- ce produit s'est montré d'emblée très actif et difficilement améliorable.
- ce produit est très peu tolérant vis-à-vis des modifications apportées, au niveau de la chiralité, des extrémités ou des chaînes latérales.

On notera enfin que la plupart des résultats a été obtenue simultanément. Leur analyse a donc été synthétique et non séquentielle. Ceci préfigure la démarche qu'il conviendra de suivre lorsque les capacités de criblage auront atteint des débits tels que plusieurs produits actifs apparaîtront conjointement.

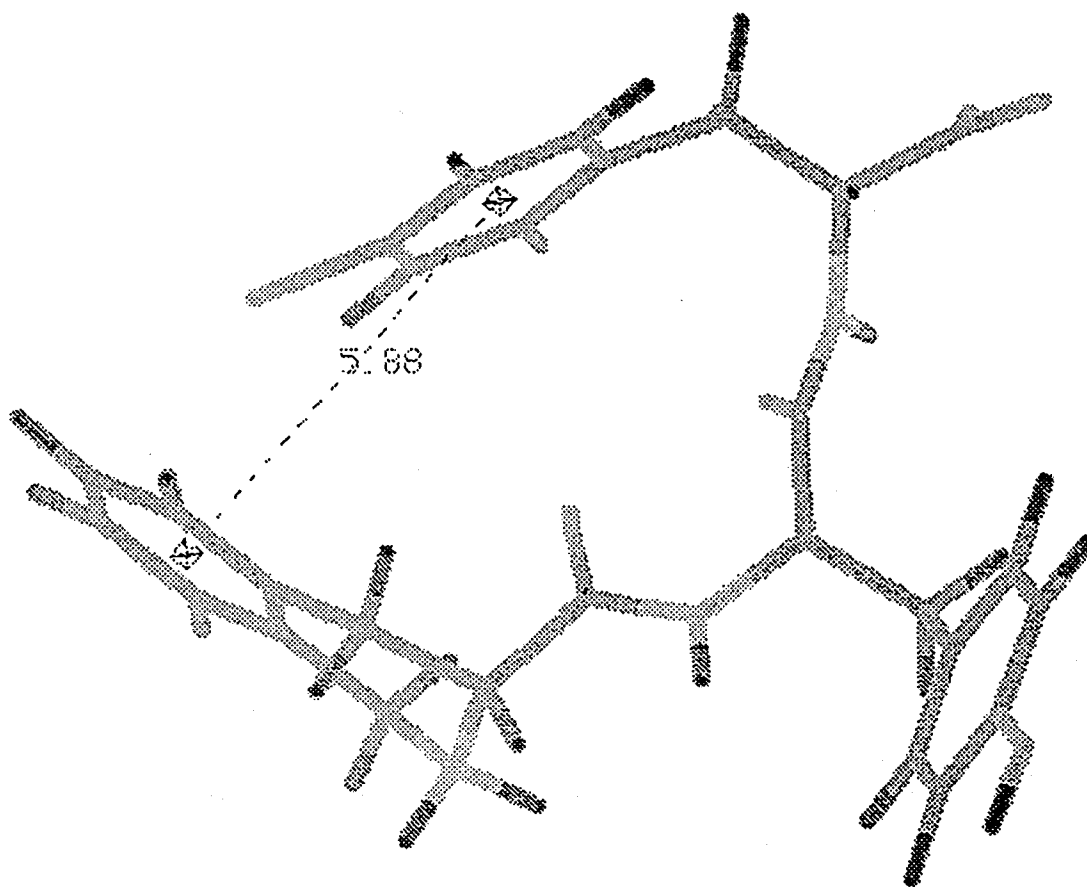
#### IV/ ETUDE STRUCTURALE DE H-DTic-DTyr-DPcp-OH (14) :

Nous avons cherché à déterminer la structuration spatiale de l'antagoniste le plus actif, H-DTic-DTyr-DPcp-OH. Pour cela, nous avons utilisé d'une part la modélisation moléculaire qui fournit des conformations probables adoptées par la molécule et d'autre part, la RMN qui permet de confirmer les hypothèses.

##### IV-1/ Modélisation moléculaire

H-DTic-DTyr-DPcp-OH, a été modélisé à l'aide du logiciel BIOSYM<sup>51,52</sup>. Par création d'un champ de force dans le vide, un modèle où le tripeptide est replié sur lui-même a été obtenu (schéma 48). Ce repliement impliquerait une interaction entre 2 des 3 noyaux aromatiques : celui de l'acide tétrahydroisoquinoléique (Tic) et celui de la parachlorophénylalanine (Pcp), ceci permettrait d'expliquer pourquoi les aromatiques substitués comme la paranitrophénylalanine ou la parachlorophénylalanine d'un côté, et l'acide tétrahydroisoquinoléique de l'autre, sont indispensables pour établir une conformation favorable à l'activité.

**Schéma 48** : Modélisation de H-DTic-DTyr-DPcp-OH, extrémités non chargées dans le vide

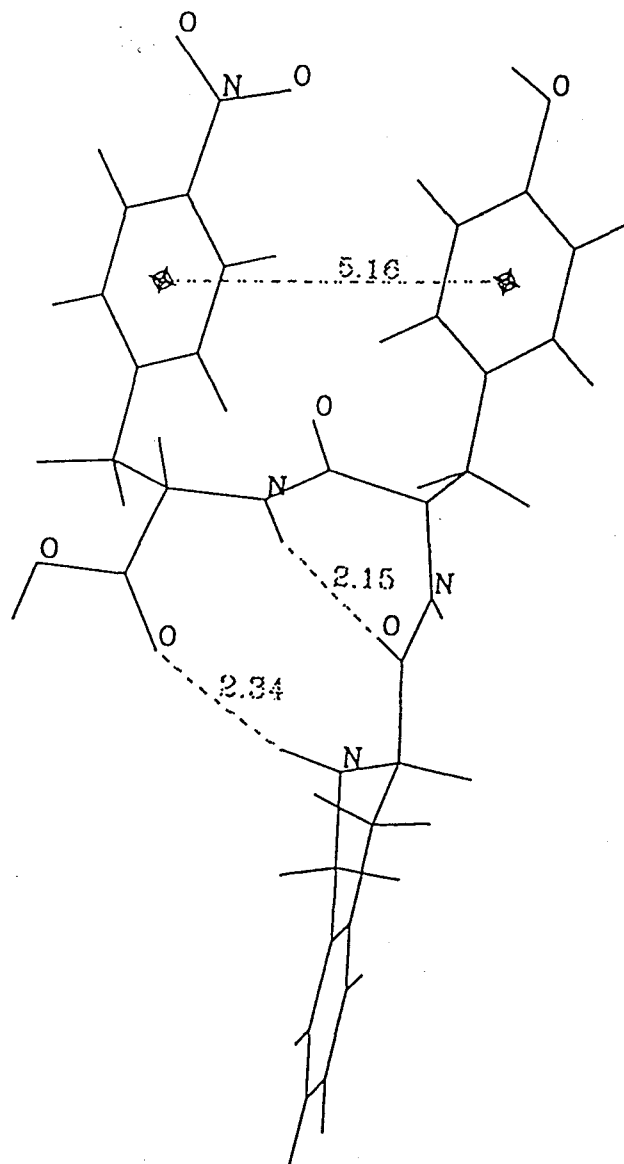




Dans l'eau, à pH physiologique, les extrémités N et C terminales sont respectivement protonées et déprotonées. On peut alors s'interroger sur leur rôle dans l'activité de la molécule et penser que : soit elles entrent en interaction avec des sites inversement chargés du récepteur  $V_2$ , soit elles contribuent à stabiliser une structure repliée par formation d'une liaison ionique intramoléculaire.

Une étude de dynamique moléculaire H-DTic-DTyr-DPnp-OH (2) où les extrémités ont été *a priori* chargées montre effectivement une conformation cyclique du produit (schéma 49).

**Schéma 49** : Modélisation de H-DTic-DTyr-DPnp-OH, extrémités chargées dans le vide



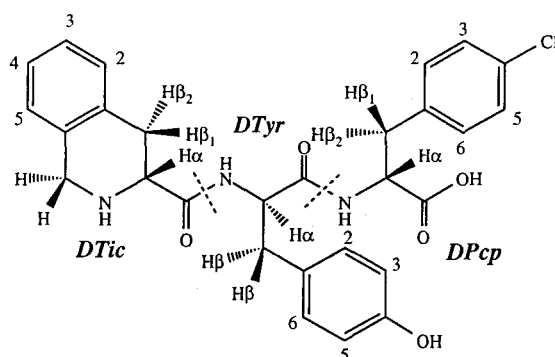
Le repliement de la molécule oriente la chaîne latérale de l'acide aminé intermédiaire à l'extérieur. Cette orientation pourrait expliquer la moindre sensibilité de cette position aux substitutions.

#### IV-2/ Résultats de l'étude RMN :

Le tripeptide **14** a été synthétisé et purifié en grande quantité. L'étude RMN a été réalisée sur le spectromètre 600MHz BRUCKER, nous cherchons ainsi à confirmer l'hypothèse de repliement faite par modélisation moléculaire.

Pour simplifier l'attribution, une formule détaillée de la molécule est donnée dans le schéma 50 :

**Schéma 50 :** *H-DTic-DTyr-DPcp-OH*, numérotation complète en vue de l'étude RMN :



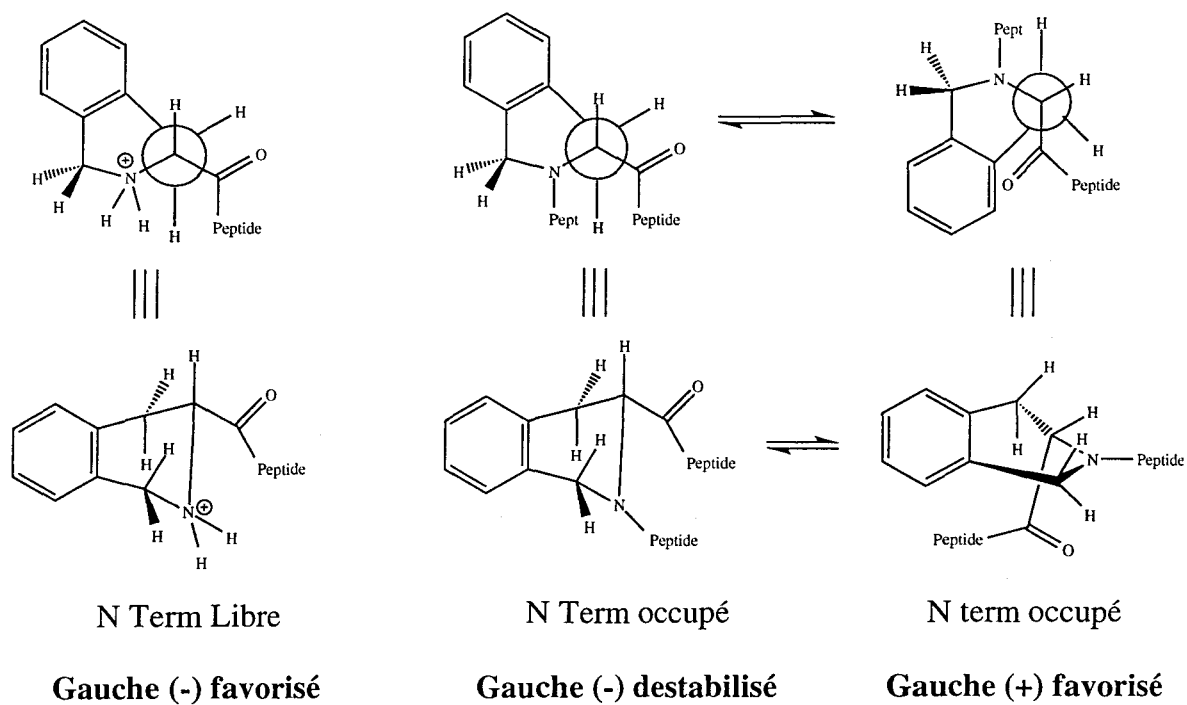
Le spectre du produit a été fait dans D<sub>2</sub>O, DCl, à pH très acide (pH=0,7).

Le détail du spectre RMN propose 2 déplacements chimiques différents pour les protons H $\beta_1$  et H $\beta_2$  du Tic et du Pcp, respectivement H $\beta_1$  Tic  $\delta = 3,09$  (dd, 1H, J=5 Hz) et H $\beta_1$  Pcp  $\delta = 3,02$  (dd, 1 H, J=5 ; 14 Hz) ; H $\beta_2$  Tic  $\delta = 2,87$  (m, 1 H, J=11 Hz) et H $\beta_2$  Pcp  $\delta = 2,75$  (dd, 1 H, J=5 Hz) et un seul déplacement chimique moyen pour les protons  $\beta$  de la tyrosine, c'est-à-dire : H $\beta$  Tyr  $\delta = 2,78$  (d, 2 H, J=8 Hz). Bien que ceci ne constitue pas une preuve de la structuration du tripeptide (**14**), cette observation indique que les protons  $\beta$  du Tic et du Pcp sont « figés » dans une conformation de fréquence de rotation inférieure à la fréquence des impulsions RMN. Par contre, les protons  $\beta$  de la tyrosine, en position centrale ont une fréquence de rotation

supérieure à celle du phénomène RMN. (L'ensemble de l'interprétation du spectre figure dans la partie expérimentale).

Nous nous reportons aussi à quelques données concernant le Tic publiées par Hruby<sup>53</sup>. En appliquant ces résultats à notre cas, il est possible de proposer que le Tic du tripeptide **14** adopte la conformation gauche (-), plus favorisée quand la position N terminale est libre, en équilibre avec la conformation gauche (+).

**Schéma 51** : Conformation gauche (-) et gauche (+) de l'acide tétrahydroisoquinolyl carboxylique



Bien qu'il ne s'agisse pas d'une preuve absolue de l'existence de l'une ou l'autre des conformations, nous pouvons cependant avancer l'hypothèse d'une structuration de la molécule dans l'eau à pH acide.

## **V/ ETUDE DE L'EFFET DE H-DTic-DTyr-DPcp-OH SUR LES RECEPTEURS V<sub>2</sub> HUMAINS**

Pendant que nous réalisons les synthèses, l'équipe de pharmacologie des laboratoires Glaxo a mis au point un test fonctionnel du récepteur V<sub>2</sub> sur cellules humaines : l'analogue le plus actif (**14**) a été testé sur le récepteur V<sub>2</sub> humain (V<sub>2</sub>H) selon le protocole décrit plus haut.

Utilisant ce test biologique aucune activité n'a pu être détectée avec le composé **14**, ni avec les autres analogues que nous avons synthétisés.

Un tel phénomène -la perte d'activité d'inhibiteurs issus du criblage systématique lors du passage d'une espèce à une autre- n'est pas exceptionnel. Il est à l'origine d'une tendance récente qui consiste à privilégier le criblage direct sur les récepteurs humains, sans passer intermédiairement par des récepteurs animaux, chaque fois que cela est possible.

Ce résultat est relativement étonnant ici compte tenu de la forte homologie entre les séquences des récepteurs V<sub>2</sub> humain et porc (87%).

Une étude plus poussée permettrait probablement de corrélérer cette perte d'activité à la mutation d'un (ou de quelques) aminoacide(s) particulier(s) entre ces récepteurs. Un précieux renseignement sur leur mode d'interaction avec la vasopressine pourrait alors en être déduit.

## **VI/ CONCLUSION :**

Notre approche initiale avait permis de tester simultanément un grand nombre de possibilités de telle sorte que l'antagoniste obtenu s'est montré très difficile à améliorer, à une exception près, les modifications que nous avons apportées ont fait chuter l'activité. Nous avons pour projet d'autres modifications comme, par exemple, la substitution des liaisons amides pour obtenir des pseudopeptides (triglycines N substituées). Ces modifications n'ont pas été effectuées à cause de la perte d'activité sur le récepteur humain.

L'échec du passage du récepteur porcin au récepteur humain pose un des problèmes les plus importants des méthodes de découverte de nouveaux médicaments par le criblage *in vitro*.

- 1- Le choix de la cible est capital, qu'elle soit humaine, animale, ou d'origine transgénique.
- 2- Le choix du type de test est très important aussi, qu'il soit de type « binding » ou de type fonctionnel, qu'il soit effectué sur organe isolé ou sur animal entier.

La volonté d'automatiser et d'accélérer le criblage a imposé une simplification des paramètres qui peut être à l'origine de nombreux faux positifs et négatifs. Mais l'accélération du criblage a pu compenser ces « pertes ». Il faut garder à l'esprit que le but n'est pas de repérer toutes les têtes de séries potentiellement présentes dans les bibliothèques combinatoires et les pharmacothèques, mais d'en trouver quelques-unes, le plus vite possible et de pouvoir les développer rapidement, tout en diminuant les risques d'échecs pendant les phases de développements précliniques et cliniques.

Dans cette optique, l'accélération extraordinaire des tests de criblage *in vitro* permet aujourd'hui de réaliser ce que l'on appelle un « profil pharmacologique » sur une soixantaine de cibles pertinentes. Les résultats de cette étude permettent de choisir, parmi des candidats au développement, ceux qui présenteront la meilleure sélectivité, et donc les risques les plus faibles de conduire à un échec lors des étapes ultérieures d'évaluations précliniques et cliniques.

# CHAPITRE IV :

## SYNTHESE DE LYN

*Une bibliothèque de trimères non peptidiques  
comprenant 19440 composés*

Nous avons décidé de préparer d'autres bibliothèques combinatoires. Notre principal objectif était à la fois de nous éloigner des structures synthétisées dans les bibliothèques orthogonales mais aussi d'améliorer la diversité intrinsèque des nouvelles bibliothèques en utilisant un plus large éventail de synthons. La diversité de la bibliothèque présentée ici est nouvelle car elle n'est plus portée uniquement par les aminoacides, nous utilisons aussi des amines et des anhydrides. Nous nous proposons d'en détailler la conception et la réalisation. Le nom de LYN provient d'une contraction de **L** pour Lille, **Y** pour anhydride, **N** pour amine.

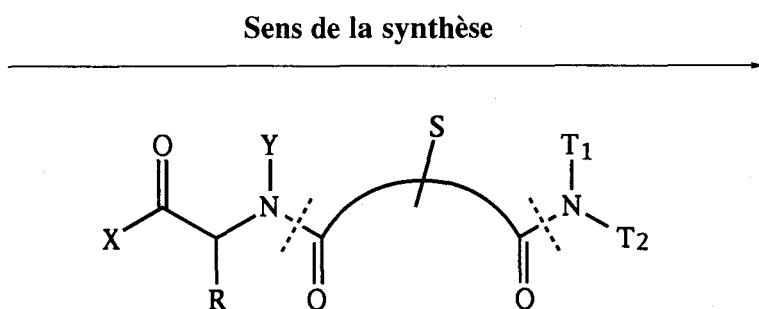
### I/ PRESENTATION DE LA BIBLIOTHEQUE

La bibliothèque sera composée de trois types de synthons de base :

- des aminoacides dont la chaîne latérale est notée **R**
- des anhydrides cycliques dont les substituants sont notés **S**
- des amines dont les substituants sont notés **T<sub>1</sub>** et **T<sub>2</sub>**.

La synthèse est faite en phase solide et conduit à des composés de formule générique suivante :

**Schéma 52** : *formule générique de la bibliothèque*



avec :  $\text{X} = \text{OH}$  ou  $\text{NH}_2$  et  $\text{Y} = \text{H}$  ou  $\text{R}$



Dans la suite de ce mémoire, les notations **R**, **S**, **T<sub>1</sub>** et **T<sub>2</sub>** seront gardées et attribuées comme suit : **R** pour les chaînes latérales d'acides aminés, **S** pour les substituants des anhydrides cycliques, **T<sub>1</sub>** et **T<sub>2</sub>** pour les substituants des amines.

Dès la conception de cette bibliothèque, nous pensions utiliser environ :

- 20 acides aminés
- 10 anhydrides cycliques
- 100 amines

L'effectif de la bibliothèque LYN a été estimé à environ  $20 \times 10 \times 100 = 20\,000$  produits. Il est possible de recruter d'autres anhydrides pour les faire réagir avec les synthons qui auront été choisis : la bibliothèque est dite « ouverte ».

## **I-1/ Stratégie générale**

Nous avons choisi d'explorer une diversité nouvelle conférée par des synthons différents, c'est-à-dire les anhydrides et les amines, tout en gardant les acides aminés.

### ***I-1-1/ Enjeux et bases de la chimie***

- Une première exigence était ici de nous éloigner de la structure peptidique. En effet, cet enchaînement a *déjà été exploré* dans les bibliothèques précédentes, même si les chaînes latérales des acides aminés sont variées, la diversité du lien peptidique est relative car elle se base toujours sur le même squelette et une alternance régulière « ..NH-CH(R<sub>1</sub>)-CONH-CH(R<sub>2</sub>)CONH... ».
- Nous désirions toutefois garder dans un premier temps une chimie d'assemblage basée sur la liaison amide, une chimie que nous maîtrisons.
- Nous avons utilisé la phase solide car, comme nous l'avons vu, cette technique est pratiquement indispensable à la synthèse combinatoire en mélange s'il y a plus de 2 partenaires. Les purifications sont faites par lavages des excès de réactifs, comme nous l'avons vu au schéma 20 (ch. I, § I). Tous les produits immobilisés sur la résine ont le même comportement physico-chimique : celui de billes de polymères toutes insolubles, avec les mêmes propriétés de gonflement.

- Nous avons enfin décidé de maintenir le choix d'un aminoacide de chiralité D car sa présence crée, comme dans les bibliothèques orthogonales, une structure non naturelle.

### *I-1-2/ La présence des anhydrides et des amines*

- Les *anhydrides* apportent une diversité jusqu'ici non explorée dans nos bibliothèques. D'une part, leur présence permet une « inversion » du sens des liaisons amides au cours de la synthèse, comme le montre la formule générique dans le schéma 52 (« NHCO » d'abord, « CONH » ensuite), mais aussi un éloignement spatial entre ces deux fonctions amides différent de celui d'un enchaînement peptidique classique.

D'un point de vue chimique, les anhydrides cycliques offrent à la fois une activation de l'une des fonctions acides et une protection de la seconde. En revanche, il convient de prendre en compte la formation de deux régioisomères quand un anhydride non symétrique est utilisé.

Enfin, beaucoup d'anhydrides disponibles dans le commerce ont une structure contrainte, qui persistera dans les composés finaux.

- Les *amines*, quant à elles, apportent aussi une diversité très riche, puisque quelques milliers d'amines sont disponibles dans les catalogues (amines aliphatiques primaires ou secondaires, anilines primaires ou secondaires, amines sur hétérocycle, hydrazines...). D'autre part, le couplage des amines sur une fonction acide immobilisée nous pousse à explorer la formation d'un amide dans le sens « non conventionnel », à l'opposé de la synthèse peptidique classique.

### **I-2/ Principe de la synthèse (schéma 53)**

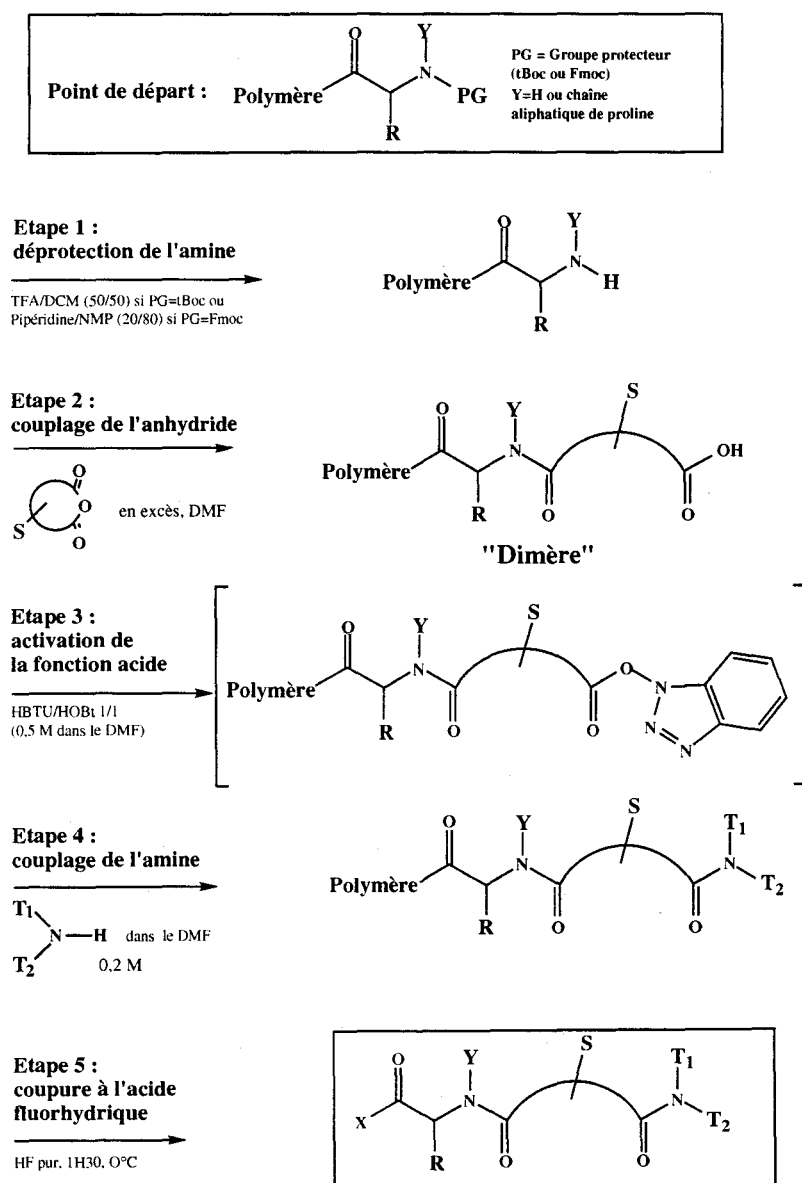
Le premier élément de diversité est une aminoacyl résine de type Merrifield (ester benzylique de l'acide aminé) ou de type méthylbenzhydramine MBHA (amide entre la résine et l'acide aminé). Après déprotection du groupe protecteur de la fonction amine (« PG » sur le schéma 53) par un mélange TFA/DCM 50/50 dans le cas des tBoc, ou par un mélange pipéridine/NMP 20/80 dans le cas des Fmoc, il est procédé à l'incorporation du maillon « diacide ». Pour cette étape (n°2), on procède au couplage de l'anhydride en excès. La formation de la liaison amide se



traduit par la disparition de la fonction amine, évaluée par le test de Kaiser, et simultanément par l'apparition d'une fonction acide carboxylique sur la résine.

Cette fonction acide carboxylique est alors activée par un mélange HBTU/HOBt dans le DMF il se forme un ester activé de l'hydroxybenzotriazole à l'étape 3. La dernière étape d'assemblage met en jeu l'attaque du carboxyle activé par une amine et conduit à la deuxième liaison amide (ét. 4). Après déprotection des chaînes latérales des aminoacides, la coupure du lien trimère/résine est réalisée par action de l'acide fluorhydrique anhydre (ét. 5).

**Schéma 53 : Synthèse générale de la bibliothèque**



## II/ ETUDE PRELIMINAIRE

Au cours de cette étude, préalable à l'assemblage de la bibliothèque définitive, quelques réactifs très différents, choisis pour être représentatifs des synthons susceptibles d'être utilisés dans la bibliothèque combinatoire, ont été mis en jeu.

Chacun des produits obtenus a été analysé pour estimer la pertinence de la future bibliothèque combinatoire. Seront pris en compte à ce niveau, non seulement le rendement des réactions mais aussi de l'ampleur de la diversité des produits qui pourront être synthétisés.

### II-1/ Etude comparée de la réactivité de 6 anhydrides

Le but de cette étude est de vérifier la réactivité des anhydrides vis-à-vis d'une fonction amine immobilisée, correspondant à l'étape 2 du schéma 53. Pour cela, une aminoacyl résine simple, la glycine-O-Polymère a été utilisée. Le choix de la glycine est justifié par la simplicité du maillon et son absence de chiralité.

#### *II-1-1/ Sélection des anhydrides cycliques*

Parmi les anhydrides commerciaux, des anhydrides très différents chimiquement ont été sélectionnés : des anhydrides aromatiques ou aliphatiques, possédant un cycle à 5 ou 6 chaînons, ou d'autres pour lesquels une difficulté d'ouverture est possible.

- *L'anhydride phtalique* : Pour cet anhydride aromatique, une fois l'amido acide obtenu, la géométrie du cycle à 5 chaînons est favorable à la fermeture du cycle par déshydratation et à la formation d'un phtalimide.

- *L'anhydride glutarique* : Cet anhydride aliphatique à 6 sommets est le plus simple de ceux que nous employons. Ne présentant pas de contrainte stérique, il constitue une référence de réactivité élevée.

- *L'anhydride 2,2-diméthylsuccinique* : Dans cet anhydride, le cycle à 5 chaînons est moins favorable à l'ouverture que le précédent. En effet, selon la règle de Thorpe et Ingold, la cyclisation en anhydride de l'acide 2,2-diméthylsuccinique par départ d'une molécule d'eau est énergétiquement favorisée à cause de l'effet de répulsion des deux groupes méthyles :

l'ouverture de l'anhydride est alors inversement moins facile. De plus, cette molécule asymétrique permet d'étudier le cas où deux régioisomères peuvent se former.

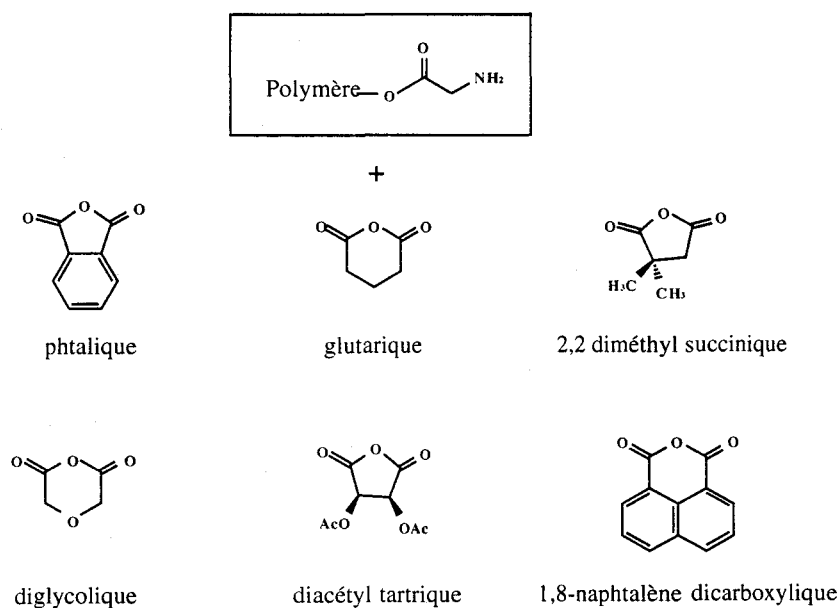
- *L'anhydride diglycolique* : Comme l'anhydride glutarique, cet anhydride ne présente pas de contrainte stérique supplémentaire et devrait être bien réactif. Par contre, il nous paraissait intéressant d'étudier la stabilité de la fonction éther lors de la coupure à l'acide fluorhydrique.

- *L'anhydride diacétyltartrique* : Anhydride monocyclique réactif, il nous permet d'établir la stabilité des deux groupements acétoxy par l'acide fluorhydrique. Notons que cette molécule possède 2 carbones prochiraux. Le couplage à la fonction amine sur la résine génère donc un mélange de 2 énantiomères, tout au moins dans notre étude car l'acide aminé utilisé n'est pas chiral. Si une amine achirale est greffée sur la fonction acide apparue (ét. 4, sch. 53), le produit obtenu est un mélange racémique. Si en revanche l'amine employée est chirale, le produit obtenu est un mélange de 2 diastéréoisomères.

- *L'Anhydride naphthalènedicarboxylique* : Comme cette molécule est plane et aromatique, elle constitue une référence de faible réactivité. De plus, sa solubilité dans le DMF étant nettement inférieure à celle des autres anhydrides, cet anhydride est utilisé moins concentré.

Les formules des 6 anhydrides sont données dans le schéma 54.

**Schéma 54** : étude de l'électrophilie de 6 anhydrides, correspondant à l'étape 2



## II-1-2/ Résultats

Les résultats sont exprimés en fonction de la disparition des fonctions amines de la glycine-O-Polymère, évaluée par un test de Kaiser quantitatif. Plus le test de Kaiser donne une absorbance faible, moins il reste de fonctions amines, et meilleure est la conversion comme le montre le tableau 10.

**Tableau 10** : la fixation des anhydrides sur la glycytrésine

Anhydride	Temps (h) couplage	Charge (mmol/g)	Masse de résine (mg)	Absorbance à 570 nm	Conversion (%)
Phtalique	1	0,64	2,7	128	98
Phtalique	2	0,64	3,0	256	98
Glutarique	1	0,64	1,3	41	98
Glutarique	2	0,64	4,1	37	100
Diméthylsuccinique	1	0,64	0,9	30	98
Diméthylsuccinique	2	0,64	3,5	45	99
Diglycolique	1	0,64	1,1	93	96
Diglycolique	2	0,64	3,0	148	97
Diacétyltartrique	1	0,64	0,9	230	87
Diacétyltartrique	2	0,64	3,9	140	98
Naphtalène dicarboxylique	1	0,64	0,9	283	84
Naphtalène dicarboxylique	2	0,64	3,4	780	88

### Discussion :

Les rendements de disparition de la fonction amine immobilisée sont déjà très bons après le premier couplage d'une heure. Ils s'améliorent pratiquement tous au deuxième couplage : les cinq premiers rendements de conversion se situent entre 96 et 100%. Dans le cas de l'anhydride naphtalènedicarboxylique, le rendement passe de 84 à 88% entre la première et la deuxième heure de couplage : cet anhydride est effectivement une référence de moindre réactivité. Nous choisissons de le supprimer de notre bibliothèque pour les raisons suivantes :

- nous désirons des rendements maximums,

- cet anhydride pose des problèmes de solubilité dans le DMF et ne peut pas être solubilisé à la même concentration que les autres (cf § II-1-1 et conditions expérimentales)
- il est très probable que sa mauvaise solubilité et son ouverture difficile soient à l'origine de sa moins bonne réactivité.

### **II-1-3/ Traitement ultérieur des résines**

Les résines obtenues lors de cette étude suivent le protocole général énoncé au schéma 53. Les groupes carboxyles sont activés selon l'étape 3. Nous avons choisi d'utiliser le mélange HBTU/HOBt (1/1), parce qu'il permet d'activer le carboxyle sous forme d'ester d'hydroxybenzotriazole avec une cinétique rapide.

Sur les 6 résines « activées » obtenues, la benzylamine est couplée à raison de 0,9 équivalents, (ét. 4 sch. 53). Le test de Kaiser permet de quantifier la consommation de cette amine primaire. Puisque nous sommes en défaut d'amine par rapport à la résine, le test de Kaiser est plus sensible.

Les résultats du premier couplage, exprimés en pourcentage de benzylamine disparue, sont contenus dans le tableau 11.

**Tableau 11 : résultats de la disparition de la benzylamine**

<b>Anhydride</b>	<b>Rendement de disparition de la benzylamine en 90mn</b>
Phtalique	72%
Glutarique	92%
Diméthyl Succinique	94%
Diglycolique	85%
Diacétyl tartrique	92%
Naphtalène dicarboxylique	72%

Un second couplage par la benzylamine est effectué pendant 1h30 supplémentaire après réactivation des fonctions carboxyliques. Il permet de faire réagir le reste des fonctions amines puisque seulement 0,9 éq. de benzylamine avait été employé au premier couplage.

## Commentaire

Les conditions que nous avons appliquées à ces synthons modèles sont favorables à la formation des produits attendus, puisque la disparition des amines réactives est située entre 72 et 94% pour le premier couplage.

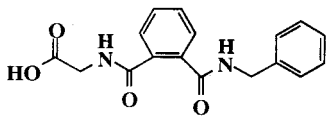
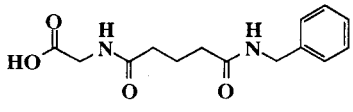
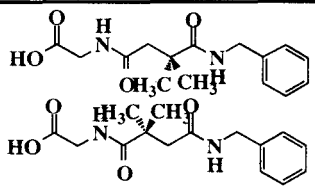
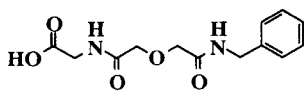
Après une réactivation des fonctions acides et un recouplage par la benzylamine. Une coupure à l'acide fluorhydrique est effectuée (ét. 5, sch. 53) puisqu'il est impossible de réaliser une étude structurale des produits fixés au polymère.

### II-1-4/ Résultats analytiques

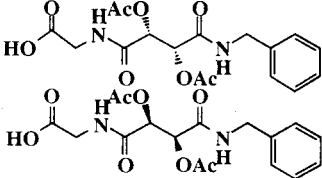
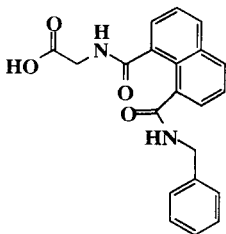
Après la coupure des trimères, les produits attendus, dont les rendements et la pureté sont présentés dans le tableau 12, sont obtenus.

Certaines des masses moléculaires attendues n'ont pas été identifiées par spectrométrie de masse, mais la valeur M/z des imides correspondants a été détectée. Le schéma 55 (après le tableau 12) explique les deux types d'imides qui peuvent être générés dans le spectromètre.

**Tableau 12 : résultats de l'étude analytique**

N°	Produit	Rdt % (pureté HPLC cyano)	Analyse en SM
33		19% (100%)	MM attendue = 312,3 M/z obtenus = ceux des imides <i>glycylphthalimide</i> 206 <i>benzylphthalimide</i> « T » 238,2
34		47% (100%)	MM attendue = 278,3 M/z obtenu = 279,2 (M+ H <sup>+</sup> ) et celui de l'imide « T » <i>benzylglutarimide</i> 204,2
35		39% (100%)	MM attendue = 292,34 M/z obtenu = 293,2 (M+ H <sup>+</sup> )
36		48% (100%)	MM attendue = 280 M/z obtenu = 281,2 (M+ H <sup>+</sup> ) et celui de l'imide « T » <i>benzylglycolylimide</i> 206,2

**Tableau 12 (suite) : Résultats de l'étude analytique**

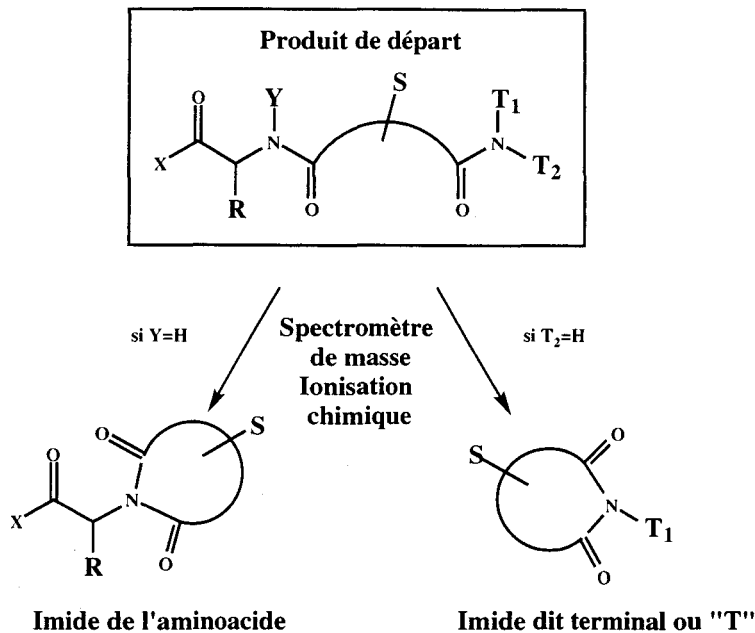
<p>37</p>		<p><b>15%</b> (74%) C18</p>	<p>MM attendue = 380 M/z obtenu = celui de l'imide glycyldiacétylsuccinimide+4=277,2</p>
<p>38</p>		<p><b>7%</b> (100%)</p>	<p>MM attendue = 362,3 M/z obtenu = celui de l'imide glycynaphtylimide 256,2</p>

**Commentaire :**

Les produits obtenus sont purs mais le rendement en produit isolé est assez variable selon les cas et en général plutôt faible. Après coupure HF, la solubilisation du produit coupé est réalisée par un mélange tertibutanol/eau en vue de la lyophilisation. Ce mélange n'est pas universel. Nous avons décidé de le changer pour les expériences futures et pour la synthèse de la bibliothèque. Il est en effet possible que les produits soient restés adsorbés sur le polymère. L'analyse du produit contenant l'anhydride diacétyltartrique a été effectuée sur colonne C18. Le pic moléculaire du composé attendu n'est pas observé par spectrométrie de masse. En revanche, celui de l'imide correspondant est détecté. Nous décidons de ne pas utiliser cet anhydride dans la bibliothèque.

Nous montrons dans le schéma 55 comment deux imides peuvent se former dans le spectromètre de masse.

**Schéma 55** : Formule et origine des deux types d'imides obtenus :



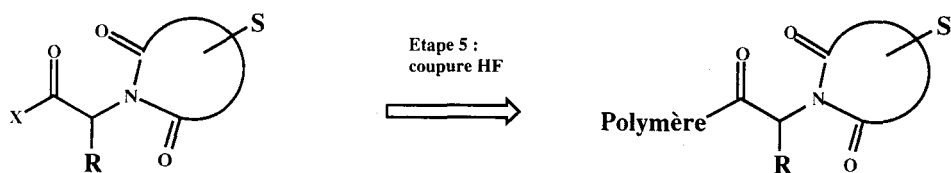
Les imides "terminaux" (notés « T » dans le tableau) sont formés entre l'anhydride et l'amine terminale, ici la benzylamine. Ils sont générés dans le spectromètre lors de l'ionisation. La benzylamine a été incorporée dans la molécule, ceci prouve que la synthèse est parvenue à son terme.

L'imide de l'acide aminé a deux origines : il peut être formé lors de l'ionisation chimique comme le montre le schéma 55 par condensation de l'anhydride sur l'acide aminé.

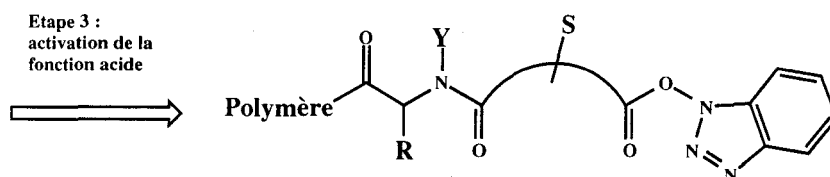
Il peut aussi avoir été généré sur la résine comme le montre le schéma 56. Lorsque la fonction acide est activée, si la contrainte spatiale de l'anhydride est favorable, une cyclisation intramoléculaire peut avoir lieu par perte d'une molécule d'eau entre l'acide aminé immobilisé et la fonction carboxylique (schéma 56).



### Schéma 56 : Autre origine de l'imide de l'acide aminé



Imide de l'acide aminé



L'origine de l'imide de l'acide aminé détecté en spectrométrie de masse ne peut donc pas être établie avec certitude. Seule la consommation de la benzylamine dans la solution de couplage prouve que cette amine a bien été incorporée.

Dans le cas de l'anhydride naphthalènedicarboxylique, seule l'imide de l'acide aminé est observé. Compte-tenu de la géométrie de cet anhydride, si la benzylamine n'avait pas été consommée, il aurait été logique de penser que l'imide se soit formé sur la résine, pourtant ce n'est pas le cas.

## II-2/ Etude de la réactivité de 7 amines

Nous étudions ici l'étape 4 du schéma 53 c'est-à-dire le couplage de l'amine sur la fonction acide activée. Une acyl aminoacyl résine a été synthétisée à partir d'une résine chlorométhylée de Merrifield, où a été ancrée la glycine. Après déprotection (ét. 1), l'anhydride succinique a été fixé (ét. 2) et enfin la fonction acide obtenue a été activée sous forme d'un ester d'hydroxybenzotriazole (ét. 3). Le maillon succinique a été choisi pour sa simplicité, seule la réactivité des amines sur le carbonyle activé est étudiée.

## II-2-1/ Sélection des amines

Le choix des amines a été le plus complet possible, on trouve des amines primaires et secondaires, des amines possédant une fonction alcool secondaire, un acide aminé estérifié...

- La *benzylhydrazine* représente les hydrazines.

- La *N-benzylméthylamine* est une amine secondaire ; habituellement considérée comme moins nucléophile que les amines primaires, elle sera une référence de moindre réactivité pour notre étude.

- La *1-pipéronylpipérazine* est une amine secondaire « contrainte » dans un cycle, elle est plus nucléophile qu'une amine secondaire non cyclique.

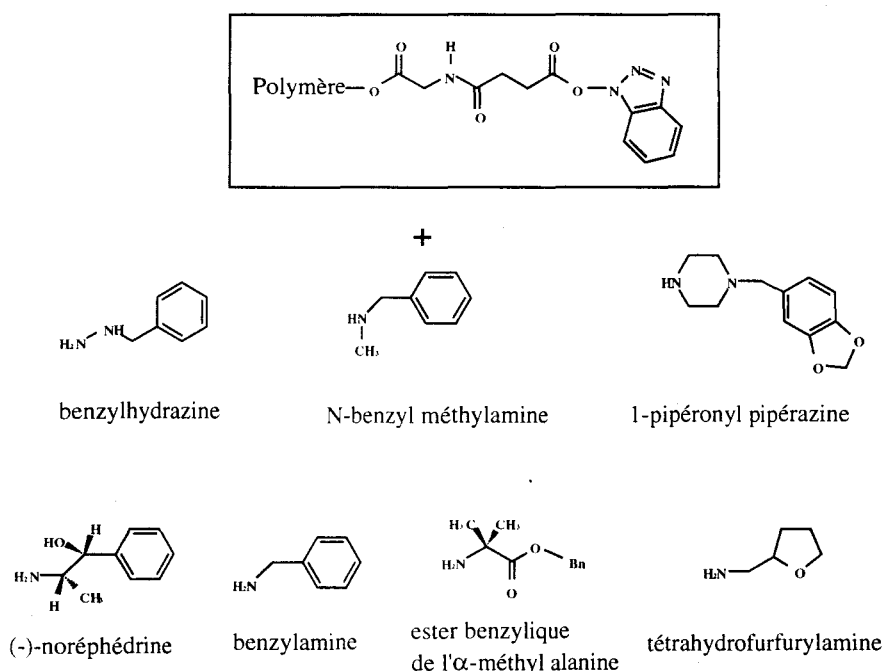
- La *(-)-noréphédrine* représente les amines primaires possédant une fonction alcool hydrophile.

- La *benzylamine* a été choisie en tant qu'amine primaire simple, c'est une référence de bonne réactivité.

- L'*ester benzylique de l'α-méthylalanine* est un aminoacide achiral dont la fonction acide est protégée par un ester benzylique, il réagit comme une amine primaire. L'ester benzylique, lui, ne résiste pas aux conditions de la coupure HF et est hydrolysé en acide carboxylique.

- La *tétrahydrofurfurylamine* représente les amines aliphatiques, portant un hétérocycle.

**Schéma 57** : Déclinaison de 7 amines, équivalent à l'étape 4 du schéma 53



Seulement 0,9 équivalent d'amine par rapport à la fonction acide activé a été utilisé, de manière à calculer plus facilement le rendement de couplage. Il est, en effet, préférable que l'amine soit le facteur limitant : la disparition des amines du surnageant est mesurée au bout de 1h30 de couplage, par un test de Kaiser quantitatif, sur une prise d'essai de volume connu.

### II-2-2/ Résultats

Nous rapportons le pourcentage de disparition des amines en solution. Des étalonnages des tests de Kaiser et de Christensen ont été réalisés pour connaître leur coefficient d'extinction molaire.

**Tableau 13** : *disparition des amines en solution*

Amine	Pourcentage de disparition de l'amine
Benzylhydrazine	89%
Benzylméthylamine	32%
Pipéronylpipérazine	38%
Noréphédrine	86%
Benzylamine	82%
$\alpha$ -méthyl alanine-O-Bzl	93%
Tétrahydrofurfurylamine	81%

#### Interprétation :

Les amines secondaires sont, comme on pouvait s'y attendre, de moins bons nucléophiles que les amines primaires puisqu'au bout d'1h30, seulement environ 30% des amines secondaires ont été consommés. Entre les amines secondaires, une différence de rendement de disparition est à noter : la pipérazine réagit mieux que la N-benzylméthylamine, l'azote contenu dans le cycle pipérazine est plus nucléophile.

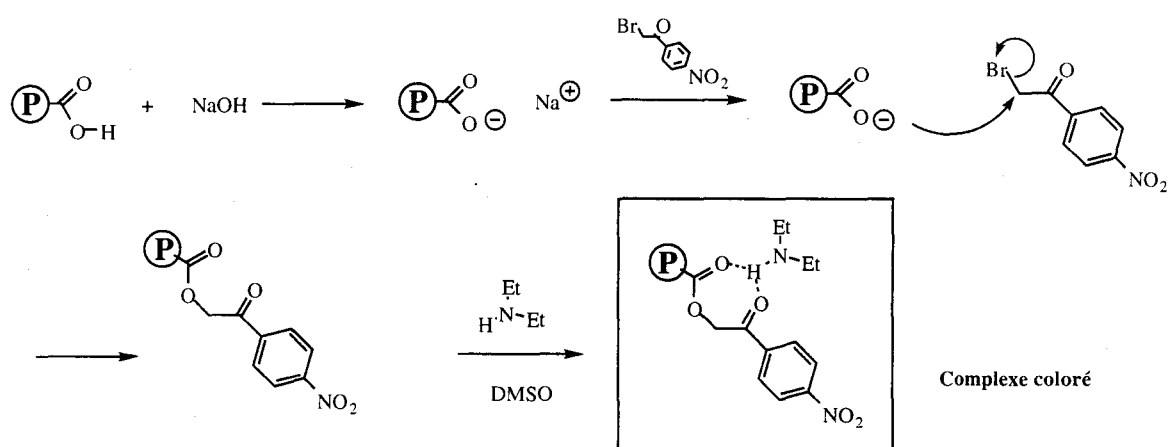
Pour les autres amines, le rendement de disparition est bon et l'ensemble des positions électrophiles réagit au cours d'un deuxième couplage. Avant le recouplage d'amine, une réactivation des fonctions acides est effectuée par la solution d'HBTU/HOBt car il est probable que l'ester activé se soit hydrolysé lors du couplage des amines.

### II-2-3/ Nécessité de disposer d'un test colorimétrique

Après un recouplage, pour être sûr que le couplage des amines soit total, il faut mettre en évidence l'absence de fonctions carboxyliques restant sur la résine. Nous avons mis au point un test colorimétrique qualitatif des fonctions carboxyliques. En effet, si des excès d'amines sont employés par rapport à la résine, le test de Kaiser quantitatif ne peut être utilisé.

Si le couplage de l'amine n'est pas complet, il reste des fonctions COOH libres, qui seront révélées par la réaction présentée dans le schéma 58.

**Schéma 58** : réaction colorimétrique des résines portant des fonctions carboxyliques :

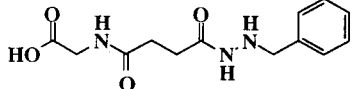
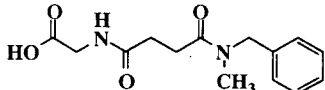
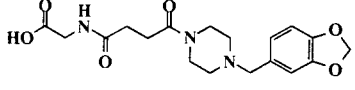
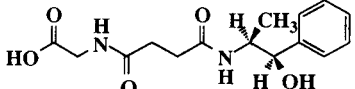
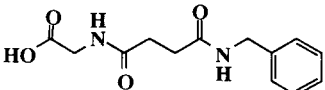
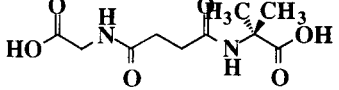
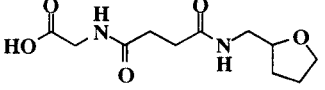


La fonction COOH est neutralisée par la soude dans le DMF, après un lavage au DMF, les fonctions carboxylates obtenues réagissent sur le bromure de paranitrophénacétyle. L'excès de réactif est lavé au DMF. La révélation est faite par la diéthylamine en présence de DMSO, et une couleur rose fuchsia apparaît pour les grains de résine porteurs de COOH. A l'inverse, une coloration rose très clair est obtenue avec une résine ne portant pas de fonction acide carboxylique<sup>54</sup>.

## II-2-4/ Résultats analytiques

Les rendements et les résultats analytiques des produits obtenus après coupure HF (étape 5 du schéma 53) figurent dans le tableau 14.

**Tableau 14 : Résultats analytiques de l'étude de déclinaison des 7 amines**

N°	Produit	Rdt % (pureté HPLC cyano)	Analyse en SM (IC)
39		99% (86%)	MM attendue=279 M/z obtenu=279,5 (M <sup>+</sup> ) et celui de l'imide glycylsuccinimide : 158
40		82% (87%)	MM attendue=278 M/z obtenu=279 (M + H <sup>+</sup> ) celui de l'imide glycylsuccinimide : 158
41		40% (76%)	MM attendue=376 M/z obtenu=379 (M + 3H <sup>+</sup> )
42		75% (71%)	MM attendue=309 M/z obtenu=309 (M <sup>+</sup> ) (par SM TOF)
43		73% (78%)	MM attendue=264 M/z obtenu=265 (par SM TOF) et celui de l'imide (par IC) benzylsuccinimide « T » : 190
44		25% (63%)	MM attendue=260 M/z obtenu=215 (M - COOH) par SM TOF et celui de l'imide (par IC) glycylsuccinimide : 158
45		31% (81%)	MM attendue=258 M/z obtenu=259 (M + H <sup>+</sup> ) et celui de l'imide furfurysuccinimide « T » : 184

Le couplage des amines a été renouvelé, pendant 1h30. Le test colorimétrique cité au § II-2-3, appliqué aux 7 résines, est négatif.

### **Discussion :**

Les rendements en produits isolés sont ici meilleurs car le mélange qui solubilise les produits en fin de coupure HF a été changé, il s'agit maintenant de l'acide acétique dans le DMF (0,1/3).

Une différence de rendement est aussi observée entre les 2 produits issus de la condensation d'une amine secondaire, elle peut provenir d'une différence de solubilité entre les produits après la coupure HF. Le produit issu de l'acide aminé ne donne pas un rendement très élevé car dans l'HF, l'ester benzylique s'hydrolyse, le produit obtenu alors est un diacide, ce qui peut expliquer sa différence de comportement physico-chimique.

### **II-3/ Réalisation d'une bibliothèque combinatoire de validation de 27 produits**

Une « bibliothèque de validation » est une bibliothèque réalisée sur un petit nombre de synthons pour en évaluer la réactivité. Elle fait appel à des synthons très divers, et toutes les combinaisons possibles sont synthétisées. Elle peut impliquer des synthèses individuelles ou en mélange.

Ici, 27 produits ont été synthétisés individuellement soit 27 fois 30  $\mu\text{mol}$  obtenues par la combinaison de

- 3 acides aminés : l'alanine (Ala), l'acide tétrahydroisoquinoléinecarboxylique (Tic), la thréonine (Thr).

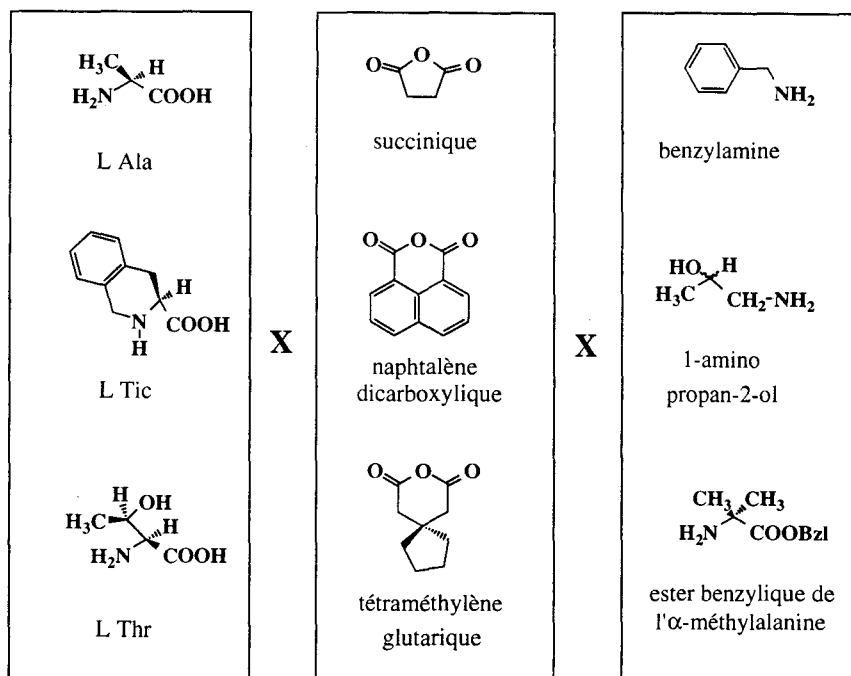
- 3 anhydrides : anhydride succinique (succ), anhydride 1,8-naphtalènedicarboxylique (naph), anhydride 3,3-tétraméthylèneglutarique (tmg).

- 3 amines : la benzylamine (bzl), le 1-aminopropan-2-ol (apl), l'ester benzylique de l' $\alpha$ -méthylalanine (aib).

Les 27 produits ont été synthétisés individuellement, mais en faible quantité. Aucune caractérisation analytique a été faite pour cette bibliothèque de validation. Seuls les rendements par disparition des synthons ont été calculés.

Les formules des synthons employés figurent dans le schéma 59.

Schéma 59 : formules des 9 synthons



### II-3-1/ Résultats obtenus grâce à cette bibliothèque de validation

#### \* Utilisation de la résine MBHA

L'argument pour ce choix a été la rapidité d'ancrage de l'acide aminé à la résine, contrairement à la résine chlorométhylée.

La réactivité des 3 acides aminés différents sur la résine a été évaluée par un test de Kaiser quantitatif. Ce test est négatif à la deuxième heure de réaction.

#### \* Etude du couplage des 3 anhydrides

Évaluée par le test de Kaiser quantitatif qui permet de suivre la disparition des fonctions amines primaires des acides aminés, cette étude a révélé les rendements de couplage suivants :

- de 98 à 100% en 30 min pour l'anhydride succinique
- de 97 à 99 % en 30 min pour l'anhydride tétraméthylène-glutarique

selon la fonction amine de l'acide aminé qui réagit.

La disparition de la fonction amine secondaire du Tic, non réactive dans le test de Kaiser, est évaluée par le test qualitatif de Christensen.

*\* Confirmation du problème de solubilité de l'anhydride naphthalènedicarboxylique dans le DMF*

Le couplage de cet anhydride est réalisé dans un mélange DMF/DMSO 50/50, à 50°C, dans un volume supérieur à celui des autres milieux réactionnels car sa solubilité dans le DMF est nettement inférieure à celle des autres, soit S=63 µM contre 1,5 mM pour les autres.

Le rendement de couplage de cet anhydride est de 43 à 47 % en 30 min et de 49 à 69 % en 2 h.

*\* Etude de la réactivité des amines sur la fonction COOH*

L'activation dure 10 min avec un mélange HBTU/HOBT, en présence de DIEA. 0,95 éq. de chacune des 3 amines réagit et leur disparition est suivie par un test de Kaiser quantitatif. Au bout d'une heure, les rendements de disparition suivants sont obtenus :

- 50 % pour la benzylamine,
- 65 % pour le 1-amino-propan-2-ol,
- 85 % pour l'ester benzylique de l'α-méthyl alanine.

Le résultat de la disparition des amines est figure au tableau 15.

**Tableau 15 : Résultats du couplage des amines sur les 9 dimères différents**

Nom	temps (h)	Rdt Kaiser		Nom	temps (h)	Rdt Kaiser
Ala-succ-bzl	1	45		Thr-succ-apl	1	62
Ala-naph-bzl	1	39		Thr-naph-apl	1	62
Ala-tmg-bzl	1	44		Thr-tmg-Apl	1	67
Tic-succ-bzl	1	47		Ala-succ-aib	1	80
Tic-naph-bzl	1	53		Ala-naph-aib	1	88
Tic-tmg-bzl	1	52		Ala-tmg-aib	1	72
Thr-succ-bzl	1	42		Tic-succ-aib	1	84
Thr-naph-bzl	1	40		Tic-naph-aib	1	86
Thr-tmg-BbzI	1	52		Tic-tmg-aib	1	82
Ala-succ-apl	1	61		Thr-succ-aib	1	82
Ala-naph-apl	1	61		Thr-naph-aib	1	85
Ala-tmg-apl	1	65		Thr-tmg-aib	1	72
Tic-succ-apl	1	63				
Tic-naph-apl	1	62				
Tic-tmg-apl	1	68				



*\* Interprétation des résultats et recouplage des amines :*

Une heure de couplage est insuffisante même pour coupler 0,95 éq. d'amine, la facilité de couplage est telle que : Aib > Apl > Bzl. Un recouplage de chaque amine dans chacun des 27 tubes a eu lieu pendant 2h30. Le test du Kaiser quantitatif n'était plus applicable ici mais le test des acides carboxyliques immobilisé sur résine a été utilisé. Le résultat était négatif.

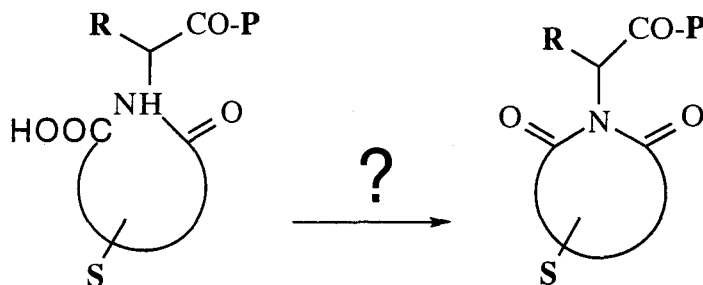
**II-3-2/ 27 produits synthétisés en mélange.**

Une bibliothèque de validation a été synthétisée en mélange, en analysant le brut réactionnel en électrophorèse capillaire, 25 pics différents ont été détectés. La sensibilité de la méthode analytique ne permet pas de conclure si les 26e et 27e attendus sont présents et non détectables ou s'ils sont absents du mélange. Le spectre de masse est donné en annexe.

**II-4/ La fermeture des produits acylés par des anhydrides peut-elle conduire à des imides ?**

Nous avons déjà envisagé la formation des imides lors de l'activation de la fonction acide (étape 3 du schéma 53). Il reste à savoir si à sec, sans activateur, les acylaminoacyl résines (ou « dimères ») peuvent se déshydrater et conduire à l'imide de l'acide comme le montre le schéma 60.

**Schéma 60 :** formation des imides



Dans la littérature, il est mentionné que cette cyclisation se produit favorablement avec les anhydrides de type maléïque<sup>55</sup> et phtalique<sup>56</sup>, en présence de bases et en chauffant. La réaction

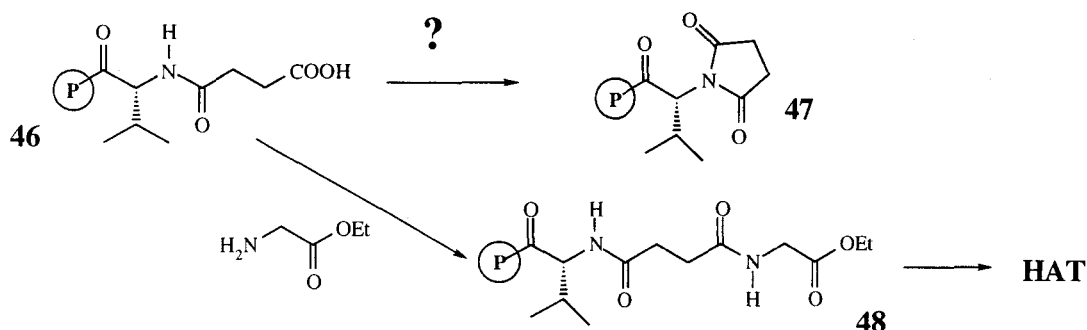
Dans la littérature, il est mentionné que cette cyclisation se produit favorablement avec les anhydrides de type maléique<sup>55</sup> et phtalique<sup>56</sup>, en présence de bases et en chauffant. La réaction dépend beaucoup de l'anhydride. D'autres synthèses de phtaloylaminoacides sont décrites<sup>57</sup>, mais ne sont pas transposables ici parce qu'elles impliquent l'utilisation du phtalimide de potassium.

#### II-4-1/ Principe de l'étude de stabilité

Le but de l'expérience est de savoir si cette cyclisation peut avoir lieu avec les dimères ancrés sur résine, lors de leur stockage. Pour cela des dimères de 2 types différents ont été préparés : une aminoacyl résine, la valine-O-Polymère a réagi avec deux anhydrides, l'anhydride succinique et l'anhydride exo-3,6-époxy-1,2,3,6-tétrahydrophthalique. Les produits obtenus sont présentés dans les schémas 61 et 62.

Les dimères ont été stockés à + 4°C et des analyses de la « disponibilité » de la fonction COOH ont été réalisées en activant la fonction carboxylique avec le mélange HBTU/HOBt et en couplant sur l'ester activé une amine qui est un ester d'acide aminé, l'ester éthylique de la glycine, comme le montre le schéma 61.

**Schéma 61 : Etude de stabilité du dimère succinylvaline-O-Polymère (46)**



#### II-4-2/ Résultats de la Succinyl-Valine-O-Polymère

Après hydrolyse acide totale, les aminoacides sont analysés par chromatographie HPLC après réaction avec la ninhydrine. Nous nous intéressons au rapport entre la valine et la glycine (les conditions acides hydrolysent son ester éthylique). Les résultats sont contenus dans le tableau 16.

**Tableau 16 :** Evolution du rapport entre la valine et la glycine

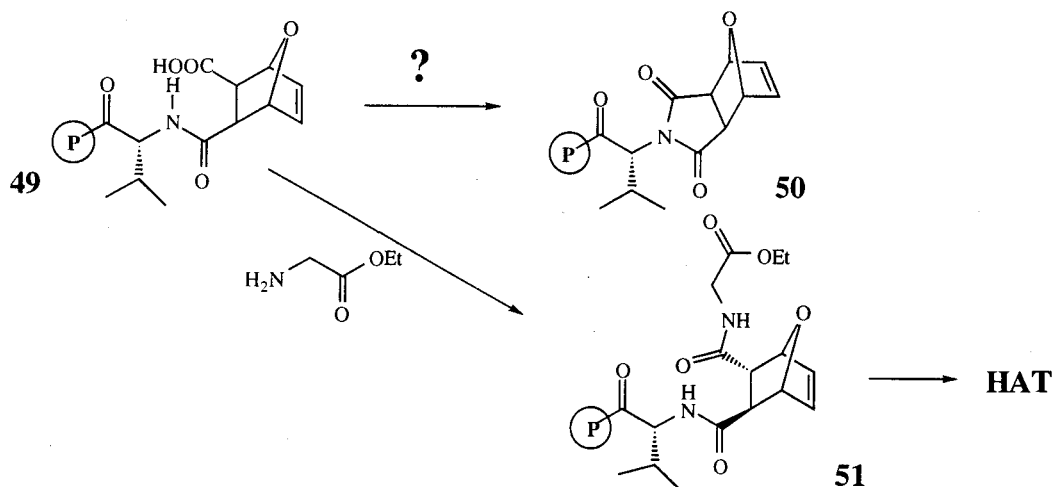
temps	valine	glycine	Val/Gly
j+13	30,59	29,25	1,04
j+26	35,48	29,27	1,21
j+111	31,28	19,56	1,59

Le rapport Val/Gly augmente au cours du temps, ce qui est en faveur d'une disparition des fonctions carboxyliques disponibles.

### II-4-3/ Autre étude en parallèle

Le schéma 62 présente le principe de l'étude de stabilité du dimère obtenu entre l'anhydride exo-3,6-époxy-1,2,3,6-tétrahydrophthalique et la valine-O-Polymère et qui suit exactement le même principe. Les résultats sont contenus dans le tableau 17.

**Schéma 62 :** Etude de la stabilité de l'exoépoxytétrahydrophthalylvaline-O-Polymère (49)



**Tableau 17 :** Evolution du rapport entre la valine et la glycine

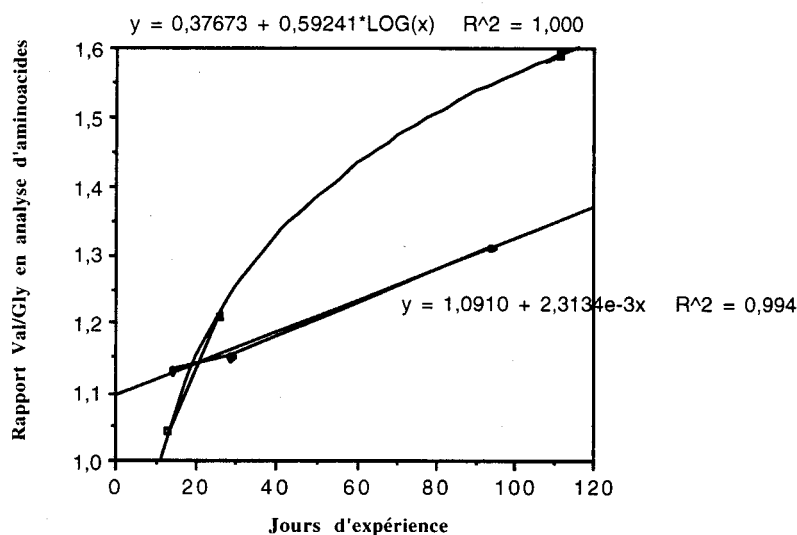
Produit n°	Valine	Glycine	Val/Gly
j+14	32,86	29,07	1,13
j+29	37,99	32,94	1,15
j+94	36,47	27,92	1,31

Là aussi, le rapport Val/Gly augmente au cours du temps et témoigne d'une disparition des fonctions carboxyliques.

#### II-4-4/ Bilan de l'étude de stabilité

Deux courbes expriment l'évolution de ce rapport en fonction du temps. Elles montrent que, dans les deux cas, le rapport Valine/Glycine évolue dans le sens d'une disparition des fonctions carboxyliques réactives au cours du stockage. Pour la succinyl-valine-O-Polymère (46), la fonction qui s'en approche est de type logarithmique, alors que pour l'exoépoxytétrahydrophthalyl-valine-O-Polymère (48), elle est plutôt de type linéaire.

Schéma 63 : Rapport valine/glycine en analyse d'acides aminés



#### II-5/ Conclusions de cette étude préliminaire

Les conditions expérimentales appliquées à la synthèse de la bibliothèque découlent des résultats obtenus au cours de cette étude.

1/ L'étude de la réactivité des anhydrides et la bibliothèque de validation ont permis d'obtenir de bons rendements, toujours améliorés par un deuxième couplage. Pour l'étape 2, les anhydrides seront donc couplés deux fois, en excès par rapport à la résine.

2/ L'étude de réactivité des amines et de la bibliothèque de validation ont montré que les esters activés par action du mélange HBTU/HOBt (1/1) dans le DMF étaient de bons électrophiles : les amines réagissent et la seconde liaison amide se forme avec de bons rendements. Ce mélange sera utilisé à l'étape 3 (schéma 53) dans les mêmes conditions.

3/ L'étude de la réactivité des amines a montré une différence entre les amines secondaires et les primaires. Pour l'étape 4 de la synthèse, les amines seront donc couplées en fonction de leur nucléophilie. Les amines secondaires réagiront d'abord, en défaut par rapport à l'ester activé et pendant 2h30. Les amines primaires réagiront ensuite, pour occuper le reste des sites électrophiles pendant 1h30. Un recouplage est prévu toute la nuit avec l'ensemble des amines.

4/ Pour l'étape 5 qui correspond à la coupure par l'acide fluorhydrique et l'obtention du trimère en solution, le mélange acide acétique/DMF a donné de meilleurs résultats et sera utilisé comme solvant de lyophilisation.

5/ L'étude de stabilité des dimères a montré une relative instabilité des dimères lors de leur stockage. Nous allons faire réagir les dimères rapidement sur les mélanges d'amines pour éviter une diminution des fonctions réactives.

### **III/ NOMENCLATURE ET DIVERSITE DE LA BIBLIOTHEQUE :**

La bibliothèque LYN a été conçue en tenant compte des résultats de l'étude préliminaire. Nous avons respecté nos prévisions et choisi d'utiliser les effectifs suivants :

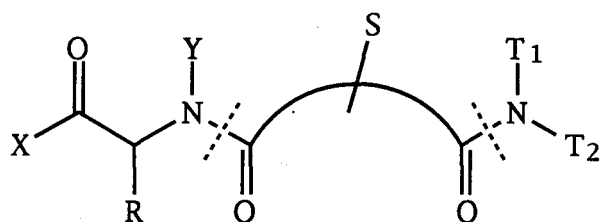
- en première position : 20 aminoacides
- en position intermédiaire : 12 anhydrides cycliques
- en position terminale : 81 amines, primaires ou secondaires. Le nombre d'amines disponibles commercialement est très grand, 105 ont été choisies en fonction de leur diversité et de leur réactivité, achetées puis modélisées pour sélectionner 81 amines les plus diverses possibles.

### III-1/ Schéma de la diversité

Le nombre total de produits potentiellement synthétisables est de  $20 \times 12 \times 81 = 19440$ .

La bibliothèque a été scindée en sous-bibliothèques (ou lots) dont la taille est adaptée au criblage. Nous avons décidé qu'un lot contiendrait toujours un même « dimère », constitué d'un aminoacide et d'un anhydride, sur lequel 81 amines seraient couplées en mélange, comme le décrit le schéma 64. Il y a  $20 \times 12 = 240$  lots.

Schéma 64: Un lot combinatoire



Sens de la synthèse

Aminoacide	Anhydride	Amine 1 Amine 2 Amine 3 ..... ..... Amine 81
1	1	81 amines différentes à chaque lot
1 dimère		81 produits par lot

Il s'agit d'une bibliothèque qu'on peut qualifier de « semi-combinatoire » puisqu'un lot possède un enchaînement commun, appelé « dimère ». L'étape « combinatoire » à proprement parler n'intervient que lors du couplage des amines (l'étape 4 du schéma 53). La bibliothèque est donc différente des bibliothèques orthogonales où un mélange de synthons était incorporé à chaque position. Dans ce cas là, chaque étape était combinatoire.

### III-2/ Nomenclature

Nous adoptons, pour la synthèse, la nomenclature suivante :

- Les aminoacides sont notés *A, B, C, D...* au total 20 lettres jusqu'à *U*, le *O* est exclu pour éviter toute confusion avec le « O » employé lors de la déconvolution et qui symbolise une position fixée connue (cf : Ch I, § II-1-2).
- Les anhydrides sont notés *a, b, c, d...* au total 12 lettres jusqu'à *l*.
- Les amines n'ont pas de désignation pour les lots destinés au criblage.

*La nomenclature respecte le sens de la synthèse.* Par exemple le lot *Ab* contient l'acide aminé *A*, l'anhydride *b*, et les 81 amines comme le montre le schéma 64.

Nous synthétisons **240 lots** ( $20 \times 12 = 240$ ), contenant chacun **81 produits**.

Nous décidons qu'environ 20 mg de chaque lot seront fournis au criblage.

## IV/ CHOIX DES SYNTHONS

### IV-1/ Choix des aminoacides

Les aminoacides ont été choisis en fonction de la diversité de leur chaîne latérale et de leur capacité de donner des interactions fortes et variées avec les macromolécules biologiques. Dans le tableau 18 figurent des aminoacides de chiralité D possédant des chaînes latérales à fonctions ionisables, à fonctions polaires non chargées, à noyaux aromatiques, à chaînes aliphatiques ou à squelettes dits « exotiques », c'est-à-dire non naturels.

#### *IV-1-1/ Choix de la résine qui les supporte*

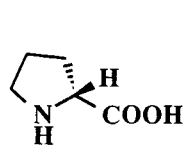
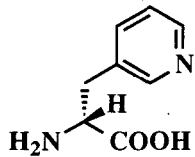
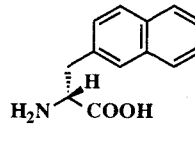
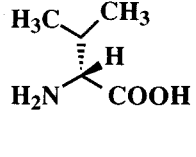
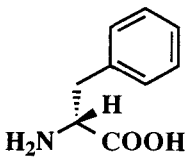
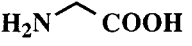
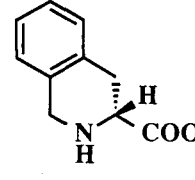
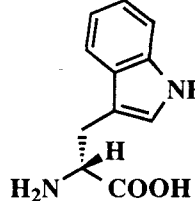
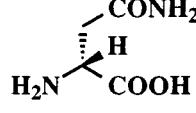
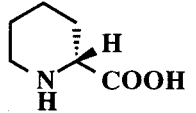
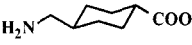

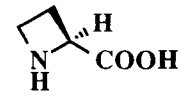
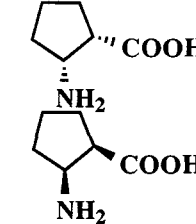
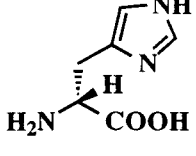
Nous projetons d'utiliser deux types de résines : la résine de Merrifield et la résine MBHA.

La résine de Merrifield possède l'avantage d'être d'un prix peu élevé et de générer une fonction acide carboxylique après la coupure à l'acide fluorhydrique. Sa fonctionnalisation par un aminoacide et le contrôle analytique de cette opération ont cependant l'inconvénient d'être longs.

En revanche, la résine MBHA est rapide à synthétiser mais elle est cinq fois plus chère que la résine de Merrifield. Cette fois, un carboxamide primaire est libéré après HF.

Nous choisissons les deux résines pour cette raison : certains lots de la bibliothèque porteront des fonctions carboxyliques ionisables, d'autres des fonctions carboxamides polaires. C'est un élément de diversité apporté lors de la coupure HF.

**Tableau 18 :** formule des aminoacides sélectionnés

A/ D-proline H-DPro-OH	B/ D-3'- pyridylalanine H-DPya-OH	C/ D-2'- naphthylalanine H-DNaa-OH	D/ D-valine H-DVal-OH	E/ D-phényl alanine H-DPhe-OH
				
F/ glycine H-Gly -OH	G/ acide D- tétrahydroiso quinoléine carboxylique H-DTic-OH	H/ D-tryptophane H-Trp-OH	I/ D-asparagine H-Asn-NH <sub>2</sub>	J/ acide D- pipécolinique H-Pip-OH
				
K/ acide 4- aminométhyl cyclohexane carboxylique H-Amc-OH	L/ acide 1- aminocyclopentane- 1-carboxylique H-Ucp-OH	M/ acide L- azétidine carboxylique H-LAzt-OH	N/ acide L/D-2- amino cyclopropane carboxylique H-L/DDcp-OH	P/ D-histidine H-DHis-OH
				



**Tableau 18 (suite) : formules des aminoacides sélectionnés**

Q/ D-lysine H-DLys-NH <sub>2</sub>	R/ D-serine H-DSer-NH <sub>2</sub>	S/ acide D- glutamique H-D-Glu-NH <sub>2</sub>	T/ D-arginine H-Arg-NH <sub>2</sub>	U/ acide D- aspartique H-DAsp-NH <sub>2</sub>

#### IV-1-2/ Choix des protections des chaînes latérales

Voici les aminoacides nécessitant une protection de leur chaîne latérale :

*I/ l'asparagine, P/ l'histidine, Q/ la lysine, R/ la sérine, S/ l'acide glutamique, T/ l'arginine, U/ l'acide aspartique.*

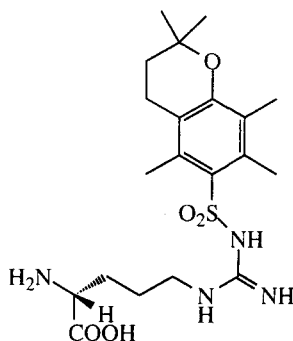
Nous choisissons la protection « tertibutyle », clivable en milieu acide. Un mélange de TFA et de pièges à carbocations sera utilisé pour cette déprotection avant la coupure HF. Une protection temporaire, dite « orthogonale », est nécessaire pour les fonctions amines des aminoacides. Le fluorèneméthylèneoxycarbonyl (Fmoc), labile dans un mélange pipéridine/NMP (20/80) est utilisé.

Les aminoacides, de type « Fmoc-AA(tBu)-OH », sont couplés sur la résine MBHA car la protection Fmoc est labile dans les conditions de la fixation de l'acide aminé sur la résine de Merrifield. En effet, si nous avons utilisé cette résine, un sel de césium de l'acide aminé obtenu par action du carbonate de césium sur l'acide aminé aurait été utilisé, mais dans notre cas, la solution de carbonate aurait été assez basique pour hydrolyser la protection Fmoc. Les « Fmoc-AA(tBu)-OH » sont donc fixés sur la résine MBHA à l'aide des activateurs HBTU et HOBT et dans ces conditions, le Fmoc est stable.

Pour le cas de l'asparagine, la protection trityle est utilisée pour améliorer la solubilité de son sel de césium, le trityle (triphénylméthane) est labile aussi en milieu acide et sera clivé avant la coupure HF.

Dans le cas de l'arginine, la protection Pmc est utilisée. Il s'agit du 2,2,5,7,8-pentaméthylchroman-6-sulfonyle de la guanidine comme le montre le schéma 65, qui est également labile en milieu acide.

**Schéma 65** : *H-Arg(Pmc)-OH*



Fmoc-DHis(tBoc)-OH, Fmoc-DLys(tBoc)-OH, Fmoc-DSer(OtBu)-OH, Fmoc-DGlu(OtBu)-OH, Fmoc-DArg(Pmc)-OH et Fmoc-DAsp(OtBu)-OH ont donc été achetés et greffés sur la résine MBHA.

En revanche, les aminoacides ne nécessitant pas de protections de leur chaîne latérale, de type « tBoc-AA-OH » sont couplés sur la résine de Merrifield. La protection Boc n'est pas labile dans les conditions de fixation à la résine.

#### IV-2/ Choix des anhydrides cycliques (tableau 19)

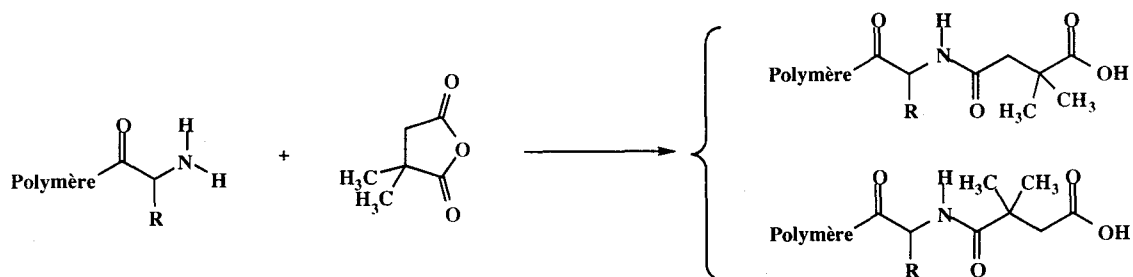
Les anhydrides ont été choisis pour leur diversité, le tableau 19 rassemble des anhydrides portant des cycles à 5, à 6 ou à 7 chaînons, aliphatiques ou aromatiques, symétriques ou non.

**Tableau 19** : Les 12 anhydrides choisis

a/ diglycolique	b/ phtalique	c/ cis-cyclohexane-1,2-dicarboxylique	d/ 2,2-diméthyl succinique
e/ 2-phénylglutarique	f/ 2,3-pyridine dicarboxylique	g/ homophtalique	h/ 3-nitrophtalique
i/ exo-3,6-époxy-1,2,3,6-tétrahydro phtalique	j/ biphénique	k/ 3,3-tétraméthylène glutarique	l/ 3,6-difluorophtalique

Lorsqu'une amine ouvre un anhydride asymétrique, le plus souvent 2 régioisomères sont obtenus, comme le montre le schéma 66 sur un exemple précis.

**Schéma 66** : Exemple de l'ouverture d'un anhydride asymétrique par une aminoacyl résine, application à l'anhydride 2,2-diméthylsuccinique



L'obtention potentielle de deux régioisomères est une bonne raison pour choisir les anhydrides cycliques asymétriques dans notre recrutement. Il n'y aura pas de séparation des 2 isomères de

position obtenus, ceci est une source de diversité à l'intérieur d'un lot combinatoire. Il y a potentiellement le double de produits par lot synthétisé à partir d'un anhydride asymétrique. Le problème de la régioisomérisie sera abordé uniquement si une activité positive est détectée dans un tel lot.

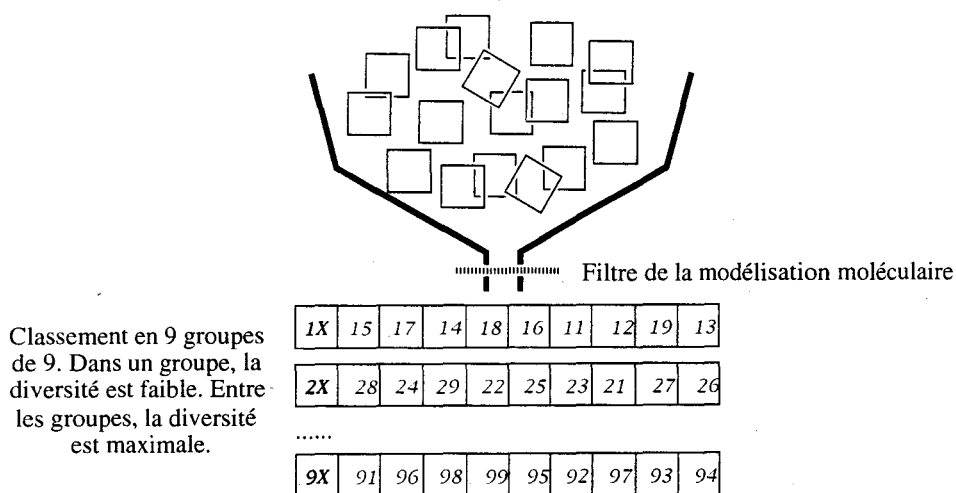
### IV-3/ Choix des amines

Un mélange de 81 amines, primaires ou secondaires, est couplé sur le dimère activé selon l'étape 4 du schéma 53. Ces amines ont été choisies d'une façon rationnelle et nous appliquons le principe de la répartition orthogonale. Elles ont été classées dans une matrice si bien que si un lot positif apparaît lors du criblage primaire, le criblage secondaire et le croisement de deux lots de taille inférieure permet l'identification rapide de l'amine responsable de l'activité.

#### IV-3-1/ Modélisation des amines

105 amines les plus diverses possibles et susceptibles de réagir sur la fonction acide immobilisée, disponibles au laboratoire, ont fait l'objet d'une étude de modélisation moléculaire. 81 amines, soit 9 groupes de 9 amines, ont été effectivement choisies pour la synthèse de la bibliothèque de telle sorte que la similitude soit maximale dans un groupe donné et la dissemblance soit maximale entre les groupes.

Schéma 67 : Modélisation moléculaire et création des groupes horizontaux



## Déroulement de l'étude :

Un calcul de dynamique moléculaire a été effectué sur les 105 amines.

Trois éléments sont importants pour réaliser une étude de dynamique moléculaire :

1/ Il faut trouver des descripteurs adaptés

2/ Il faut savoir calculer des « distances » entre les amines

3/ Il faut enfin être capable de grouper les amines en fonction des résultats obtenus.

### *1/ Les descripteurs :*

Chaque amine est assimilée à une forme asymétrique rassemblée autour d'un atome d'azote (schéma 68). 101 conformations ont été considérées pour chaque amine. Un ensemble de 10 sphères centrées sur l'azote et de rayon croissant de 1 à 10 Angströms est étudié à chaque cycle de dynamique moléculaire.

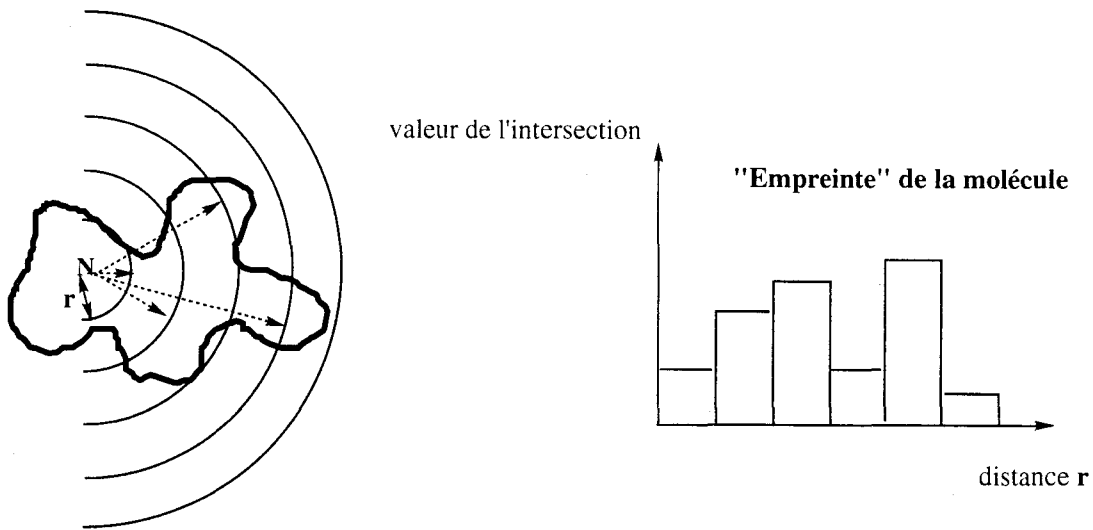
L'aire totale  $S$ , intersection entre la molécule et une des sphères de rayon  $r$  est formée par tous les points de cette sphère situés à une distance inférieure au rayon de Van der Waals d'un noyau atomique. Cette aire, évaluée en fonction de la distance à l'atome d'azote, est une bonne description de la forme moléculaire, c'est-à-dire de la façon dont les molécules remplissent l'espace.

Pour tenir compte de la distribution des charges à l'intérieur des molécules, nous avons pondéré la valeur de ces aires par le potentiel exercé par toutes les charges des atomes situés sur la sphère de rayon  $r$ .

Nous employons la valeur absolue de ces potentiels de telle sorte que la formule obtenue reflète aussi le degré de séparation des charges et pour éviter que les charges de signes opposés ne s'annulent à longue distance.

Les algorithmes obtenus permettent l'obtention d'« empreintes » des molécules en fonction de la distance  $r$  (schéma 68) et définissent également les coordonnées de vecteurs qui symbolisent chaque amine.

**Schéma 68** : Principe de l'étude de dynamique moléculaire, les descripteurs



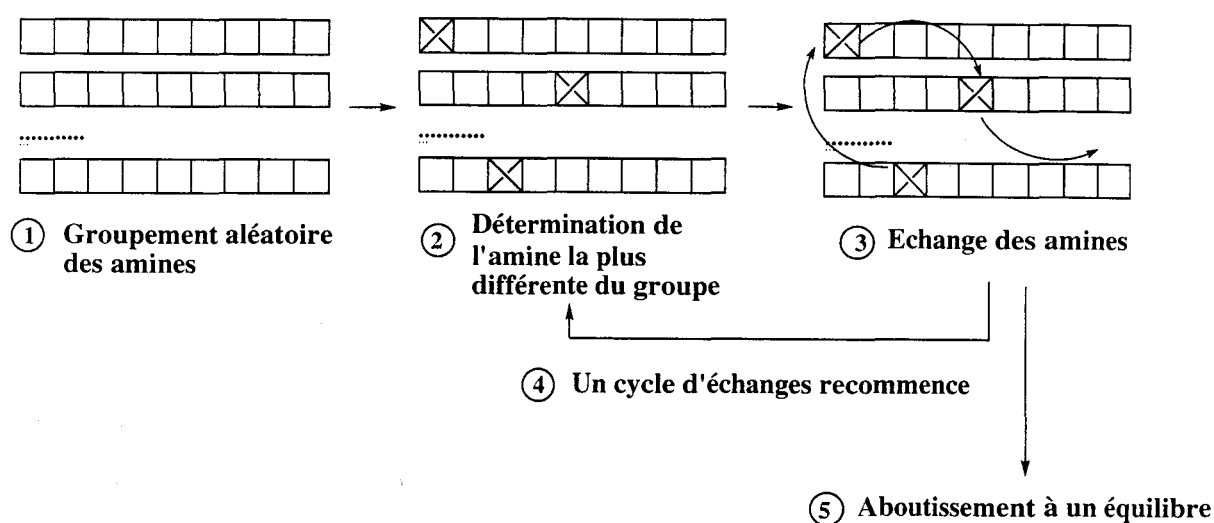
**2/ Comment calculer la similitude entre deux « empreintes » ?**

Mathématiquement, il s'agit d'une minimisation de la somme des distances entre les vecteurs dont les coordonnées sont définies par les paramètres de distance et de potentiel électrostatique obtenus au 1/.

**3/ Comment grouper les amines ?**

Les amines sont d'abord groupées de façon aléatoire. Le but est d'obtenir des groupes contenant des amines d'empreintes similaires. Des échanges entre les groupes sont effectués pour optimiser leur composition : les amines sont échangées jusqu'à obtention d'un équilibre comme le montre le schéma 69.

**Schéma 69** : Principe de la constitution des groupes d'amines



Cela permet de grouper définitivement les 105 molécules en 9 groupes de 9 amines, 24 trop différentes restent « ingroupables ». A l'intérieur des groupes, les molécules sont semblables, alors qu'entre les groupes, la diversité est maximale.

#### IV-3-2/ Groupement orthogonal

##### Horizontalement :

Les 9 listes d'amines où *la diversité interne est faible* ont été symbolisées comme le montre le schéma 67, par un alignement de ces cubes numérotés : chaque « ligne » représente un groupe de 9 amines, un groupe d'amines primaires aliphatiques, un groupe d'anilines, un groupe d'amines secondaires cycliques... La diversité entre les groupes est donc importante.

##### Verticalement :

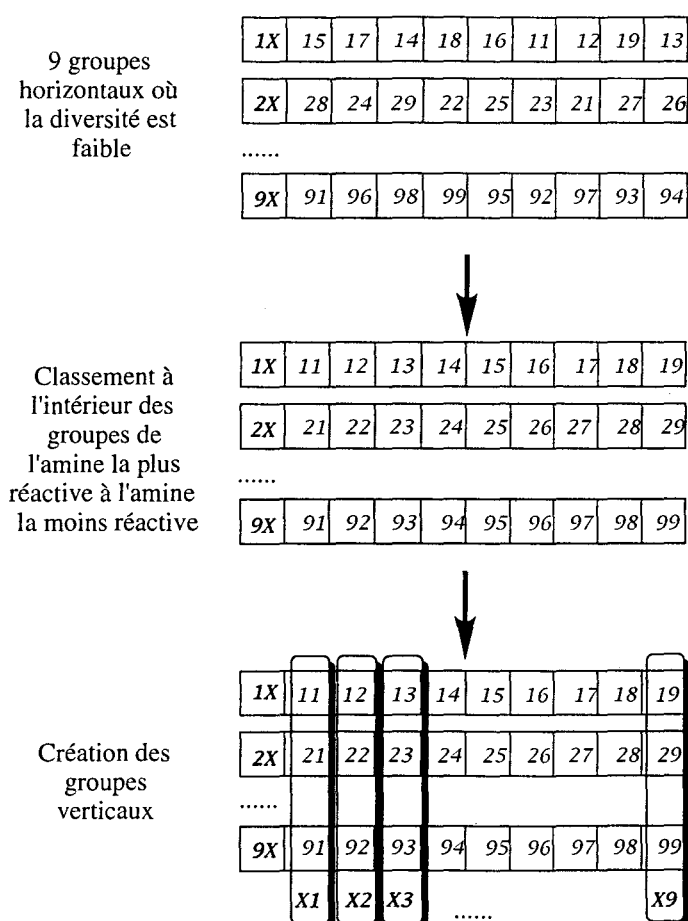
Nous avons décidé d'organiser *ces mêmes amines* d'une autre façon, dite « orthogonale ». Nous avons déplacé, échangé, les amines au sein de leur groupe horizontal comme le montre le schéma 70.

Nous plaçons les amines connues pour être les plus nucléophiles à gauche et les moins nucléophiles à droite. Ainsi, de gauche à droite, nous classons dans un ordre décroissant de réactivité : on passe de l'amine la plus réactive du groupe à gauche à la moins réactive du groupe

à droite. Par conséquent, dans la colonne la plus à gauche, sont groupées les amines les plus nucléophiles de leur groupe, alors que dans la colonne la plus à droite, se trouvent les amines les moins nucléophiles.

Il suffit maintenant de lire le tableau verticalement. A l'intérieur des groupes verticaux, la diversité est donc maximale, alors qu'entre les groupes la diversité est faible : tous les groupes verticaux se « ressemblent », ils contiennent chacun une amine primaire aliphatique, une arylamine, une amine secondaire contrainte dans un cycle...

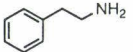
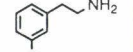
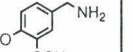
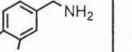
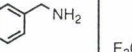
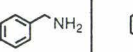
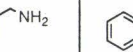
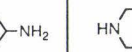

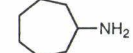
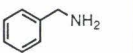
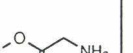
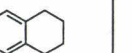

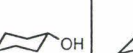
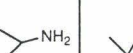


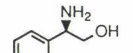
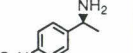
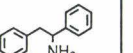
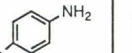
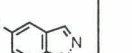
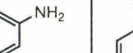


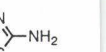
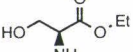
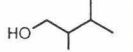
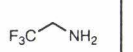

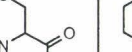
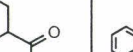
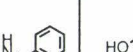
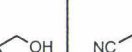

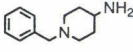
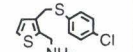
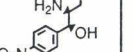
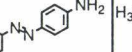
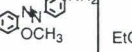
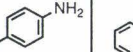



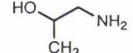
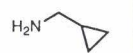
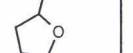
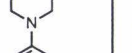
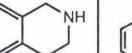
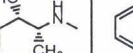
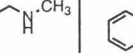
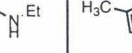
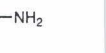
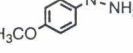
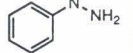
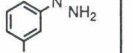
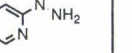
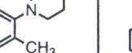
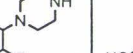



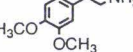
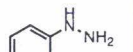
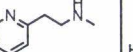
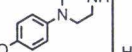
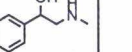
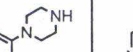
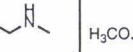

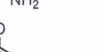
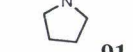
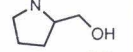
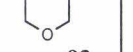
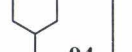
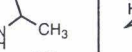

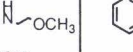


**Schéma 70 : Création des groupes verticaux**



La diversité des groupes peut se résumer dans le tableau 20. Pour les groupes horizontaux, la diversité à l'intérieur d'un groupe est faible, la diversité entre les groupes est grande, pour les groupes verticaux, c'est l'inverse : la diversité à l'intérieur d'un groupe est grande, la diversité entre les groupes est faible.



Schéma 71 : Formules des 81 amines

 11	 12	 13	 14	 15	 16	 17	 18	 19
 21	 22	 23	 24	 25	 26	 27	 28	 29
 31	 32	 33	 34	 35	 36	 37	 38	 39
 41	 42	 43	 44	 45	 46	 47	 48	 49
 51	 52	 53	 54	 55	 56	 57	 58	 59
 61	 62	 63	 64	 65	 66	 67	 68	 69
 71	 72	 73	 74	 75	 76	 77	 78	 79
 81	 82	 83	 84	 85	 86	 87	 88	 89
 91	 92	 93	 94	 95	 96	 97	 98	 99

**Tableau 20** : Intensité de la diversité selon les groupes d'amines

Groupes d'amines	Diversité intra-groupes	Diversité inter-groupes
Horizontaux	faible	<b>grande</b>
Verticaux	<b>grande</b>	faible

Sur le schéma 72, qui symbolise « l'échiquier » des amines obtenu (schéma 71), tout groupe vertical partage une et une seule amine avec tout groupe horizontal, *les deux répartitions sont dites orthogonales*.

**Schéma 71** : l'échiquier des 81 amines ci-contre

**Schéma 72** : Symbolisation de cet échiquier

	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9
1X	11	12	13	14	15	16	17	18	19
2X	21	22	23	24	25	26	27	28	29
3X	31	32	33	34	35	36	37	38	39
4X	41	42	43	44	45	46	47	48	49
5X	51	52	53	54	55	56	57	58	59
6X	61	62	63	64	65	66	67	68	69
7X	71	72	73	74	75	76	77	78	79
8X	81	82	83	84	85	86	87	88	89
9X	91	92	93	94	95	96	97	98	99

Le groupe horizontal 4X contient les amines de 41, 42 jusqu'à 49. Le groupe vertical X3 contient les amines 13, 23 jusqu'à 93. Ce sont les mêmes 81 amines, mais réparties de 2 façons différentes, par exemple, l'amine 43 se trouve à la fois dans le groupe horizontal « 4X » et dans le groupe vertical « X3 ». Nous appliquons le concept de l'orthogonalité défini au chapitre 2 à la seule position combinatoire de la bibliothèque.

### IV-3-3/ Suite de la nomenclature et conséquence sur les déconvolutions

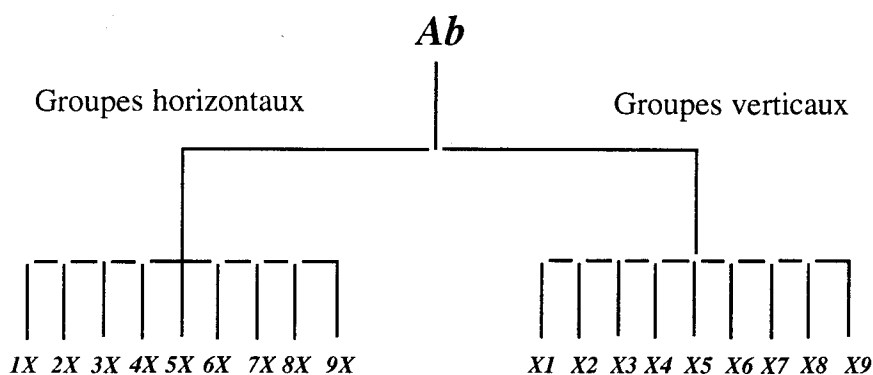
Chaque amine est désignée par un couple de 2 chiffres  $ij$ , par exemple, l'amine **43**. Un produit unique de la bibliothèque est appelé **Ab ij**.

Quand un lot **Ab** est actif lors d'un criblage primaire, la déconvolution est réalisée ainsi :

le dimère **Ab** est resynthétisé, séparé en 18 parties et couplé d'une part avec les 9 groupes d'amines dites horizontales, par exemple : **Ab 1X**, **Ab 2X**... jusqu'à **Ab 9X**.

La deuxième partie de la déconvolution est réalisée en couplant d'autre part le dimère **Ab** avec les 9 autres groupes d'amines verticales, par exemple : **Ab X1**, **Ab X2**... jusqu'à **Ab X9** comme le montre le schéma 73.

**Schéma 73** : Organisation de la déconvolution et création des lots d'effectif plus petit



Les lots destinés à la déconvolution sont d'une taille inférieure à celle des lots soumis au criblage primaire puisqu'il s'agit ici de mélanges de 9 produits et non plus de 81.

Il suffit de relever le nom des lots où une activité est encore détectée, par exemple sur le schéma 70, **Ab 4X** et **Ab X3**, de croiser **4X** et **X3**, l'amine **43** est obtenue. Le produit responsable de l'activité du lot **Ab** est **Ab 43**.

### IV-4/ Conclusion

Nous avons choisi des synthons les plus divers possibles. La répartition des amines se base sur la technique dite « orthogonale » développée au chapitre 2, mais adaptée à cette bibliothèque

puisque cette répartition ne s'applique pas *a priori* sur les lots à tester mais sur des lots de taille inférieure destinés à la déconvolution.

La bibliothèque possède, dans chaque lot, un pharmacophore commun appelé le « dimère », contrairement à la première bibliothèque où les produits d'un même lot étaient très différents.

Ici, des cumuls d'activité ou « continuum » sont possibles.

## V/ SYNTHÈSE ET RESULTATS

### V-1/ Synthèse combinatoire de la bibliothèque LYN

#### *V-1-1/ Rappel du principe de la synthèse*

La synthèse sera faite en couplant un anhydride sur une aminoacyl résine. Un dimère dit « **Ab** », de composition connue est alors obtenu. Un mélange de 81 amines réagit ensuite sur chaque dimère.

#### *V-1-2/ Logistique de synthèse et mise en place du travail*

Pour synthétiser une bibliothèque combinatoire de 19440 produits comme celle-ci, il faut absolument planifier et organiser le travail avant de commencer les manipulations et être très rigoureux dans l'ensemble des manipulations .

Nous planifions la synthèse de la façon suivante :

240 lots sont à synthétiser. Nous choisissons de diviser notre bibliothèque en trois parties. Chaque partie correspondra à la synthèse de 80 lots, c'est-à-dire le résultat du croisement de 20 aminoacides avec 4 anhydrides pour conduire à 80 dimères. Chaque lot contiendra 81 produits issus du croisement d'un dimère donné avec 81 amines.

Au début de chaque partie, nous groupons la préparation de toutes les combinaisons de dimères sur deux semaines. Il s'agit des étapes 1 et 2 du schéma 53. La formation des dimères dure 8 jours et leur stockage est limité à 15 jours maximum.

En pratique, sur une journée, un anhydride réagit sur 10 aminoacyl résines. Nous utilisons des réacteurs de verre, munis d'un fritté, d'un bouchon et d'un robinet, d'une capacité de 25 ml, comme ceux classiquement utilisés en synthèse en phase solide manuelle. La disparition des amines primaires est évaluée par le test de Kaiser et celle des amines secondaires par le test de Christensen.

Les 80 dimères sont alors obtenus. En une journée, le croisement de 81 amines avec les 20 dimères permet d'accéder à 20 lots combinatoires, il s'agit des étapes 3 et 4 du schéma 53. Nous utilisons cette fois des seringues d'une capacité de 5 ml, munies d'un verre fritté et d'un piston. Les solutés à coupler sont aspirés par une aiguille. Le choix des seringues plutôt que des réacteurs est justifié par le volume moins grand qu'elles occupent et la facilité d'aspirer les réactifs si on veut traiter 20 milieux réactionnels en parallèle.

Les 81 amines sont séparées en deux, d'un côté, les amines primaires et de l'autre les amines secondaires. Les expériences préliminaires ont montré que les amines secondaires se couplent beaucoup moins bien que les amines primaires.

*Les amines secondaires (44 au total) seront mélangées et présentées en premier aux sites électrophiles, dans les conditions suivantes :*

- nous appliquons une stoechiométrie par défaut, soit  $(44/81) \times 0,9$  équ. par rapport à la résine, ce qui permet de laisser des sites disponibles pour les amines primaires qui seront couplées ensuite.

- le couplage dure 2h30.

*Les amines primaires, quant à elles (37 au total), seront couplées en mélange dans un deuxième temps, dans les conditions suivantes :*

- nous appliquons aussi une stoechiométrie par défaut, soit  $(37/81) \times 0,9$  équ. par rapport à la résine, ce qui permet aux amines primaires de réagir sur les sites électrophiles restant. Si leur couplage est total, il restera encore 0,1 équ. des sites électrophiles libres pour un troisième couplage.

- le couplage dure 1h30.

*Un troisième couplage est prévu. Cette fois, les 81 amines sont mélangées. Elles ont alors toutes leurs chances sur les sites qui théoriquement sont encore libres, soit 0,1 équ. par rapport à la résine.*

- la stoechiométrie employée est de 0,9 éq. soit un excès de 0,8 éq. par rapport à la résine ( $0,8/0,9 \times 100 = 88\%$  d'excès).

- le couplage dure toute une nuit.

Une partie de bibliothèque est donc synthétisée en 3 semaines environ (son déroulement est détaillé en partie expérimentale).

### ***V-1-3/ Traitement par l'acide fluorhydrique***

Pour les coupures à l'acide fluorhydrique (étape 5 du schéma 53), nous ne disposions que d'un « multiposte » de 6 coupures HF en parallèle. Sur une journée, une ou deux utilisation(s) du multiposte pouvaient être réalisées (il faut en effet compter le temps passé à la déprotection de la résine avant la coupure et aux solubilisations avant de lyophiliser). 2 à 3 semaines auraient été nécessaires aux coupures HF. Une « partie » de bibliothèque aurait alors nécessité deux mois de travail.

Nous avons décidé d'améliorer cette étape limitante en concevant un multiposte de 24 coupures HF en parallèle. Le clivage des résines a pris à 4 jours en moyenne, un temps important a été gagné à ce niveau.

La bibliothèque a nécessité au total 10 mois de travail : 4 mois pour la conception et l'évaluation préliminaire et 6 mois pour la synthèse.

## **V-2/ Résultats**

### ***Contrôle de la production***

Le contrôle HPLC d'un mélange combinatoire *a posteriori* ne peut pas nous renseigner sur la pureté des produits qui le composent. Le contrôle de la production de la bibliothèque a eu lieu *en cours de synthèse* et s'est basé sur la disparition de fonctions réactives immobilisées : d'abord, la disparition des fonctions amines de l'acide aminé a été évaluée par le test de Kaiser ou de Christensen, ensuite la disparition des fonctions acides carboxyliques a été visualisée par le test colorimétrique des COOH détaillé plus haut (cf § II-2-3).

		Y	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
		Anhydride	Diglycolique	Phtalique	Cis-cyclohexane-1,2-dicarboxylique	2,2-diméthylsuccinique	2-phénylglutarique	2,3-pyridine dicarboxylique	Homophtalique	3-nitrophtalique	Exo-3,6-époxy 1,2,3,6-tétrahydro phtalique	Biphénique	3,3-tétraméthylène glutarique	3,6-difluoro phtalique
X	Acide-aminé	PM (g/mol)	116,1	148,1	154,2	128,1	190,2	149,1	162,1	193,1	166,1	224,2	168,2	184,1
A	Boc-D Pro-OR	115	102,5	63,8	85,8	97,5	85,1	84,2	77,6	82,1	89,9	89,5	86,8	88,1
B	Boc-D Pys-OR	167	103,4	74,9	102,3	99,9	78,6	81,5	77,6	79,0	85,7	88,1	70,5	89,2
C	Boc-D Naa-OR	217	102,6	81,4	93,1	87,0	83,3	78,0	79,9	79,0	87,8	92,4	74,7	88,2
D	Boc-D Val-OR	117	103,3	88,9	110,4	91,7	84,1	79,1	78,7	78,2	84,7	83,9	77,6	79,5
E	Boc-D Phe-OR	165	101,1	96,5	97,8	93,6	81,0	80,9	80,6	71,5	89,1	82,5	85,1	81,3
F	Boc-Gly-OR	75	100,7	81,9	116,3	93,0	81,1	80,0	80,3	79,4	87,2	84,5	86,5	78,9
G	Boc-D Tic-OR	177	85,0	74,1	97,0	89,1	83,1	77,2	78,7	81,0	86,0	79,8	79,3	81,4
H	Fmoc-D Trp-OR	204	100,2	79,6	91,2	100,1	80,4	79,2	78,5	75,8	96,7	89,3	80,3	73,2
I	Boc-D Asn(Trt)-OR	132	94,8	76,6	78,8	85,5	74,4	64,1	74,7	68,4	72,6	70,2	74,0	66,1
J	Boc-D PIP-OR	129	74,3	72,9	69,7	82,0	80,3	81,3	79,0	79,8	78,8	79,3	90,8	80,5
K	Boc-Amp-OR	157	94,9	79,2	107,1	97,1	81,8	81,4	81,0	79,1	83,7	87,3	84,6	73,8
L	Boc-D Ucp-OR	129	95,5	80,2	101,1	103,2	79,2	80,1	71,8	75,3	91,9	80,1	94,0	73,2
M	Boc-L Azi-OR	101	88,6	83,3	93,0	97,3	83,3	79,7	80,9	80,9	86,8	85,3	85,5	65,9
N	Boc-D/L Dcp-OR	129	91,6	78,7	89,7	103,9	85,8	81,3	79,0	75,7	90,8	82,6	90,6	83,3
P	Fmoc-D His(Boc)-OR	155	87,9	88,8	91,1	90,0	84,6	74,4	71,0	70,5	78,2	77,6	68,4	64,0
Q	Fmoc-D Lys(Boc)-OR	146	83,8	80,6	108,1	110,7	81,6	77,1	76,1	73,5	89,7	80,2	67,3	66,0
R	Fmoc-D Ser(tBu)-OR	105	94,5	85,8	89,8	95,9	75,8	74,1	73,4	67,2	79,3	82,0	73,8	79,0
S	Fmoc-D Glu(OtBu)-OR	147	77,2	77,5	90,5	89,4	73,6	71,1	76,4	68,3	81,4	78,9	71,9	68,7
T	Fmoc-D Arg(Fmoc)-OR	174	79,7	75,7	91,8	98,1	72,1	66,3	67,0	65,2	71,0	66,3	71,5	55,7
U	Fmoc-D Asp(OtBu)-OR	133	84,3	85,2	92,7	85,7	64,6	74,4	77,3	75,3	70,7	58,7	59,6	62,1

Tableau 11 : Rendements avant coupure HF



### V-2-1/ Formation des dimères et nouvelles charges des résines

Sur la base d'un test de Kaiser ou de Christensen négatif, on admet que le couplage de l'anhydride est complet et que le rendement est de 100%, cela nous permet de calculer les nouvelles charges des résines fonctionnalisées en mmol/g.

*Nouvelle charge :*

L'aminoacyl résine protégée a une charge de  $x$  mmol/g.

$$\text{Nouvelle charge en mmol/g } x' = 1/(x + (MM_{\text{Anh}} \times 10^{-3}) - (MM_{\text{protection (tBoc ou Fmoc)}} \times 10^{-3}))$$

### V-2-2/ Résultats avant coupure HF (tableau 21, ci-contre)

Ci-contre, figurent les différents rendements en résines fonctionnalisées avant la coupure HF. Les différentes résines fonctionnalisées ont été pesées avant de subir la coupure HF.

Le calcul du poids théorique des résines avant coupure HF se base sur un couplage équimoléculaire de toutes les amines. Il est supposé que toutes se sont fixées dans les mêmes proportions pour simplifier les calculs, ce qui est une approximation de la réalité.

La nouvelle charge de la résine est  $x'$  mmol/g. La quantité impliquée est de 180  $\mu$ mol.

masse de la résine avant couplage des amines =  $0,18 / x'$  (en g).

La masse moyenne des 81 amines (147,4 g/mol) est ajoutée et la masse d'une molécule d'eau est ôtée, soit :

$$\text{Masse théorique des résines en g} = ((0,18 / x') + (147,4 \times 0,18) - (18 \times 0,18))$$

### Interprétation des résultats :

Les rendements donnés dans le tableau 21 approchent 100% dans la plupart des cas. La moyenne des rendements est effectivement de 82%. Les rendements inférieurs à 100% sont explicables par la perte mécanique de résine lors du changement de réacteurs mais pas uniquement. En effet, la présence de rendements supérieurs à 100% indique que notre méthode de calcul n'est pas aussi fiable que nous l'escomptions. Une valeur moyenne a néanmoins dû être fixée pour chiffrer les rendements. Dans les cas où une valeur supérieure à 100 est lue, le couplage n'est pas équimoléculaire et les amines ne se

Tableau 12 : Rendements après coupure HF

		Y	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
		Anhydrides	Diglycolique	Phtalique	Cis-cyclohexane-1,2-dicarboxylique	2,2-diméthylsuccinique	2-phénylglutarique	2,3-pyridine dicarboxylique	Homophtalique	3-nitrophtalique	Exo-3,6-époxy 1,2,3,6-tétrahydro phtalique	Biphénique	3,3-tétraméthylène glutarique	3,6-difluoro phtalique
X	Acide-aminé	PM (g/mol)	116,1	148,1	154,2	128,1	190,2	149,1	162,1	193,1	166,1	224,2	168,2	184,1
A	Boc-D Pro-OR	115	57,4	37,5	55,5	62,6	55,7	62,6	49,1	51,2	38,7	34,1	67,6	30,2
B	Boc-D Pya-OR	167	54,8	27,5	52,9	54,7	61,5	53,9	35,3	45,7	41,8	29,7	59,0	31,4
C	Boc-D Naa-OR	217	21,3	16,2	30,5	30,3	22,2	23,7	15,3	13,9	7,8	5,5	16,2	8,4
D	Boc-D Val-OR	117	60,6	33,6	61,0	59,2	55,9	51,6	37,6	36,9	23,2	27,2	36,6	22,5
E	Boc-D Phe-OR	165	44,2	27,4	51,2	48,0	42,3	41,6	30,2	24,3	5,8	20,9	24,9	13,7
F	Boc-Gly-OR	75	48,0	25,1	73,7	54,8	47,8	46,7	31,2	40,9	24,5	28,8	42,0	28,8
G	Boc-D Tlc-OR	177	49,6	42,4	46,3	41,3	45,7	50,7	32,7	40,8	30,1	20,0	18,1	27,6
H	Fmoc-D Trp-OR	204	39,1	43,3	33,1	43,2	35,0	57,4	30,4	24,7	49,6	27,4	27,4	11,4
I	Boc-D Asn(Trt)-OR	132	83,2	20,0	40,6	38,7	53,4	37,1	52,3	39,4	27,6	30,5	48,2	20,5
J	Boc-D Pip-OR	129	54,3	48,2	45,4	52,1	51,2	59,3	44,2	53,7	37,2	25,9	40,4	47,9
K	Boc-Amo-OR	157	47,9	29,4	47,7	45,6	36,9	40,2	30,6	27,3	37,8	35,8	26,0	26,9
L	Boc-D Dcp-OR	129	59,0	29,2	53,4	50,4	49,8	48,0	35,8	38,7	42,5	84,3	34,1	32,0
M	Boc-L Azt-OR	101	76,5	30,1	56,7	64,2	57,5	55,4	34,0	52,8	31,0	40,4	40,2	21,8
N	Boc-D/L Dcp-OR	129	66,7	35,7	46,8	69,8	53,5	55,3	45,8	37,2	34,1	63,5	50,6	24,0
P	Fmoc-D His(Boc)-OR	155	58,1	56,2	86,8	56,7	85,0	54,9	56,9	53,5	53,7	51,3	37,2	18,6
Q	Fmoc-D Lys(Boc)-OR	146	87,3	43,3	69,7	59,2	86,5	63,3	62,3	125,1	74,6	63,3	18,2	14,4
R	Fmoc-D Ser(tBu)-OR	105	61,5	27,5	55,1	52,0	56,4	50,3	35,6	53,8	51,8	55,4	21,6	14,2
S	Fmoc-D Glu(OtBu)-OR	147	49,6	43,9	53,5	49,4	49,8	46,7	29,2	41,8	64,9	46,7	25,4	17,3
T	Fmoc-D Arg(Pmc)-OR	174	67,9	42,6	82,0	63,6	66,3	53,2	46,9	44,5	69,8	25,1	44,9	25,9
U	Fmoc-D Asp(OtBu)-OR	133	41,9	38,7	33,5	49,1	34,1	42,9	42,9	43,2	17,0	8,8	14,5	16,4

couplent pas toutes dans les mêmes proportions. Les rendements inférieurs à 100% peuvent aussi avoir cette origine.

### ***V-2-3/ Résultats après coupure HF*** (tableau 22, ci-contre)

Sur la même base que le calcul précédent, la masse théorique des lyophilisats est calculée. La masse des dimères est parfaitement connue d'une part et d'autre part, la valeur moyenne de 147,4 g/mol est utilisée en tant que masse moléculaire moyenne des amines.

### **Interprétation des résultats :**

Le rendement moyen après coupure HF est de 43%. Comme il avait été observé lors de l'étude préliminaire, des produits sont perdus partiellement (voire totalement) lors du clivage du polymère et de la solubilisation. Les masses obtenues sont néanmoins d'environ 10 mg et cette masse suffit à une centaine de tests de criblage.

## VI/ DETERMINATION DE LA STRUCTURE D'UN COMPOSE ACTIF

La stratégie d'identification du composé responsable de l'activité d'un mélange est largement déterminée par les étapes initiales de la conception de la bibliothèque. Nous l'illustrerons par un exemple précis qui nous permettra également de montrer les limites de la synthèse combinatoire en mélange.

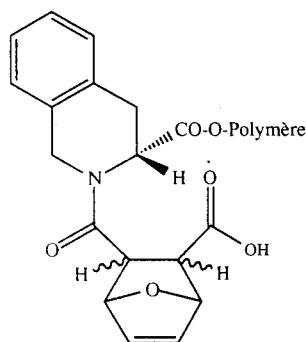
La bibliothèque LYN a été testée sur une cinquantaine de tests de criblage. Dans l'exemple que nous donnons, le lot *Gi* possède une activité inhibitrice sur le facteur X de la coagulation, un complexe protéase-calcium qui active, au cours d'une suite de réactions enzymatiques, la prothrombine en thrombine pour « tisser » la base protéique du caillot sanguin et permettre la cicatrisation.

### VI-1/ Intérêt de l'identification

Nous avons une certitude quant à la nature de la partie acylaminoacide (le « dimère ») qui compose le lot actif *Gi*. La nature des deux premiers synthons constituant ce dimère est donnée par la nomenclature de la bibliothèque (tableaux 18 et 19) : *G* est l'acide tétrahydroisoquinoléique (H-D-Tic-OH) et *i* est l'anhydride *exo*-3,6-époxy-1,2,3,6-tétrahydrophthalique (qui est prochiral). Seule reste à déterminer la nature de l'amine responsable de l'activité du lot.

Le « dimère » appelé *LYN/Gi* a donc la formule suivante (schéma 74).

**Schéma 74** : Formule du dimère *LYN/Gi* (52), immobilisé sur résine



## VI-2/ Déroulement de la déconvolution

Des lots combinatoires d'effectif moins grand ont été resynthétisés. Les deux premiers maillons ont été définitivement fixés et les amines couplées ont respecté l'organisation « orthogonale » que nous avons expliquée dans la partie « choix des synthons » (ch IV).

La résine *Gi* (52) a été divisée en 18 lots de taille égale :

- à 9 lots de *Gi*, ont été couplés les 9 groupes d'amines « horizontaux » en mélange
- les 9 lots de *Gi* restants ont été couplés aux 9 groupes d'amines « verticaux » en mélange.

Comme prévu, les 18 mélanges d'amines ont été préparés dans le DMF (la concentration est de 0,2M), d'après l'organisation donnée par le schéma 73. Un lot destiné à la déconvolution contenait donc 9 produits différents.

Une fois les mélanges constitués, les 18 mélanges ont été couplés sur la résine *Gi* après activation à l'HBTU et à l'HOBt en présence de DIEA (ét. 3, sch. 53). 0,9 éq. de chaque mélange a réagi pendant 2h30 et deux recouplages ont été effectués à raison de 0,9 éq. pendant 1h30 puis pendant une nuit. Les mêmes temps d'activation, de couplage et de lavage que la bibliothèque ont été respectés.

Les sous-bibliothèques ont été coupées à l'acide fluorhydrique anhydre, solubilisées et lyophilisées pour obtenir des poudres. Ainsi 9 mélanges horizontaux de *LYN/Gi/IX* à *LYN/Gi/9X* et 9 mélanges verticaux de *LYN/Gi/XI* à *LYN/Gi/X9* forment-ils les 18 sous-bibliothèques testées biologiquement pour cette déconvolution.

Enfin, le dimère *LYN/Gi* (52), n'ayant subi aucune activation ni couplage d'amines, traité comme les autres lots combinatoires à l'acide fluorhydrique, a, lui aussi, été évalué biologiquement.

Les meilleurs résultats sont obtenus avec les lots suivants :

*LYN/Gi*                      IC<sub>50</sub> = 15 µg/mL

*LYN/Gi/X5*       $IC_{50} = 5 \mu\text{g/mL}$   
*LYN/Gi/X4*       $IC_{50} = 8 \mu\text{g/mL}$   
*LYN/Gi/3X*       $IC_{50} = 16 \mu\text{g/mL}$   
*LYN/Gi/4X*       $IC_{50} = 6 \mu\text{g/mL}$

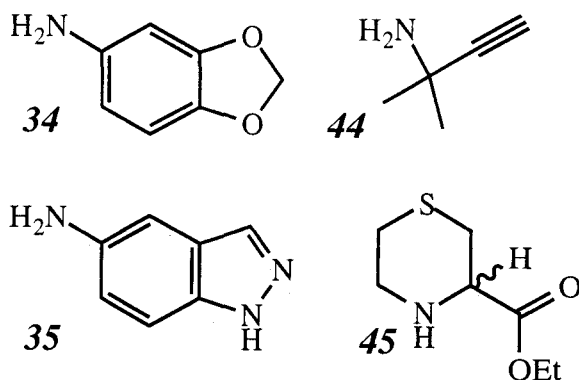
Les groupes *X5*, *X4* et *3X*, *4X* ont alors été croisés et 4 amines ont été identifiées selon le schéma 75.

**Schéma 75** : Croisement des groupes orthogonaux

	<i>X1</i>	<i>X2</i>	<i>X3</i>	<i>X4</i>	<i>X5</i>	<i>X6</i>	<i>X7</i>	<i>X8</i>	<i>X9</i>
<i>1X</i>	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<i>2X</i>	21	22	23	24	25	26	27	28	29
<i>3X</i>	31	32	33	34	35	36	37	38	39
<i>4X</i>	41	42	43	44	45	46	47	48	49
<i>5X</i>	51	52	53	54	55	56	57	58	59
<i>6X</i>	61	62	63	64	65	66	67	68	69
<i>7X</i>	71	72	73	74	75	76	77	78	79
<i>8X</i>	81	82	83	84	85	86	87	88	89
<i>9X</i>	91	92	93	94	95	96	97	98	99

Les amines issues du croisement, données dans le schéma 76, étaient la méthylènedioxyaniline, la propargylamine, le 5-aminoindazole, et le 4-thia-2-pipécolinate d'éthyle.

### Schéma 76 : Formules des amines en commun



Pour synthétiser individuellement les 4 produits possibles, 2 éq. d'amine ont été utilisés à chaque couplage sur la résine *Gi*, puisqu'il n'y avait plus le risque d'un couplage préférentiel de telle ou telle amine.

Les 4 produits synthétisés ont donc été appelés *LYN/Gi/34*, *LYN/Gi/35*, *LYN/Gi/44* et *LYN/Gi/45*.

Les résultats biologiques ont été les suivants:

<i>LYN/Gi/34</i>	IC <sub>50</sub> = 10 µg/mL
<i>LYN/Gi/35</i>	IC <sub>50</sub> = 100 µg/mL
<i>LYN/Gi/44</i>	IC <sub>50</sub> = 30 µg/mL
<i>LYN/Gi/45</i>	IC <sub>50</sub> = 100 µg/mL

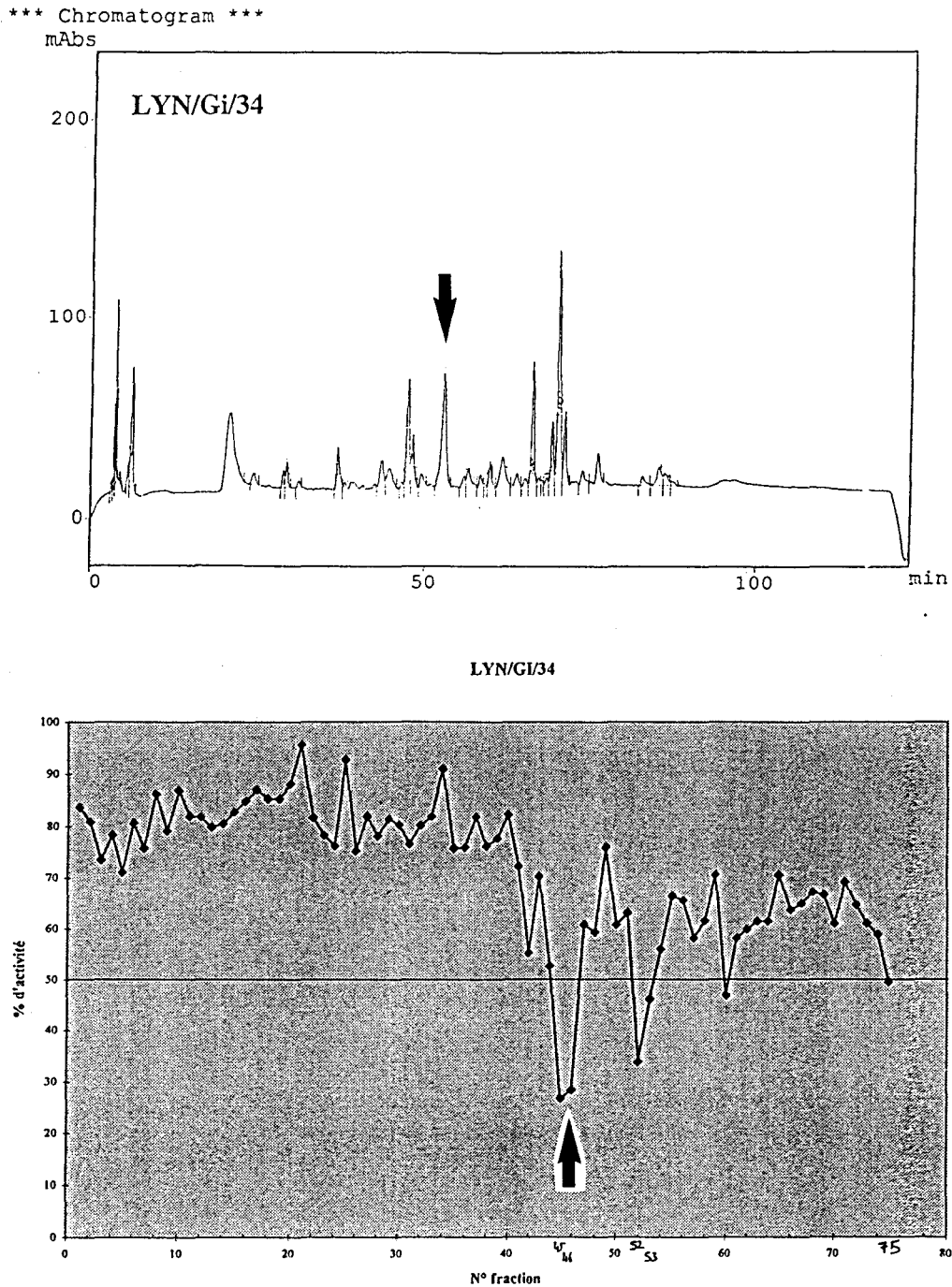
### VI-3/ Identification des produits actifs

Les produits issus des amines *35* et *45* ne donnaient plus d'activité significative tandis que les produits *LYN/Gi/34* et *LYN/Gi/44* étaient encore inhibiteurs du facteur X. Ces derniers ont alors été étudiés par HPLC. Dans les deux cas, le chromatogramme comportait plusieurs pics comme le montrent les schémas 77 et 78, alors qu'un produit unique était attendu dans chaque milieu réactionnel.

Une HPLC préparative a été réalisée sur 1 mg de chacun des deux bruts *LYN/Gi/34* et *LYN/Gi/44* sur une colonne C18. Le profil du chromatogramme de l'HPLC préparative était le même qu'en HPLC analytique. Chaque tube a été numéroté et un test de localisation d'activité a été effectué.

Pour *LYN/Gi/34*, comme le montre le schéma 77, l'activité a été détectée dans 2 pics, dont un pic très bien isolé et un plus petit moins bien résolu. Nous avons décidé de nous focaliser sur le pic bien isolé (fléché sur le schéma 77).

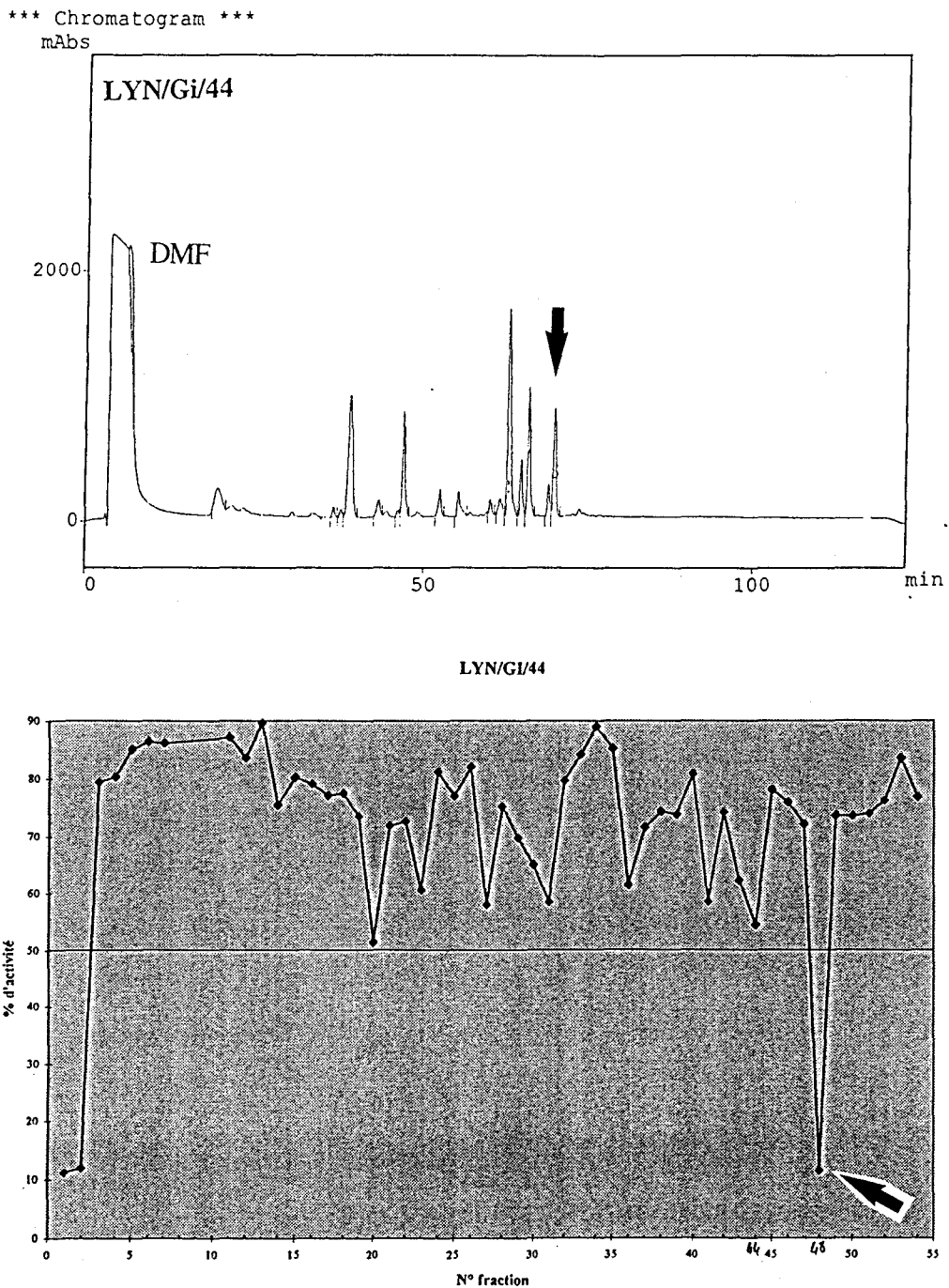
**Schéma 77 : Répartition de l'activité pour *LYN/Gi/34***





Pour *LYN/Gi/44*, comme le montre le schéma 78, l'activité était localisée dans un seul tube (fléché sur le schéma 78) et semblait être meilleure que dans le cas de *LYN/Gi/34*. Mais la séparation du pic voisin en HPLC paraissait plus difficile : *LYN/Gi/44* a été momentanément laissé de côté.

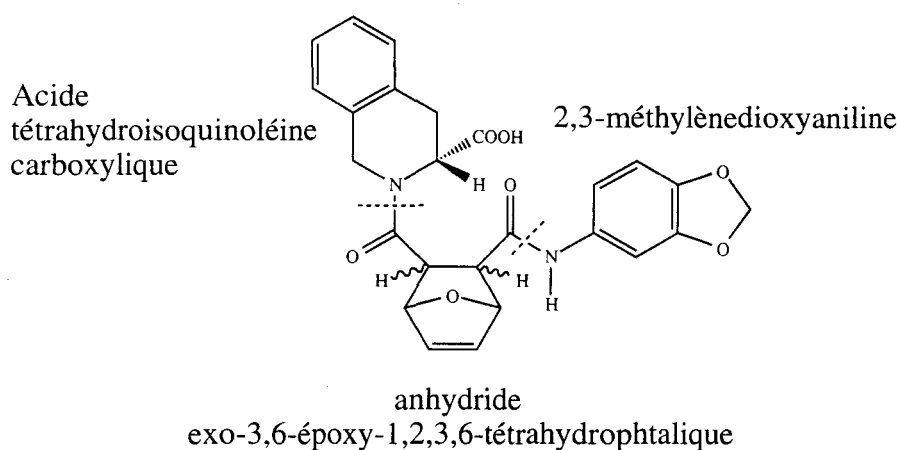
Schéma 78 : Répartition de l'activité pour *LYN/Gi/44*



#### VI-4/ Purification du brut *LYN/Gi/34*

La formule du produit unique attendue était celle d'un acide carboxylique : c'est-à-dire l'acide ((2',3'-méthylènedioxyanilin) exo-3,6-époxy-1,2,3,6-tétrahydrophthalyl) D-tétrahydroisoquinoléine carboxylique comme le montre le schéma 79, dont la masse moléculaire théorique est de 450 g/mol.

Schéma 79 : formule théorique du produit attendu : *LYN/GI/34* (53)



Nous pensons que le cycle méthylènedioxy ne résistera pas aux conditions acides (il s'agit d'un acétal) et qu'il s'hydrolysera pour donner du formol volatile et un « catéchol » correspondant à la 3,4-dihydroxyaniline. Le poids moléculaire du produit sera alors de 438 g/mol.

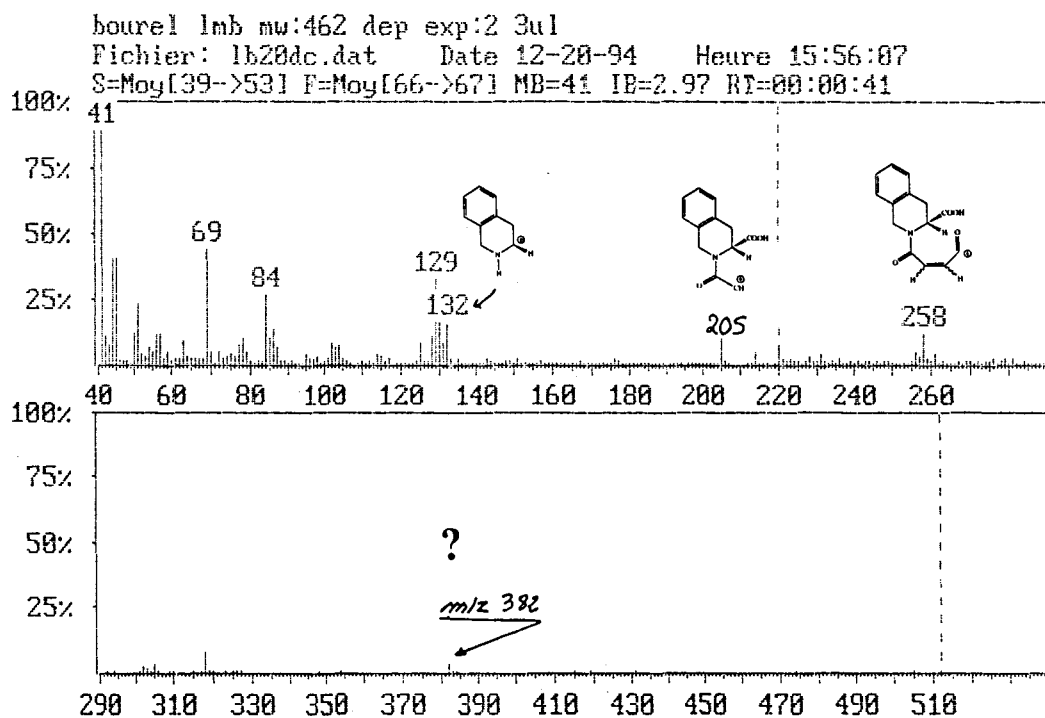
Des purifications par HPLC préparative ont permis de séparer le pic où l'activité était majoritaire du reste du brut. Le produit a été isolé et possédait une valeur d'IC<sub>50</sub> de 40 µg/mL.

## VI-5/ Détermination structurale du produit par RMN et SM (FAB, basse puis haute résolution)

### VI-5-1/ Spectrométrie de masse

La masse moléculaire du produit pur a été évaluée à 382 g/mol par la technique dite du « FAB » (Fast Atom Bombardment) à basse résolution : le rapport  $M/z$  obtenu est de 383 en détection positive et de 381 en détection négative. La masse moléculaire du produit isolé est donc de 382 ; comme elle est paire, la molécule possède un nombre pair d'atomes d'azote. Les fragments détectés ont des valeurs de  $M/z = 258, 203, 132, 129, 84$  et  $69$ . Sur le spectre, nous faisons figurer les formules auxquels les fragments correspondent. Le Tic est vraisemblablement intact puisque des fragments compatibles avec sa masse moléculaire sont détectés.

### Schéma 80 : Spectre de masse du produit purifié



Or, la masse moléculaire théorique est de 450 g/mol : nous n'avons pas isolé le produit attendu.

## VI-5-2/ Etude RMN

Après sa purification, le produit a été analysé sur un spectromètre de RMN 600MHz.

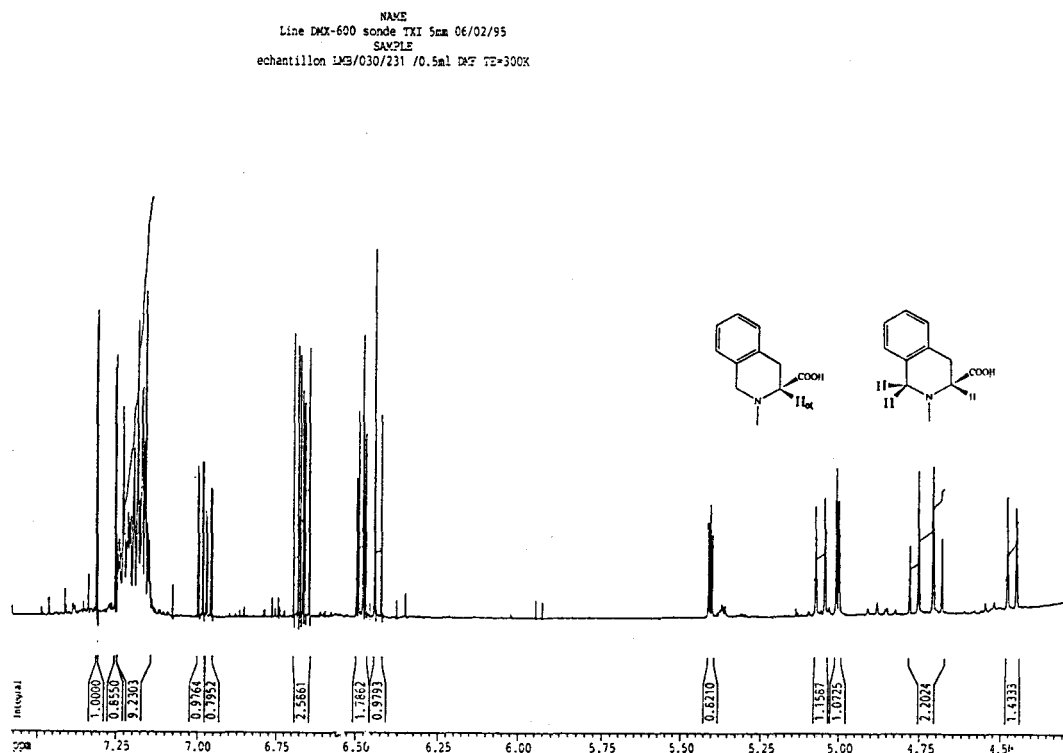
Le spectre permet d'abord d'affirmer que la molécule possède des protons échangeables en présence de D<sub>2</sub>O qui sont :

- un ou des proton(s) acide(s) donnant un pic large,
- deux protons de déplacement chimique situé dans la zone des protons amides dans un rapport d'environ 55/45,
- deux protons de  $\delta=10$  ppm, sous forme de doublets ( $J=12, 5$ Hz) situés dans la zone des protons phénoliques.

D'autre part, pratiquement tous les massifs sont dédoublés alors que le produit étudié est pur en HPLC. Ceci laisse à penser que la molécule existe sous deux conformations dans les conditions de l'analyse.

On reconnaît sur le schéma 81, les protons  $\alpha$  du Tic. Leurs surfaces relatives ont permis de déduire que les deux populations sont représentées avec un rapport de 56/44. Les protons CH<sub>2</sub>NH du Tic sont également dédoublés. En revanche, les protons aromatiques forment un massif où le dédoublement n'est pas observable.

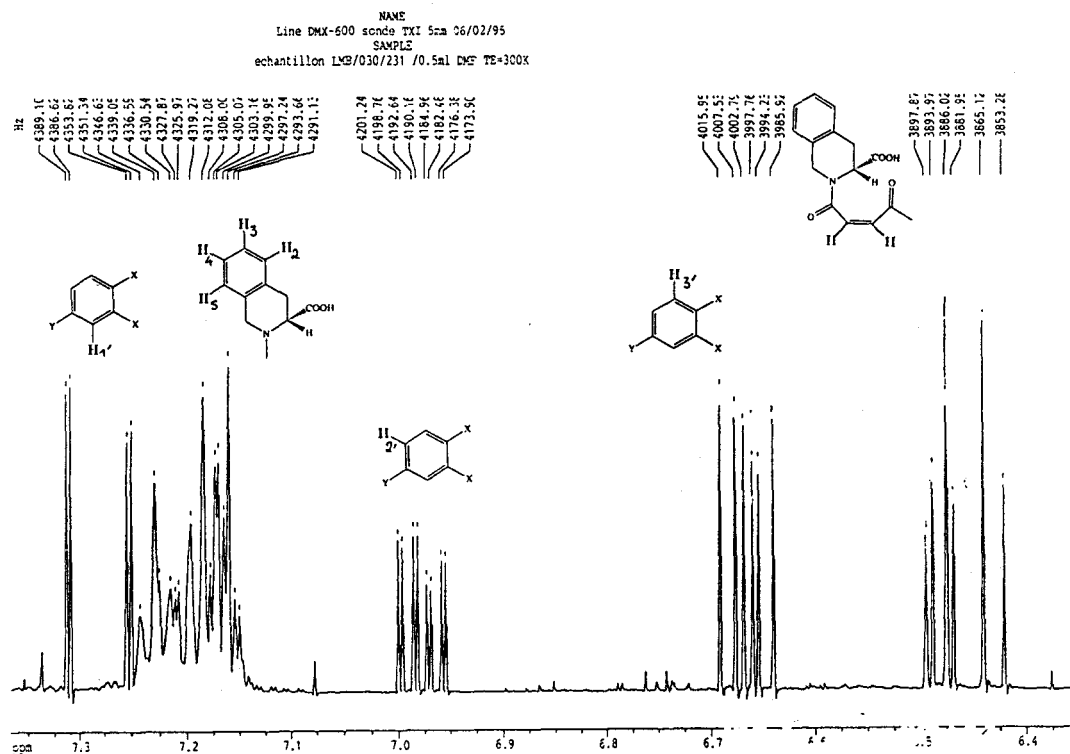
### Schéma 81 : Spectre RMN dans la zone 4,5 à 7,5 ppm



Au niveau de la région des protons aromatiques (schéma 82), seuls les protons du cycle aromatique du Tic ne sont pas dédoublés. Le spectre est celui d'un noyau aromatique trisubstitué et les différents massifs sont dédoublés dans le même rapport. L'hypothèse avancée est confirmée : la méthylènedioxyaniline a été incorporée mais le cycle « éthylènedioxy » s'est ouvert en milieu acide, dans l'HF ou lors de la solubilisation par le mélange acétique/DMF, pour libérer alors deux fonctions phénoliques voisines de type « catéchol » et une molécule de formol volatile.

Sur le spectre (sch. 82), figurent des protons de type éthylénique, eux aussi dédoublés, car les constantes de couplage sont de 12Hz pour chaque population. Cette valeur de 12Hz permet d'attribuer la configuration « Z » à l'enchaînement. Les mêmes rapports entre les populations sont retrouvés, c'est-à-dire 56/44.

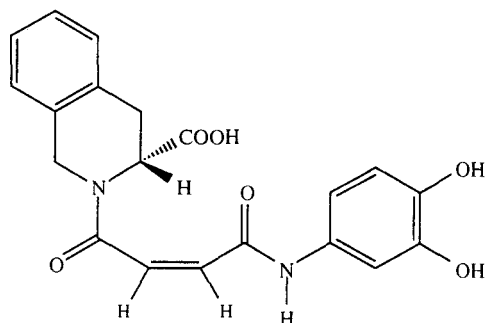
Schéma 82 : Spectre RMN dans la zone 6,4 à 7,3 ppm



## VI-6/ Identification de la molécule la plus active du brut *LYN/Gi/34*

Nous proposons donc la structure donnée par le schéma 83, compatible avec l'analyse de la masse et la RMN.

**Schéma 83** : Proposition pour la structure du produit actif isolé (54)

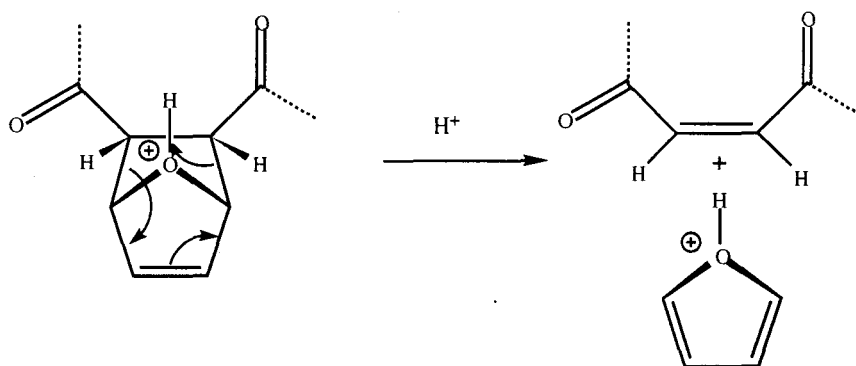


MM=382 g/mol,  $IC_{50}=104 \mu M$ .

Nous proposons que la molécule existe sous deux conformations dans les conditions de l'analyse RMN. Comme nous l'avons déjà montré, l'acide amino Tic peut exister sous deux conformations gauche (-) et gauche (+) (ch. II, § IV-2), il est probable que cela soit le cas ici.

Pour justifier la formule avancée nous proposons qu'il y ait eu une réaction de rétro Diels-Alder dans l'acide fluorhydrique, comme le montre le schéma 84.

**Schéma 84** : possible réaction de rétro Diels-Alder en milieu acide



## VII/ Discussion

L'identification des 4 amines conférant l'activité par croisement est une méthode satisfaisante, mais nous nous sommes heurtés à un problème de réaction secondaire imprévue. Même si notre démarche a abouti à l'identification d'un produit actif, nous pouvons quand même critiquer quelques aspects de cette bibliothèque :

- L'identification du produit actif a pris trop de temps : en théorie, nous espérions que le croisement des lots de sous-clonage conduirait directement à un produit unique, le plus actif du lot positif lors du criblage. En réalité 2 mois ont été nécessaires à la purification du produit et à l'identification de sa structure. Seule la RMN 600MHz a simplifié l'étude et permis l'identification du produit dont l'activité a été confirmée

- La préparation et la synthèse ont été faites au tout début de « l'ère » des bibliothèques non peptidiques, nous avons sous-estimé les réactions secondaires possibles et le caractère trop drastique de certains réactifs comme l'acide fluorhydrique vis-à-vis de synthons fragiles comme l'anhydride exo-3,6-époxy-1,2,3,6-tétrahydrophthalique.

- Nous n'avons certainement pas assez « éprouvé » notre bibliothèque avant de commencer la synthèse. En effet, les synthons utilisés pour l'étude préliminaire sont trop peu nombreux et pas assez représentatifs de ceux qui ont été utilisés dans la bibliothèque en taille réelle.

Il a néanmoins été décidé de suspendre l'exploitation de la molécule. D'une part, parce l'identification avait pris trop de temps et d'autre part, parce que plus on « simplifiait » le mélange plus l'activité inhibitrice chutait. L'activité inhibitrice, située à 16 µg/ml pour *LYN/Gi/3X* et 8 µg/ml pour *LYN/Gi/X4*, décroissait à 10 µg/ml pour *LYN/Gi/34* et était finalement de 40 µg/ml pour le produit pur isolé n°54. Environ un facteur 10 dans l'activité est perdu à chaque étape si on prend en compte qu'à chaque étape de l'identification, le lot testé contient moins de produits qu'à la précédente. Nous sommes en présence d'un continuum d'activité et le produit finalement isolé est peu actif ( $IC_{50} = 104 \mu M$ ). Notre méthode a abouti à l'identification d'un inhibiteur du facteur X de la coagulation mais insuffisamment actif pour intéresser les pharmacologues.

## CONCLUSION DU CHAPITRE 4

Après avoir montré les avantages de la synthèse combinatoire en mélange dans le cas des bibliothèques orthogonales, nous pouvons, avec le dernier exemple, en voir aussi les limites.

D'une part, l'identification du produit actif est ici bien trop longue, à cause des réactions secondaires et d'autre part parce qu'il s'est produit un continuum d'activité dans nos mélanges. Chaque produit des lots *LYN/Gi/3X* et *LYN/Gi/X4* et plus tard, chaque produit du lot actif *LYN/Gi/34* a sa part dans l'activité globale du mélange. En considérant la bibliothèque, il était prévisible qu'on ait ce continuum d'activité puisque chaque lot possède un pharmacophore en commun, le « dimère » entre un anhydride et un aminoacide uniques. C'est pourquoi la bibliothèque avait été qualifiée de « semi-combinatoire ».

**Le cas idéal voudrait que l'identification structurale soit rapide et l'activité portée par un seul produit.**

Une réaction secondaire s'est produite dans l'acide fluorhydrique. Cet agent de coupure est trop drastique. Il aurait fallu choisir un agent plus doux pour avoir accès à une plus grande diversité (comme celle des hétérocycles qui peuvent eux aussi être labiles dans des conditions trop acides).

**Le cas idéal voudrait qu'il n'y ait pas d'utilisation d'agent chimique « drastique » ou excluant l'emploi de certains synthons fragiles.**

La réaction secondaire que nous avons mise en évidence n'est sûrement pas la seule puisque le chromatogramme du brut réactionnel était assez complexe. Il aurait fallu caractériser chaque synthon pour connaître son comportement à chaque étape « difficile », comme ici la coupure HF (ét. 5, sch. 53) ou l'activation avec HBTU/HOBt (ét. 3, sch. 53). Même si l'étude préliminaire a duré longtemps, elle n'est pas encore



assez complète. Il aurait fallu avoir caractérisé analytiquement chaque synthon commercial, les résultats analytiques des fournisseurs ne suffissent pas.

**Le cas idéal voudrait que chaque synthon soit entièrement caractérisé et que sa réactivité soit parfaitement connue.**

Un contrôle analytique *a posteriori* de la bibliothèque n'était pas possible puisqu'il s'agit d'un mélange.

**Le cas idéal voudrait qu'il y ait un contrôle qualité *a posteriori* de la bibliothèque avant de la tester pour éviter d'avoir des mélanges complexes à purifier.**

## CONCLUSION DE LA PARTIE COMBINATOIRE

Les méthodes de synthèse combinatoire que nous avons exposées ont permis d'identifier des têtes de série dans le domaine des inhibiteurs des récepteurs  $V_2$  de la vasopressine et des anticoagulants. Dans les deux cas, leurs structures ne pouvaient être prédites sur la base d'une étude rationnelle à partir des récepteurs  $V_2$  ou du facteur X.

Les deux exemples n'ont pu déboucher sur une étude pharmacologique poussée, l'un parce qu'il n'était pas actif chez l'homme, l'autre parce que son activité était insuffisante.

Dans l'approche combinatoire, la probabilité (**P**) d'identifier un produit actif est à la fois fonction du nombre de molécules testées (**N**) et de leur diversité (**d**). Plus les molécules présentées aux tests de criblage sont nombreuses et diverses, plus les chances d'identifier un produit actif sont grandes (**P = N x d**). Le nombre de molécules diverses testées et restant à tester contrebalance la « perte » de ces deux têtes de série. Il est très probable que d'autres têtes de série plus actives, plus spécifiques des récepteurs humains seront identifiées pour les deux tests cités. Puisqu'un nombre important de « touches » est identifié par criblage, une sélection des molécules les plus intéressantes peut être faite très tôt et il est possible d'abandonner rapidement une tête de série d'intérêt moyen.

La méthode combinatoire s'inscrit bel et bien comme une source de diversité pour alimenter les tests de criblage, en complément des molécules d'origine naturelle et des pharmacothèques chimiques des sociétés pharmaceutiques.

**PARTIE 3**

**SYNTHESE ORGANIQUE RAPIDE**

# CHAPITRE I :

## LA SYNTHÈSE ORGANIQUE A HAUT DÉBIT

### *L'application de la robotique à la chimie*

#### I/ STRATEGIE ADOPTÉE :

##### I-1/ Les exigences de la bibliothèque idéale :

Confrontés à un problème d'identification et de continuum d'activité, nous venons d'évoquer la « bibliothèque idéale », celle-ci doit avoir les quatre propriétés suivantes :

- l'identification structurale doit être rapide et l'activité portée par un seul produit,
- les conditions réactionnelles ne doivent pas détériorer les synthons,
- chaque synthon de départ doit être caractérisé analytiquement et sa réactivité doit avoir été validée,
- un contrôle qualité de la bibliothèque doit être possible *a posteriori* , ce qui permettra d'évaluer la pureté des composés qui vont être criblés.

Nous avons décidé de concevoir désormais des bibliothèques qui, tout en n'étant plus peptidiques, possèdent encore toutes les propriétés que nous venons d'énoncer.

En outre, nous avons décidé que nos futures bibliothèques répondraient absolument à trois exigences qui sont les suivantes :

- la diversité doit être optimale
- l'apparition des faux positifs doit être minimisée
- les capacités de synthèse doivent être adaptées aux capacités de criblage.

*La réponse commune à ces trois exigences, remplissant les quatre conditions souhaitées était la synthèse parallèle à haut débit.*

## **I-2/ La synthèse parallèle à haut débit**

Cette méthode consiste à synthétiser rapidement un grand nombre de molécules individuellement. Il s'agit toujours de « chimie combinatoire » car toutes les combinaisons entre les familles de réactifs sont toujours synthétisées. La différence avec la partie précédente est l'absence de mélange, chaque produit étant synthétisé individuellement en faible quantité.

### ***I-2-1/ Optimiser la diversité des futures bibliothèques***

Tout d'abord, pour optimiser la diversité de nos futures bibliothèques, il nous fallait optimiser le choix des synthons employés. Les synthons les plus divers nécessitent le plus souvent l'emploi de conditions expérimentales adaptées, non limitantes et pouvant différer sensiblement à l'intérieur d'une même famille.

La synthèse parallèle à haut débit répond à cette attente puisqu'elle permet de mettre en oeuvre des réactions chimiques individuelles, et d'appliquer dans chaque cas, les conditions à la fois favorables à la réactivité des synthons et n'entraînant pas leur détérioration ni celle des produits de la réaction.

### ***I-2-2/ Minimiser l'apparition des faux positifs :***

Ceci est possible d'abord en limitant le nombre de composés par mélange : plus le mélange est simple, moins les réactions secondaires imprévisibles ont de chances d'apparaître.

Ensuite, il faut éviter les déconvolutions : le choix d'une sous-bibliothèque plutôt qu'une autre est quelquefois litigieux, comme dans le cas du « positionnal scanning » (partie II, ch. II-1-2). D'autre part, une fois le choix effectué, celui-ci peut mener à des composés peu ou pas actifs (comme dans la partie II, § IV-6).

Si les produits sont synthétisés individuellement, l'identification structurale est facilitée, même si, comme c'est notre cas, les réactions sont évaluées sans étape de purification. A

la différence des synthèses en mélange, si l'activité est due à un produit secondaire, les conditions opératoires qui l'ont généré sont faciles à reproduire.

### ***I-2-3/ Adapter les capacités de synthèse aux capacités de criblage***

La biologie se dote de robots capables de tester quelques milliers de produits par jour. Nous avons décidé d'évoluer à la même vitesse, c'est-à-dire d'être capables de synthétiser des milliers de produits par jour mais, cette fois en abandonnant les mélanges et en développant la synthèse parallèle.

## **II/ MOYENS EMPLOYES POUR REALISER DE LA SYNTHESE PARALLELE A HAUT DEBIT**

### **II-1/ Le robot**

Pour synthétiser individuellement des produits tout en gardant la même vitesse que la synthèse combinatoire en mélange, nous avons acquis un robot de synthèse organique.

Il s'agit d'un système TECAN où 8 aiguilles à écartement variable peuvent aspirer et distribuer des réactifs et d'un bras circulant sur un rail capable de déplacer des portoirs de tubes et des plaques où sont effectuées les réactions. Le robot met donc en solution les matières premières, et réalise les mélanges de réactifs. L'ensemble est placé dans une enceinte où l'humidité et la température sont contrôlées. Dans cette enceinte, se trouvent aussi, un bain à ultra-sons, un système d'agitation et des « hotels » où sont agitées les plaques portant les milieux réactionnels.

### **II-2/ Format de la synthèse**

Le robot manipule des plaques de polypropylène de 96 puits, d'un format identique à celui des plaques à ELISA, couramment utilisées dans les tests de criblage (en anglais, « deep wells »). Les réactions sont effectuées sur des faibles quantités de réactifs : 5 à 10  $\mu\text{mol}$  de produits sont synthétisées en parallèle, cette quantité est suffisante pour une centaine de tests de criblage. Le robot est capable de synthétiser des milliers de produits par jour. Par ces cadences, le robot peut faire face aux capacités grandissantes du criblage

à haut débit (High Throughput Screening ou HTS). Cette nouvelle facette de la chimie est appelée par analogie « la synthèse organique à haut débit » (High Throughput Organic Synthesis ou HTOS).

### **II-3/ L'outil informatique**

L'ensemble du système robotique est piloté par ordinateur.

Les réactifs, les tubes et les plaques de 96 puits sont étiquetés par des codes-barres uniques. La pesée des réactifs est réalisée manuellement mais contrôlée par ordinateur après lecture des codes-barres des réactifs et des tubes dans lesquels ils sont placés:

L'ordinateur calcule la quantité de solvant à distribuer pour atteindre une concentration cible. Il repère ensuite les coordonnées du puits où il a déposé les réactifs et enregistre tous ses mouvements.

### **II-4/ Sélection des synthons**

Les synthons employés sont choisis rigoureusement. Avant d'être achetés, ils font l'objet d'une étude de modélisation moléculaire pour évaluer leur diversité.

Une fois commandés, les synthons sont caractérisés analytiquement par CCM, HPLC, RMN et point de fusion. Ils font l'objet d'une étude de solubilité puisque le robot manipule et distribue des solutions. Ils sont aussi caractérisés chimiquement : des réactions modèles permettent d'évaluer leur réactivité dans une chimie d'assemblage.

## **III/ LA STRATEGIE CHIMIQUE**

Actuellement, le robot réalise des mélanges, sans purifier les produits obtenus. Les réactions chimiques employées doivent donc être robustes et conduire aux produits réactionnels avec de bons rendements, en limitant le risque de réactions secondaires. Un travail d'analyse et de validation précède donc l'automatisation de la réaction.

Différentes approches sont actuellement étudiées au laboratoire :

### **III-1/ La dimérisation**

Il s'agit de faire réagir deux familles de réactifs pour obtenir un dimère avec un rendement élevé. Deux illustrations de cette méthode sont fournies dans la suite de ce mémoire : l'ouverture d'anhydrides par une amine primaire ou secondaire et la synthèse de pyridazinediones à partir d'anhydrides cycliques et d'hydrazines. Il s'agit de chimies dites « d'assemblage » où la diversité est principalement apportée par les substituants des familles chimiques réagissant les unes sur les autres

D'autres stratégies chimiques font l'objet d'études :

### **III-2/ La dimérisation suivie d'un piègeage**

Deux familles de réactifs forment un dimère encore réactif, qui peut être couplé à une troisième famille de réactifs.

### **III-3/ La phase solide multi-étapes**

Si davantage d'étapes sont requises, l'utilisation de la phase solide est indispensable.

### **III-4/ L'utilisation de réactifs immobilisés sur support solide**

Pour des réactions nécessitant l'emploi de catalyseurs ou d'agents de couplage pouvant interférer avec les systèmes biologiques du criblage, l'emploi de réactifs immobilisés sur polymère permet leur élimination du milieu réactionnel par filtration<sup>58</sup>.

## **IV/ CONTROLE DES PRODUITS DE LA REACTION**

Un contrôle qualité des produits obtenus *a posteriori* est facile car le milieu réactionnel se limite, si la réaction n'est pas totale, aux produits de départ et aux produits d'arrivée : il revient au chimiste de concevoir ce contrôle qualité pour qu'il soit statistiquement le plus représentatif de la bibliothèque totale.



## **V/ DEFIS FUTURS**

### **V-1/ Développement des techniques analytiques**

Une nouvelle révolution, déjà entamée, est celle des techniques analytiques : leurs capacités accrues permettront dans un proche avenir de contrôler tous les produits synthétisés, c'est-à-dire que les quelques milliers de produits synthétisés par jour pourront chacun bénéficier d'une analyse par HPLC et par spectrométrie de masse et au besoin d'une purification avant d'être évalués.

### **V-2/ Accélération des réactions**

Des techniques de chauffage rapide, comme l'utilisation des micro-ondes, permettent de conduire rapidement aux produits désirés en évitant les réactions secondaires ou les dégradations : cette technique a été adaptée à la synthèse de pyridazinediones, comme nous allons le montrer.

Le concept de synthèse organique rapide est illustré de deux exemples utilisant des anhydrides. Nous avons cherché, à l'occasion de ce travail, à tirer parti de l'expérience de la chimie des anhydrides cycliques que nous avons acquise au cours du travail décrit précédemment. L'approche utilisée dans le cas présent, qui est de réaliser l'ensemble des opérations en solution et de synthétiser les produits individuellement, nous a donné accès de manière permanente à des outils analytiques performants (l'HPLC, la spectrométrie de masse ou encore la résonance magnétique nucléaire) qui nous ont permis de suivre de manière beaucoup plus efficace l'ensemble des réactions mises en jeu.

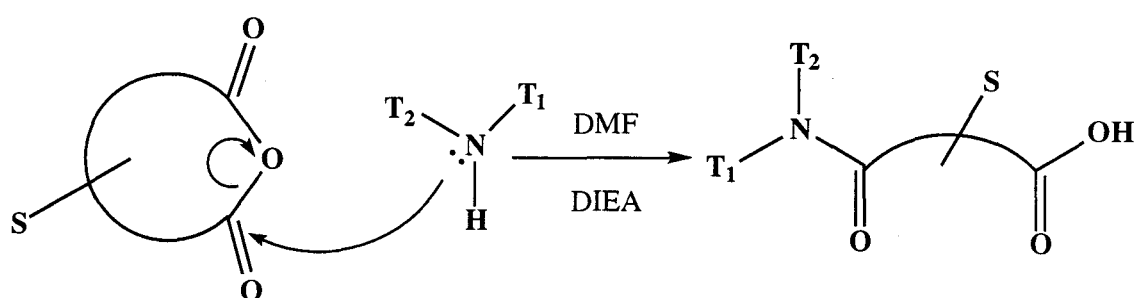
Les réactions recherchées sont celles qui vont conduire avec de bons rendements à une grande quantité de composés très divers.

## CHAPITRE II :

# OUVERTURE D'ANHYDRIDES EN SOLUTION

Dans ce projet, le but a été d'automatiser l'ouverture d'un grand nombre d'anhydrides cycliques par un maximum d'amines pour obtenir des amides acides comme le montre le schéma 85.

**Schéma 85** : réaction d'ouverture des anhydrides cycliques par les amines



Les substituants des anhydrides sont notés S, les substituants des amines T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub>

Avant de réaliser la bibliothèque de validation, tous les réactifs ont été contrôlés analytiquement et ont subi des tests de pureté et de solubilité.

### I/ PREPARATION DES MATIERES PREMIERES :

#### I-1/ Le contrôle analytique

Chaque synthon est testé par un test d'identité, de pureté et de solubilité.

##### II-1-1/ Les amines

La pureté des amines, très nombreuses, est évaluée par CCM dans deux systèmes de migration et révélées à la ninhydrine. Si cette CCM n'est pas satisfaisante, une analyse par HPLC est effectuée et si l'HPLC est encore litigieuse, la RMN permet de compléter l'analyse.

La solubilité des amines est évaluée dans les conditions de la production, c'est-à-dire à une concentration de 0,1M dans le DMF en présence d'un équivalent de DIEA.

### ***I-1-2/ Les anhydrides***

Les anhydrides ne sont contrôlés que par RMN. En effet, l'HPLC, réalisée en milieu aqueux, hydrolyse partiellement ou totalement l'anhydride et conduit à la présence de deux produits détectables en chromatographie : l'anhydride et le diacide correspondant. Le chromatogramme ne permet pas de déterminer la pureté. Il en va de même pour la CCM, l'anhydride s'hydrolyse sur la plaque de silice.

En revanche, en RMN, dans un solvant ne contenant pas (ou très peu) de traces d'eau, il est aisé d'analyser l'anhydride. Au cours de cette étude il nous est apparu que certains des anhydrides commerciaux dont nous disposions étaient partiellement hydrolysés : un pic très large dans la zone de  $\delta=10-12$  ppm, ainsi qu'un dédoublement de certains massifs de protons ont été observés.

Il a été observé que les anhydrides ne sont pas stables dans le DMSO- $d_6$  ou le DMF- $d_7$ , ces solvants contiennent beaucoup d'eau dissoute. D'autre part, le DMSO est connu pour ses propriétés nucléophiles. Les études par RMN sont, par conséquent, réalisées dans le chloroforme ou l'acétonitrile deutérés.

### **I-2/ Déshydratation des anhydrides**

Une déshydratation des anhydrides partiellement hydrolysés a été mise au point. Un mélange d'anhydride acétique et trifluoroacétique (95/5) réagit en excès sur les produits pour les déshydrater. Le réactif de déshydratation est aussi le solvant, la concentration de l'anhydride est d'environ 1M, le milieu réactionnel est porté à reflux si l'anhydride partiellement hydrolysé n'est pas soluble. Le milieu refroidit, en général l'anhydride pur cristallise et il peut être filtré. Les rendements sont quantitatifs.

## **II/ EVALUATION DE LA REACTION**

Pour pouvoir s'appliquer à la synthèse rapide et automatisée de dizaines de milliers d'analogues structuraux, les réactions chimiques mises en jeu doivent être parfaitement

connues en termes de rendements, de cinétique et de pureté pour un large éventail de réactifs différents. Les premières manipulations exploratoires ont permis de déterminer dans quelles conditions, partant d'anhydrides et d'amines simples, la réaction a lieu et avec quels rendements. Après une période d'optimisation assez courte, au cours de laquelle nous avons eu principalement à régler le problème de l'instabilité des anhydrides, nous avons pu obtenir de manière régulière, des rendements supérieurs à 90% pour l'ouverture de l'anhydride phtalique par la phénéthylamine ou l'aniline.

Nous avons ensuite sélectionné, parmi les anhydrides et les amines disponibles commercialement, des synthons représentatifs de ceux qui seront utilisés pour la production robotisée et étudié leur réactivité.

## **II-1/ Choix des modèles**

Les *amines* ont été choisies de telle sorte qu'elles permettent d'explorer une large diversité structurale. Pour cela, chaque amine sélectionnée se caractérise par un environnement stérique et électronique particulier. Toutes les amines du laboratoire ont été classées, les amines étudiées sont le représentant de chaque classe et sont, par conséquent, des modèles de réactivité. Chacune de ces amines « représentatives » a été mise en réaction avec l'anhydride phtalique et le produit de la réaction a été étudié.

Réciproquement, la réactivité d'une série d'*anhydrides cycliques* à 5 ou 6 maillons, présentant ou non une contrainte stérique a été évaluée vis-à-vis d'une même amine, la phénéthylamine. Les anhydrides choisis sont aussi des anhydrides modèles pour tous les anhydrides présents au laboratoire.

Le but de cette étude est d'évaluer les possibilités réactionnelles croisées des deux familles. Cette étude s'est basée sur l'utilisation de l'HPLC, de la spectrométrie de masse et de la RMN. Une bibliothèque de validation de 24 produits caractérisés a été réalisée.

## **II-2/ Conditions réactionnelles de l'étude d'évaluation**

Une première évaluation nous a permis de définir les conditions de la réaction chimique : Elle se déroule dans le DMF en présence d'un équivalent de DIEA. L'anhydride, en solution dans le DMF (0,4M), réagit sur l'amine solubilisée elle aussi dans le DMF (0,1M) en présence d'un éq. de DIEA. Dans les cas les plus favorables, dès les premières minutes de contact, le produit de la réaction apparaît ; cependant nous avons adopté un temps de contact long (5h) pour permettre aux amines les moins nucléophiles de réagir. Le milieu réactionnel est évaporé sous vide, en évitant le chauffage pour limiter les risques de formation d'imide. Le résidu sec est solubilisé dans l'acétate d'éthyle, la phase organique est lavée par une eau acidulée pour éliminer les traces d'amine.

Un sous-produit rencontré quand la réaction n'est pas totale est le diacide correspondant à l'anhydride, il a les mêmes propriétés « acides » que le produit de la réaction. Dans ce cas, une chromatographie préparative par HPLC permet d'isoler le produit attendu.

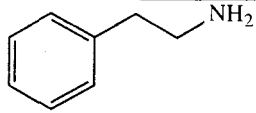
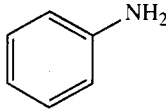
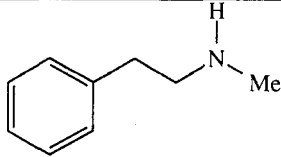
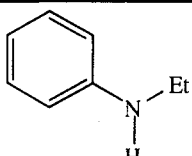
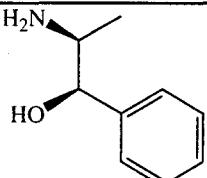
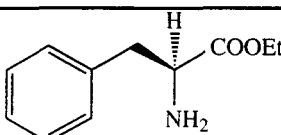
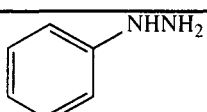
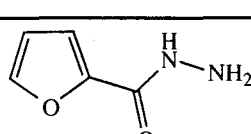
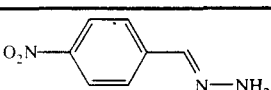
## **II-3/ Résultats de la bibliothèque de validation**

Nous rapportons ici les rendements de conversion des milieux réactionnels, évalués par HPLC, avant toute purification.

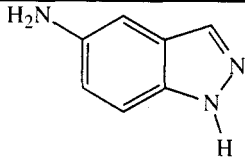
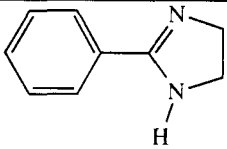
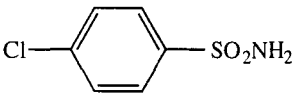
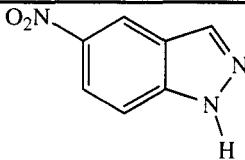
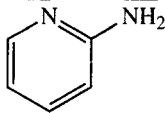
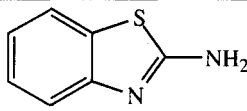
### ***II-3-1/ Réactivité des amines avec l'anhydride phtalique***

L'anhydride phtalique est un bon électrophile, son ouverture en présence d'un nucléophile ne pose généralement pas de problème. Les conversions sont rapportées dans le tableau 23.

**Tableau 23** : résultats HPLC de l'ouverture de l'anhydride phtalique par différentes amines :

Amine	Nom	Formule	N° du produit obtenu	Conversion HPLC
primaire aliphatique	phénéthylamine		55	90%
primaire aromatique	aniline		56	90%
secondaire aliphatique	N-méthyl-phénéthylamine		57	87%
secondaire aromatique	N-éthyl-aniline		58	72%
amino-alcool	R, S, (-) noréphédrine		59	89%
acide α-aminé	L-phénylalanine éthyl carboxylate		60	79%
hydrazine	phénylhydrazine		61	96% (imide vu par RMN)
hydrazide	2-furoïc hydrazide		62	99%
hydrazone	4-nitro benzaldéhyde hydrazone		63	99%

**Tableau 23 (suite) : résultats HPLC de l'ouverture de l'anhydride phtalique par différentes amines**

<b>amino-indazole</b>	5-aminoindazole		<b>64</b>	74%
<b>amidine</b>	2-phényl-2-imidazoline		-	traces
<b>hydroxylamine</b>	N,O-diméthylhydroxylamine	$\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{NHCH}_3$	-	traces
<b>sulfamide primaire</b>	p-chlorobenzène sulfonamide		-	48% (dont imide supposé 52% en HPLC)
<b>nitroindazole</b>	5-nitroindazole		-	traces
<b>amine sur hétérocycle</b>	2-aminopyridine		-	traces
<b>amine sur hétérocycle</b>	2-amino-benzothiazole		-	46% (dont imide supposé 41% en HPLC)

L'« imide supposé » n'a été ni isolé ni caractérisé par RMN.

### Discussion sur les résultats obtenus :

*Résultats des amines primaires aliphatiques, connues pour être de bons nucléophiles :*

Ces amines réagissent bien puisque les rendements sont quantitatifs : la phénéthylamine conduit au produit **55** avec un rendement de conversion de 90% , la 4-nitrobenzaldéhyde hydrazone conduit à **63** avec un rendement de 99%, la noréphédrine conduit à **59** avec un rendement de 89%, le carboxylate d'éthyle de la phénylalanine conduit à **60** avec 79%

de conversion et enfin le 2-furoïc hydrazide conduit au produit **62** avec 99% de conversion.

La phénylhydrazine réagit très bien aussi mais lors de l'évaporation, la formation du phtalimide **61** ne peut être évitée. Ceci est prouvé par RMN car le proton CO-NH-NH-Ph n'est pas observé et le proton CO-NH-NH-Ph est observé sous forme d'un singulet.

### *Résultats des amines aromatiques*

Ces résultats varient beaucoup selon l'amine impliquée :

- l'aniline se convertit à 90% en **56**. Le 5-amino indazole, une arylamine possédant un substituant électrodonneur sur le cycle adjacent, conduit au produit **64** avec un rendement de 74%. Ces deux arylamines primaires donnent de bons résultats.

- Dans le cas de la N-éthylaniline, aniline secondaire et moins nucléophile, le rendement de conversion en **58** est moins bon (72%).

- Une fonction amine, même primaire, située sur un hétérocycle appauvri, apparaît comme peu nucléophile et la conversion est faible (le 2-aminobenzothiazole donne 46% de conversion dont la moitié d'imide) ou nulle (la 2-aminopyridine ne réagit pas).

D'autres amines ne réagissent pas dans nos conditions : la 2-phénylimidazoline, N,O-diméthylhydroxylamine et le parachlorobenzène sulfonamide.

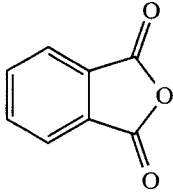
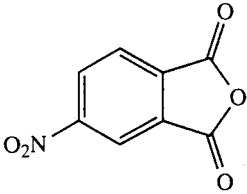
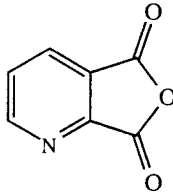
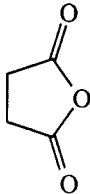
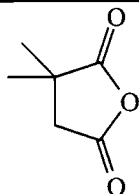
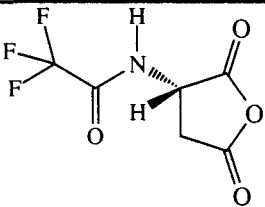
Avec de tels résultats, une décision peut déjà être prise quant aux classes d'amines qui seront gardées et celles qui seront éliminées pour l'automatisation de l'ouverture des anhydrides. Toutes les classes d'amines dont le modèle est une des amines ayant donné un bon rendement dans cette étude (**55** à **64**) seront sélectionnées.

### *II-3-2/ Réactivité des anhydrides avec la phénéthylamine*

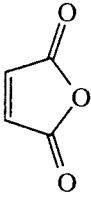
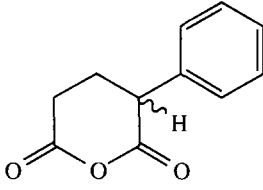
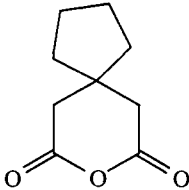
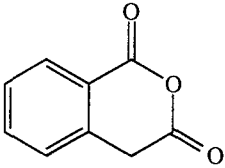
Le tableau 24 rapporte les rendements de conversion HPLC obtenus lors de l'ouverture de ces anhydrides par la phénéthylamine, une amine de référence en matière de nucléophilie.



**Tableau 24 : résultats HPLC de l'ouverture d'anhydrides par la phénéthylamine**

Anhydride	Nom	Formule	N°	Conversion HPLC
- aromatique - cycle à 5 - symétrique	phtalique		55	90%
- aromatique - cycle à 5 - asymétrique	4-nitrophtalique		66 (66/33)	52%
- aromatique - cycle à 5 - asymétrique	2,3-pyridine dicarboxylique		67B (100/0)	71%
- aliphatique - cycle à 5 - symétrique	succinique		68	90%
- aliphatique - cycle à 5 - asymétrique	2,2-diméthyl succinique		69 (63/37)	73%
- aliphatique - cycle à 5 - asymétrique	trifluoroacétyl- L-aspartique		70 (63/37)	87%

**Tableau 24 (suite) : résultats HPLC de l'ouverture d'anhydrides par la phénéthylamine**

- type maléïque	maléïque		71	70%
- aliphatique - cycle à 6 - asymétrique	phényl-2-glutarique		72 (66/33)	88%
- aliphatique - cycle à 6 - symétrique	tétraméthylène-glutarique		73	97%
- mixte - cycle à 6 - asymétrique	homophthalique		74 (100/0)	81%

### Discussion sur les résultats obtenus :

#### *Influence de la taille du cycle de l'anhydride*

Aucune différence significative n'est constatée entre les anhydrides à 5 chaînons conduisant aux produits **68**, **69** et **70** et les anhydrides à 6 chaînons conduisant aux produits **72**, **73**. Les rendements de conversion possèdent des valeurs comprises entre 73 et 97%.

*Influence de la présence d'une double liaison ou d'une liaison aromatique dans le cycle :*

La comparaison de la conversion de l'anhydride phtalique en produit **65** avec un rendement de 90% contre celle de l'anhydride succinique en produit **68** avec également un rendement de 90% montre qu'il n'y a pas de différence entre les anhydrides

aliphatiques et les anhydrides possédant un cycle annelé. La conversion de l'anhydride phényl-2-glutarique en produit **72** avec un rendement de 88% et celle de l'anhydride homophthalique en produit **74** avec un rendement de 81% sont, elles aussi la preuve qu'il n'existe pas de différence entre les anhydrides aromatiques et les aliphatiques, même s'il était concevable que la présence d'un cycle aromatique puisse stabiliser la forme anhydride.

Les rendements de conversion plus faibles des composés **66** et **67B** ne s'expliquent pas par un manque de réactivité mais plutôt par un manque de stabilité des anhydrides correspondants.

Dans l'ensemble, les résultats sont vraiment bons quels que soient les anhydrides. Toutes les classes d'anhydrides seront retenues pour l'automatisation.

### **III/ STEREOCHIMIE DE L'ATTAQUE NUCLEOPHILE DES ANHYDRIDES**

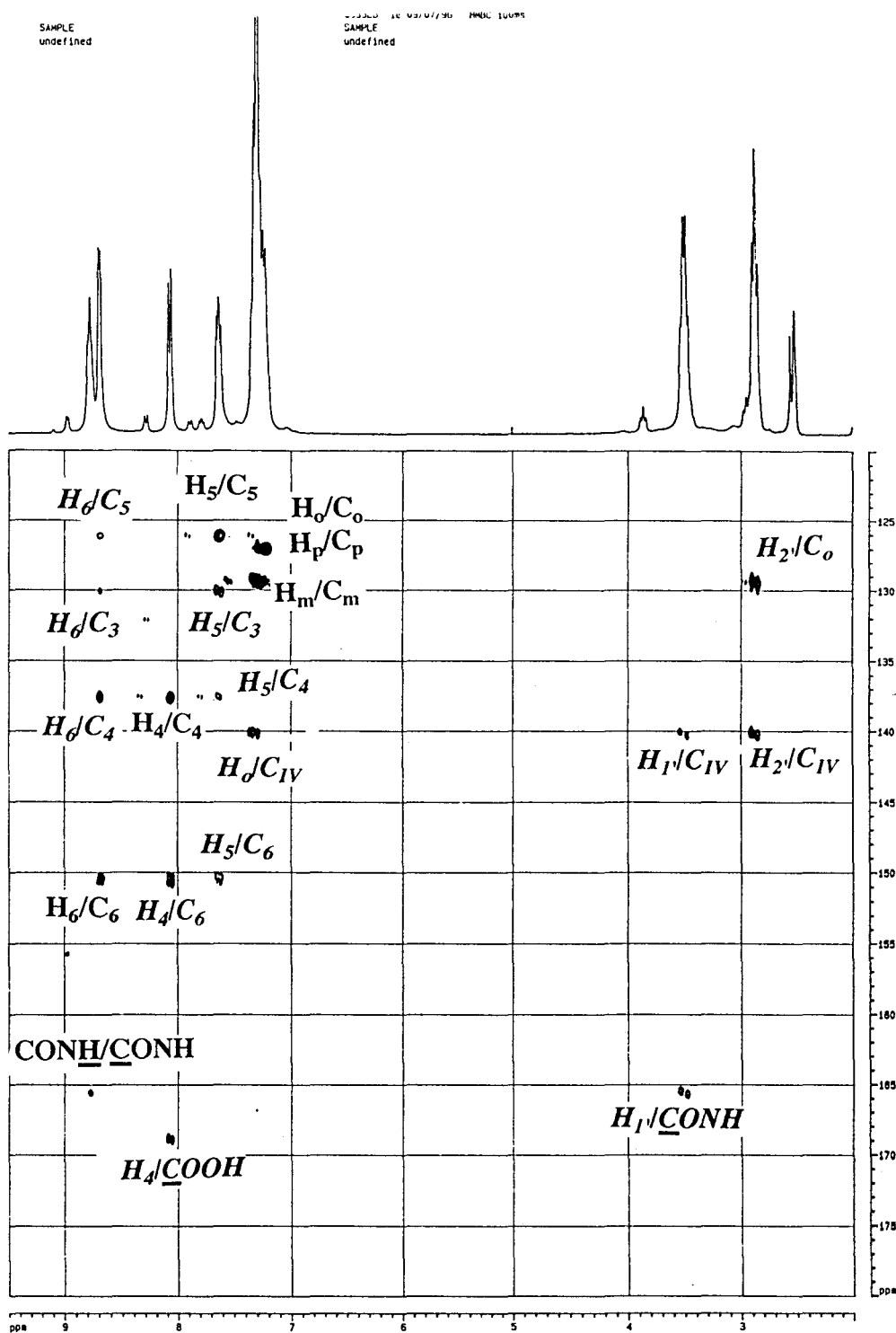
Classiquement, l'attaque des anhydrides cycliques asymétriques par une amine se traduit par l'obtention de 2 régioisomères en quantités relatives variant de 0 à 100 % (comme nous l'avons vu pour l'anhydride 2,2-diméthylsuccinique plus haut, schéma 66)

L'analyse HPLC permet de détecter l'existence de deux régioisomères, mais sans pouvoir chiffrer le pourcentage relatif de l'un par rapport à l'autre. L'étude RMN confirme l'existence des deux régioisomères et permet de déterminer ce pourcentage relatif.

Le plus souvent, les deux régioisomères n'ont pas été séparés, nous avons uniquement calculé leur rapport, qui dans la majorité des cas variait de 30/70 à 50/50. En effet, il n'est pas prévu de séparation des isomères lors de la production robotique. Si un positif est détecté et qu'il provient de l'ouverture d'un anhydride asymétrique, la séparation des régioisomères sera envisagée à ce moment-là.

Dans le cas où un seul régioisomère est obtenu, il est intéressant de savoir lequel et pourquoi.

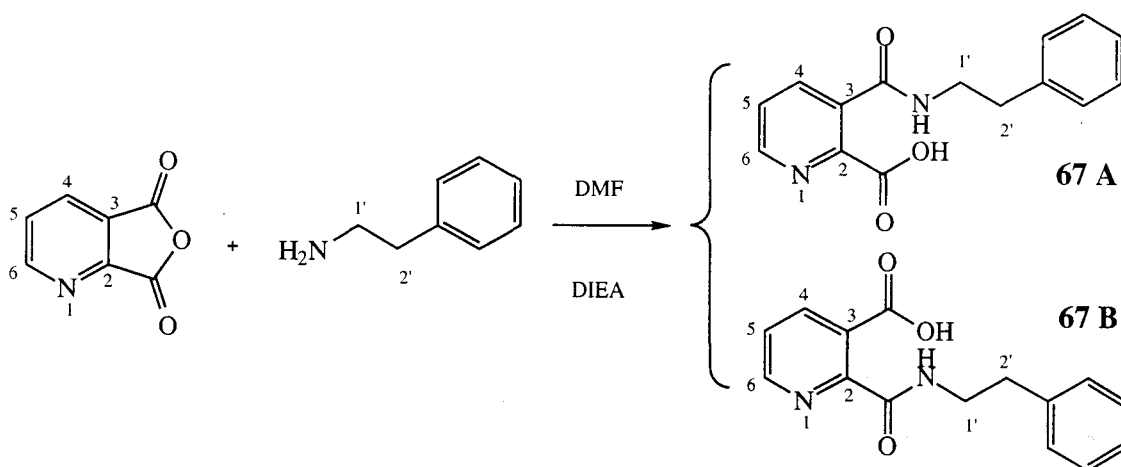
Schéma 87 : Spectre RMN du produit 67



### III-1/ Etude de la régioisomérisie de l'attaque d'un anhydride par une amine

L'ouverture de l'anhydride pyridine-2,3-dicarboxylique par la phénéthylamine peut théoriquement conduire à deux régioisomères (schéma 86). En pratique un seul est obtenu.

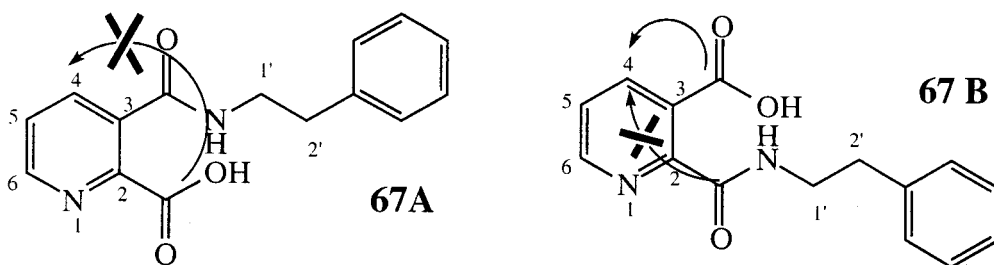
**Schéma 86** : Ouverture de l'anhydride pyridine-2,3-dicarboxylique par la phénéthylamine



Les analyses RMN du proton et du  $^{13}\text{C}$ , ainsi que les analyses **HSQC** (Hetero Single Quantum Coherence) et **HMBC** (Heteronuclear Multiple Bound Correlation) permettent l'attribution de tous les signaux et la détermination de la formule du seul régioisomère obtenu. L'analyse par HSQC permet de corréler un carbone au(x) proton(s) qu'il porte ( $^1\text{J}$ ) par excitation « inverse », c'est-à-dire que l'excitation du proton est transférée sur le carbone. L'analyse HMBC, quant à elle, permet de corréler un carbone, non seulement au(x) proton(s) qu'il porte ( $^1\text{J}$ ) mais aussi aux protons plus éloignés ( $^2\text{J}$ ,  $^3\text{J}$ ,  $^4\text{J}$ ).

La corrélation hétéroatomique de type HMBC entre le carbone de la fonction acide carboxylique  $\text{COOH}$  ( $\delta=169$  ppm) et le proton  $\text{H}_4$  ( $\delta=8,1$  ppm) est en faveur de la forme **67 B** comme le montre la flèche pleine sur le schéma 88 et le spectre RMN ci-contre (schéma 87).

**Schéma 88** : Corrélations observées sur les régioisomères **67A** et **67B**



Cette corrélation n'existe pas entre le carbone porteur de la fonction carboxamide  $\text{CONH}$  ( $\delta=166$  ppm) et ce même proton  $\text{H}_4$  (comme le montre la flèche barrée dans la formule **67 B**). Cette corrélation ne pourrait pas non plus exister dans **67 A** car les protons concernés sont trop éloignés (comme le montre la flèche barrée dans la formule **67 A**).

Dans le cas étudié, l'effet de l'azote de la pyridine, souvent comparé à celui d'un groupe nitro, est attracteur, ce qui rend le carbone 2 certainement plus électrophile que le carbone 3. L'attaque nucléophile a lieu préférentiellement sur le carbone 2.

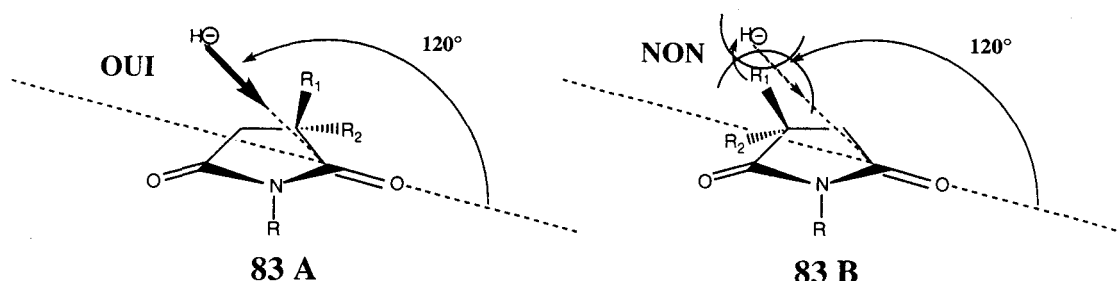
Notons aussi que cet anhydride est très instable puisqu'il contient un azote nucléophile interne. Il est hydrolysé dans le pot « spontanément » et il faut le déshydrater juste avant utilisation.

### III-2/ Quelques éléments pour comprendre l'attaque nucléophile sur le groupe carbonyle.

Il est convenu d'admettre que l'angle d'attaque des nucléophiles sur un carbonyle n'est pas de  $90^\circ$  par rapport au plan délimité par le carbonyle et ses substituants directs<sup>59</sup>. L'attaque nucléophile de  $\text{H}^-$  sur un carbonyle a été étudiée et il a été démontré que celle-ci était influencée par l'encombrement stérique des carbones adjacents au carbonyle. Speckamp *et al.*<sup>60</sup>, par exemple, ont étudié l'attaque nucléophile de  $\text{H}^-$  sur des succinimides mono et disubstitués. Ils en concluent que l'angle formé entre le plan du cycle « succinimide » et  $\text{H}^-$  est d'environ  $120^\circ$  comme le montre le schéma 89. L'attaque de  $\text{H}^-$  se fait majoritairement dans un sens précis (noté **OUI** sur le schéma), celui où les

deux substituants ne gênent pas l'approche du nucléophile. Dans l'autre cas, noté **NON**,  $R_1$  ou  $R_2$  gênent  $H^-$ .

**Schéma 89** : Approche de  $H^-$  sur un succinimide gem-disubstitué selon Speckamp



Si les groupements  $R_1$  et  $R_2$  sont maintenant placés sur un anhydride succinique, l'attaque nucléophile par une amine a des chances de suivre une règle similaire si on considère que  $R_1$  et  $R_2$  sont volumineux et jouent uniquement un rôle « stérique ». Dans le cas de l'anhydride 2,2-diméthylsuccinique nous supposons que l'amido acide majoritairement obtenu possède les deux méthyles géminés en alpha de la liaison amide. En pratique, un mélange de régioisomères (63/37) est obtenu.

Il a aussi été démontré par d'autres auteurs<sup>61</sup> que la réduction des glutarimides encombrés suivait une règle inverse. Si dans les succinimides, le côté le plus encombré était réduit préférentiellement, dans le cas des glutarimides, c'est le côté inverse, là aussi pour des raisons d'encombrement du site électrophile. Il nous resterait à démontrer que dans le cas des anhydrides glutariques, le côté le moins encombré réagit majoritairement. Nous ne ferons pas cette étude car la règle proposée ne dépend que de l'encombrement stérique, et ne tient pas compte des propriétés électroniques des substituants, facteurs qui peuvent être déterminants dans certains des cas que nous avons étudiés.

## IV/ PREPARATION DE LA PRODUCTION

### IV-1/ Sélection des synthons

La bibliothèque de validation a permis de connaître quelles classes d'amines et d'anhydrides réagissent dans notre projet. Les résultats des études de solubilité et de pureté connus, il s'agit maintenant d'effectuer le recrutement des synthons et décider du nombre d'anhydrides et d'amines utilisés.

Nous disposons d'environ 500 amines et de 60 anhydrides purs et solubles aux concentrations de l'étude.

### IV-2/ Choix du « format »

Dans un plaque, 80 produits sont synthétisés en parallèle.

*Les deux possibilités les plus simples de répartition par plaque sont :*

1 amine x 80 anhydrides *ou* 80 amines x 1 anhydride.

Nous optons pour 80 amines x 1 anhydride par plaque, car nous envisageons de préparer les 60 solutions d'anhydrides extemporanément, progressivement au cours de chaque journée de production, compte tenu de leur faible stabilité en solution dans le DMF. Leur séjour en solution des anhydrides sera le plus court possible. 60 plaques seront donc produites par jour.

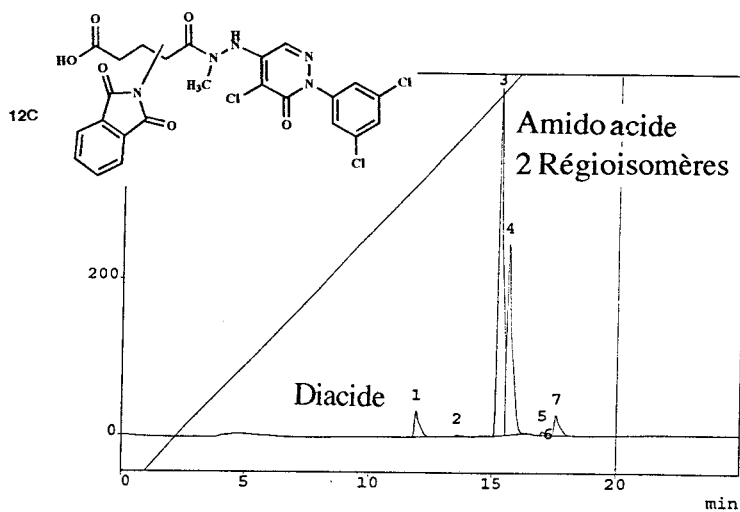
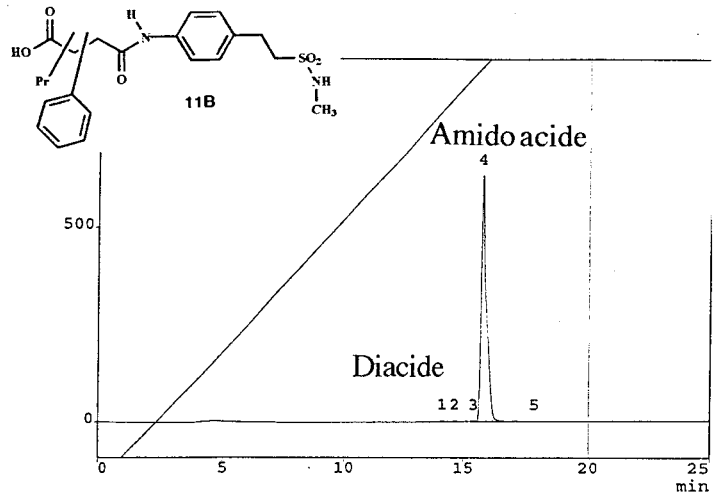
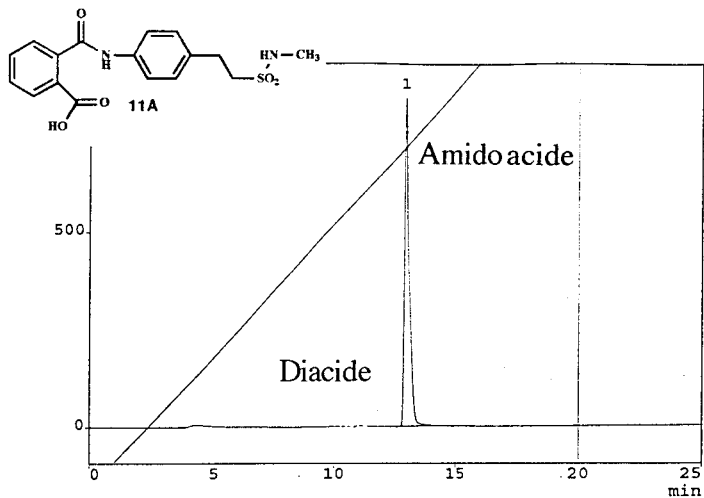
Le nombre d'amines sélectionnées sera un multiple de 80.

Les *amines* pures et solubles sont modélisées pour obtenir 480 amines réparties en 6 groupes de 80.

Les *anhydrides* purs et solubles ne sont pas modélisés, ils ont déjà été choisis selon des critères de diversité. Un nombre multiple de 4 est utilisé en synthèse car 4 seront solubilisés et distribués en parallèle.



Schéma 91 : Chromatogrammes des produits 11A, 11B et 12C



### IV-3/ Etablissement d'un plan de production

Chaque jour, 80 amines différentes ouvrent les 60 anhydrides. Les amines sont mises en solution au début de la journée et distribuées dans 4 plaques en parallèle. 4 anhydrides sont solubilisés en parallèles et distribués sur les amines.

## IV/ QUELQUES RESULTATS DE LA PRODUCTION

Les rendements sont évalués après une hydrolyse basique du milieu réactionnel : l'anhydride qui n'a pas réagi s'hydrolyse en diacide. La quantité de diacide restant, étalonnée par HPLC, permet de calculer la conversion en amido acide et d'évaluer la qualité de la réaction.

Les produits contrôlés ici ont d'abord été synthétisés manuellement dans les mêmes quantités et le même format.

### V-1/ Résultats du premier jour de production

Schéma 90 : Rendement de disparition des diacides

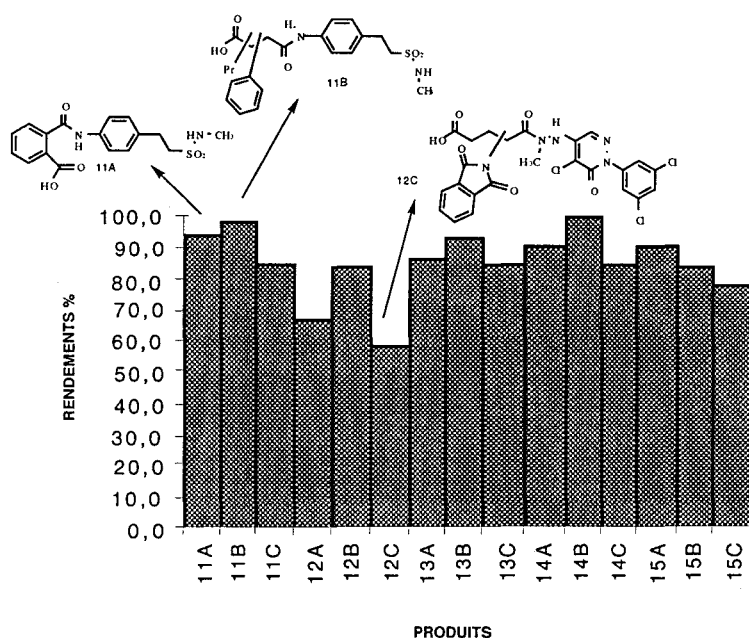
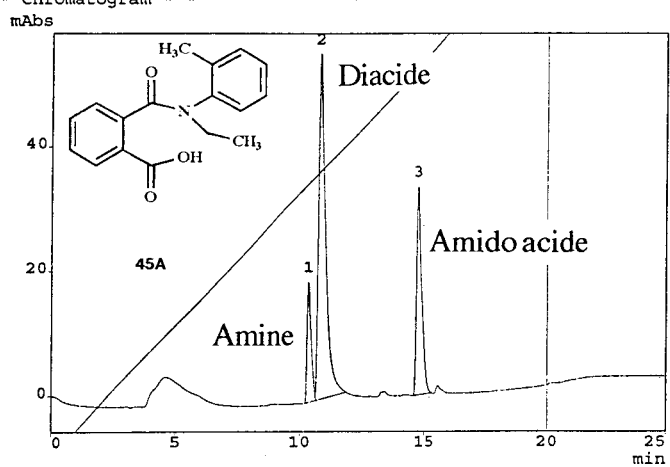


Schéma 93 : Chromatogramme du produit 45A

\*\*\* Chromatogram \*\*\*



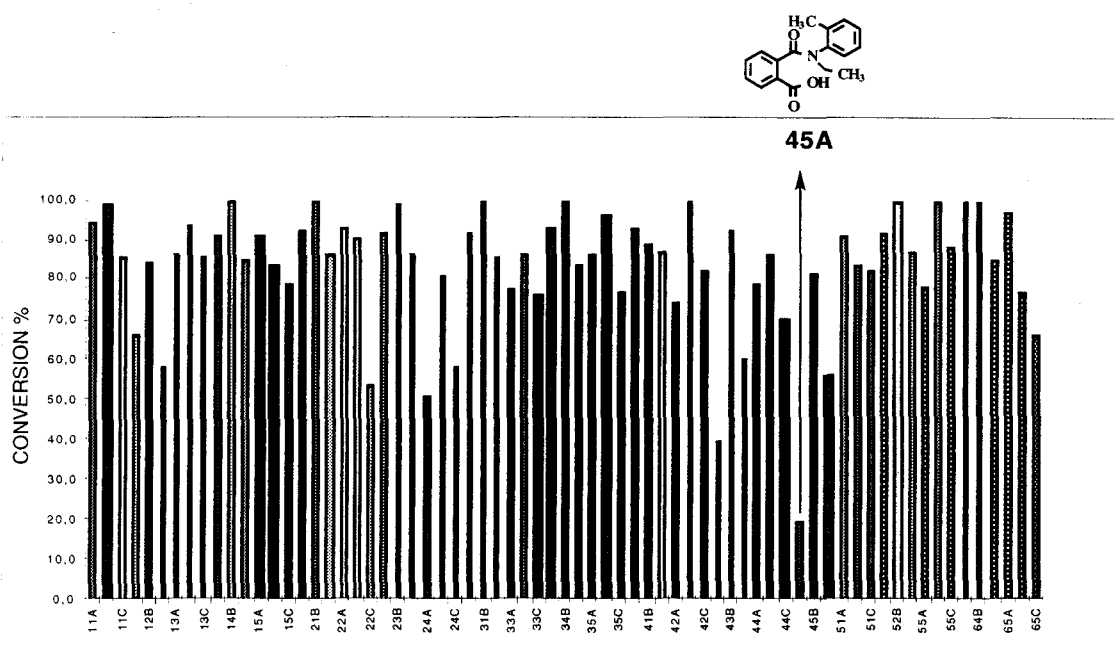
## Discussion :

Les rendements de la première journée sont conformes à nos attentes et se situent presque tous au-delà de 70%. Sur les trois chromatogrammes ci-joints (schéma 91), le principal contaminant, on le voit, est le diacide puisque le milieu réactionnel a été hydrolysé du milieu réactionnel. Dans le cas du composé **12C**, deux régioisomères sont obtenus car ils proviennent de l'ouverture de l'anhydride asymétrique N-phthaloyl glutarique.

## V-2/ Résultats de tous les contrôles :

Tous les résultats du contrôle qualité de la production sont schématisées par l'histogramme du schéma 92.

Schéma 92 : Tous les rendements des produits contrôlés

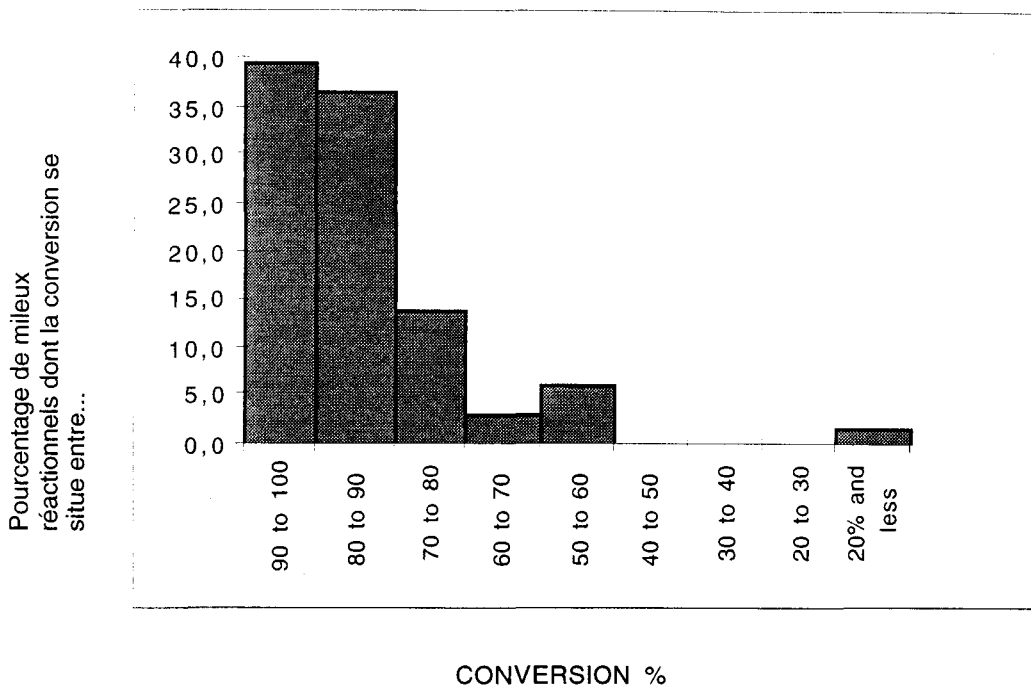


Les moins bons rendements sont obtenus avec les anilines secondaires. Cette observation était prévisible puisque ces arylamines secondaires sont de moins bons nucléophiles (la N-éthylaniline donnait un rendement de conversion en produit **58** de 72%). Dans le cas du produit **45A**, l'anhydride n'est pas à mettre en jeu puisque, il s'agit de l'anhydride phtalique, bon électrophile. Le schéma 93, ci-contre est le chromatogramme du milieu réactionnel, celui-ci se limite à 3 composés : le diacide et l'amine d'une part, le produit de la réaction d'autre part.

### V-3/ Répartition statistique des rendements

Comme le montre le schéma 94, la majorité des rendements de disparition des diacides se situe entre 80 et 100%

Schéma 94 : Répartition statistique des rendements



La répartition statistique est une autre façon de présenter tous les résultats du contrôle qualité. L'interprétation en est la même : la bibliothèque a donné de bons rendements. Les rendements les moins bons sont obtenus avec les amines les moins nucléophiles, nous n'avons pas observé de dégradation des synthons dans les milieux réactionnels contrôlés. Il y a enfin une parfaite reproductibilité entre les synthèses effectuées manuellement et les synthèses automatisées.

### VI/ CONCLUSION :

La bibliothèque présentée ici est un exemple de dimérisation simple mais conduisant à des molécules déjà complexes et intéressantes du point de vue de leur diversité.

Si un produit positif est identifié, ses coordonnées dans la plaque permettent d'en connaître immédiatement la structure. Dans le cas où le produit serait la conséquence d'une réaction secondaire, son identification sera facilitée car au cours de la préparation de

la bibliothèque, les synthons, les conditions expérimentales, l'environnement et les mouvements du robot ont été enregistrés. La bibliothèque répond aux exigences de la bibliothèque idéale énoncées au début du chapitre 1.

# CHAPITRE III :

## UTILISATION DES MICRO-ONDES

### POUR LA SYNTHÈSE DE PYRIDAZINEDIONES

#### I/ INTERET DU CHAUFFAGE PAR LES MICRO-ONDES EN SYNTHÈSE ORGANIQUE RAPIDE

Le principe du chauffage aux micro-ondes, permettant un transfert rapide d'énergie dans de petits volumes de milieu réactionnel présente des avantages indéniables pour la synthèse en parallèle. Ce sont les petites molécules polaires comme les molécules d'eau, d'acide acétique, d'acétonitrile qui réagissent le mieux à l'excitation. Elles sont donc utilisées comme solvant, la montée en température est quasi-instantanée.

Les temps de réaction sont en général considérablement raccourcis, ce qui évite beaucoup de réactions secondaires et conduit donc à des milieux réactionnels beaucoup plus simples<sup>62</sup>.

Dans la travail développé dans ce chapitre, nous avons cherché à synthétiser une structure hétérocyclique dans laquelle la diversité est apportée par deux partenaires : un anhydride cyclique d'une part et une hydrazine d'autre part. L'intérêt d'une telle structure, par rapport aux dérivés précédents est de conférer une orientation plus précise des substituants porteurs de diversité.

## II/ SYNTHESE DE PYRIDAZINEDIONES<sup>63</sup>

Ce travail a fait l'objet d'une publication :

« Improved synthesis of pyridazinediones under microwave irradiation »

L. Bourel, A. Tartar, P. Melnyk

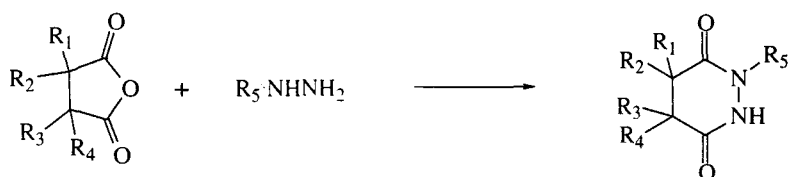
*Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, (24), 4145-4148

Même si le squelette des pyridazines est connu depuis plus d'un siècle<sup>64</sup> et la première synthèse a été décrite en 1895<sup>65</sup>, son réel développement n'est apparu que très récemment<sup>66</sup>. Cet hétérocycle est maintenant rencontré dans des classes thérapeutiques aussi variées que les anti-inflammatoires<sup>67</sup>, les antidépresseurs<sup>68</sup>, les neuroleptiques...

### II-1/ Méthodes classiques de synthèse des pyridazinediones

La méthode la plus utilisée pour synthétiser les pyridazinediones substituées est la condensation entre des anhydrides cycliques et des hydrazines (schéma 95). Cette réaction est généralement réalisée dans l'acide acétique. Selon la nature de l'anhydride<sup>69</sup>, les conditions de réaction varient entre 1h à température ambiante et 24h au reflux de l'acide acétique. Ces conditions peuvent provoquer une dégradation non négligeable des hydrazines sensibles, conduisant à des milieux réactionnels dont la complexité n'est pas compatible avec les exigences de la chimie combinatoire. Nous avons décidé d'employer des conditions plus douces que le reflux.

**Schéma 95** : formation des pyridazinediones





## II-2/ Mise au point des conditions sur une réaction modèle (tableau 25)

L'irradiation aux micro-ondes est particulièrement adaptée aux réactions impliquant l'élimination d'une molécule d'eau. Comme c'était le cas ici, nous avons décidé d'étudier la synthèse des pyridazinediones en utilisant cette technique.

Une étude préliminaire a mis en jeu l'anhydride succinique et la phénylhydrazine dans l'acide acétique dans différentes conditions. L'irradiation aux micro-ondes permet un raccourcissement considérable des temps de réaction : des rendements comparables ont été obtenus avec 2 min d'irradiation dans un four domestique, 4 min d'irradiation à la puissance de 500W dans un four de laboratoire, tandis que dans les conditions classiques, cette même réaction nécessitait 4 heures d'agitation à température ambiante.

**Tableau 25** : réaction entre l'anhydride succinique et la phénylhydrazine

essai n°	methodologie	concentration (M)	conditions	temps de réaction	rdt (%)
1	traditionnelle à ta	0,2	t.a.	4 h	85%
2	four domestique	0,2	puissance 2	2 min	86-88%
3	four de laboratoire	0,2	315 W	6 min	86%
4	four de laboratoire	0,2	500 W	2 min	85%
5	four de laboratoire	0,05	500 W	4 min	87%

## II-3/ Exploration de la généralité de la réaction. Recherche de ses limites

### II-3-1/ Déclinaison des anhydrides (tableau 26)

Pour accroître l'étendue de cette méthode, nous avons exploré la réaction entre la phénylhydrazine et différents anhydrides. Dans ce cas, un four micro-ondes de laboratoire<sup>70</sup>, dont la puissance peut être ajustée précisément, a été utilisé. Avec des temps d'irradiation courts (de 2 à 4 min), les pyridazinediones désirées ont été obtenues avec des rendements identiques ou souvent meilleurs que ceux obtenus par la méthode classique. Dans deux cas, l'irradiation aux micro-ondes a été la seule méthode permettant d'obtenir les pyridazinediones désirées. En effet, pour les réactions lentes, une

augmentation du temps de contact dans la méthode classique se traduit par l'apparition de nombreux produits de dégradation.

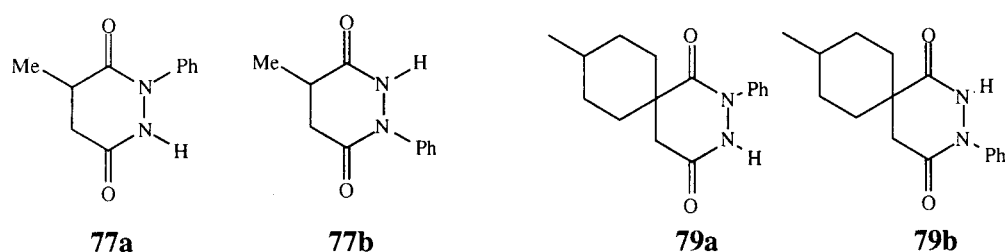
L'examen des milieux réactionnels nous a permis de faire un certain nombre d'observations :

- Lors de l'essai 80, par chauffage aux micro-ondes, nous avons détecté, en sus du produit attendu formé avec un rendement de 74%, la formation du 2-anilinophthalimide. Aucune conversion n'est obtenue par la méthode traditionnelle dans nos conditions. Par contre, selon la littérature<sup>71</sup>, le phthalimide est généralement le produit majoritaire quand des temps de réaction plus longs ou des températures supérieures sont appliqués.

- Une autre observation intéressante concerne le cas des anhydrides asymétriques pour lesquels les deux méthodologies conduisent à des résultats différents.

En utilisant la méthode traditionnelle, les 2 régioisomères possibles ont été obtenus (**77a**, **77b**, **79a**, **79b** pour deux cas différents ci-contre) comme nous avons pu le voir par une HPLC phase inverse du milieu réactionnel.

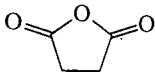
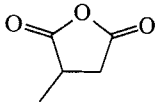
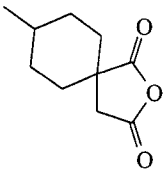
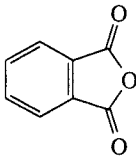
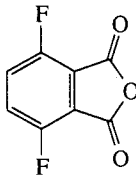
#### Schéma 96 : Couples de régioisomères



Au contraire, dans les deux cas, un seul des 2 isomères possibles a été obtenu par irradiation aux micro-ondes. Dans la méthode traditionnelle, il s'agit du produit minoritaire. L'étude par RMN 2D en utilisant les techniques de HSQC et HMBC nous a permis d'établir cette structure comme la plus encombrée des deux, soit **77a** et **79a**. Cette régiosélectivité n'est pas un effet des micro-ondes puisque elle a aussi été mise en évidence quand la réaction dite « traditionnelle » se déroule au reflux de l'acide acétique

et non plus à température ambiante. Dans ce cas précis, le rendement est moins bon que celui obtenu par la méthode aux micro-ondes. L'explication suivante peut être proposée : dans le cas d'un reflux, la montée en température est plus lente et cela laisse le temps à la phénylhydrazine de se décomposer dans l'acide acétique, alors qu'en utilisant les micro-ondes. La montée en température est tellement rapide que les réactifs n'ont pas le temps de se dégrader.

**Tableau 26** : réaction de la phénylhydrazine avec différents anhydrides

Produit n°	anhydride	méthodologie	temps de réaction	rdt (%) (a)
75		traditionnelle	4 h	85
76		MW	4 min	87
77		traditionnelle	24 h	80 (b)
78		MW	4 min	80
79		traditionnelle	24 h	45 (c)
80		MW	4 min	74
81		traditionnelle	48 h	0
82		MW	2 min	72
83		traditionnelle	48 h	0
84		MW	2 min	87

MW : irradiation aux micro-ondes 500W. (a) produits isolés par chromatographie « flash »  
 (b) mélange de deux régioisomères : 65 / 35. (c) mélange de deux regioisomères : 60 / 40.

### II-3-2/ Déclinaison des hydrazines (tableau 27)

Pour continuer d'étendre l'applicabilité de la méthode à d'autres réactifs, nous avons étudié la réaction de l'anhydride succinique avec différentes hydrazines. Un des problèmes rencontrés avec la méthode classique est la mauvaise solubilité des chlorures d'hydrazines (la forme généralement commerciale) dans l'acide acétique. Même si l'utilisation d'autres solvants comme le mélange DMF/AcOH résout ce problème, les rendements correspondants sont bien moins bons. Cependant, la réaction de l'anhydride succinique et du chlorure de phénylhydrazine dans un mélange DMF/AcOH 3/1 conduit à la pyridazinedione correspondante avec un rendement de 80% après 24h de réaction à température ambiante.

**Tableau 25** : réaction de l'anhydride succinique avec différentes hydrazines

Produit n°	hydrazine	méthodologie	temps de réaction	rdts (%)
85	2-MePhNHNH <sub>2</sub> . HCl	traditionnelle (a)	48 h	50
86		MW	4 min	70
87	3-ClPhNHNH <sub>2</sub> . HCl	traditionnelle (a)	6 h	64
88		MW	4 min	82
89	4-BrPhNHNH <sub>2</sub> . HCl	traditionnelle (a)	6 h	70
90		MW	4 min	76
91	PhCH <sub>2</sub> NHNH <sub>2</sub> . 2 HCl	traditionnelle (a)	48 h	0 (b)
92		MW	2 min	40 (c)

MW : irradiation aux micro-ondes 500W. (a) 0,05 M dans un mélange DMF/AcOH (3/1).

(b) petite évolution du milieu réactionnel, beaucoup de produits apparaissent. (c) dégradation de la benzylhydrazine sous irradiation aux micro-ondes.

### III/ CONCLUSION

Dans ces expériences, l'irradiation aux micro-ondes améliore les rendements et raccourcit les temps de réaction. Dans le cas de la benzyldiazine, nous pouvons même isoler le dérivé désiré avec un rendement moyen en utilisant la technique des micro-ondes, alors qu'aucun produit n'était identifiable dans le mélange complexe obtenu avec la méthode traditionnelle à température ambiante.

L'irradiation aux micro-ondes permet d'obtenir simplement et rapidement diverses pyridazinediones avec de très bons rendements. Un temps de réaction court limite les risques d'altération des composés sensibles qui conduisaient souvent à des mélanges complexes en utilisant la méthode traditionnelle.

Cette technique est donc adaptée aux exigences de la synthèse combinatoire puisqu'elle limite les réactions secondaires. Elle conduit aux produits de réaction avec de bons rendements et élargit le champ d'application de la méthode traditionnelle.



## Improved Synthesis of Pyridazinediones Under Microwave Irradiation

Line Bourel, André Tartar and Patricia Melnyk \*

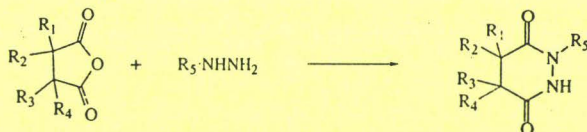
Laboratoire de Pharmacochimie  
Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr Calmette, 59000 Lille (France).

**Abstract:** Pyridazinediones have been synthesized with good to excellent yields under microwave irradiation. The results were compared with traditional stirring.

Copyright © 1996 Published by Elsevier Science Ltd

Although the pyridazine moiety was known for a century<sup>1</sup> and the first synthesis reported as early as 1895<sup>2</sup>, its high development only emerged recently<sup>3</sup>. This heterocycle is now encountered in various therapeutic classes such as anti-inflammatories<sup>4</sup>, antidepressants<sup>5</sup>, neuroleptics,...

The most usual method for the synthesis of substituted pyridazinediones is the condensation of cyclic anhydrides with hydrazines (scheme 1). This reaction is classically performed in acetic acid. Depending upon the nature of the anhydride<sup>6</sup>, reaction conditions can vary from 1 hour at room temperature to 24 hours at solvent reflux. As these conditions may induce significant degradation of sensitive hydrazines, we have attempted to define milder conditions. Microwave irradiation is particularly suitable to perform reactions in which elimination of a water molecule is involved. As this was the case here, we have investigated the synthesis of pyridazinediones using this method.

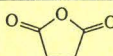
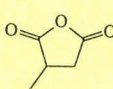
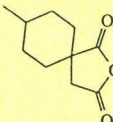
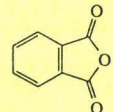
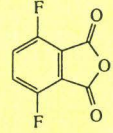


Initial trials were performed by reacting succinic anhydride and phenylhydrazine in acetic acid in various conditions. Microwave irradiation allowed a drastic reduction of reaction times : comparable yields were obtained using 2 min irradiation time in a domestic microwave oven, 4 min with a power of 500 W in a laboratory oven, while in classical conditions, the reaction requires 4 hours stirring at room temperature.

Assay	Method	Concentration (M)	Conditions	Reaction time	Yield (%)
1	T	0.2	r.t.	4 h	85%
2	domestic MW	0.2	power 2	2 min	86-88%
3	laboratory MW	0.2	315 W	6 min	86%
4	laboratory MW	0.2	500 W	2 min	85%
5	laboratory MW	0.05	500 W	4 min	87%

T: traditional stirring at r.t., MW : microwave  
Table 1: Reaction between succinic anhydride and phenylhydrazine

In order to extend the scope of this method, the reaction of phenylhydrazine with various anhydrides was then investigated <sup>7</sup>. In this case, a laboratory oven <sup>8</sup> in which power can be precisely adjusted was used. As can be seen in table 2, using short irradiation periods (2 to 4 min), the corresponding pyridazinediones were obtained in similar (assay 2 and 4) or higher (assay 6) yields than using the classical method. Moreover, in two cases (assay 8 and 10), microwave irradiation was the only method leading to the expected derivatives. Increasing reaction times with the classical method led only to an extensive formation of degradation products (assay 7 and 9).

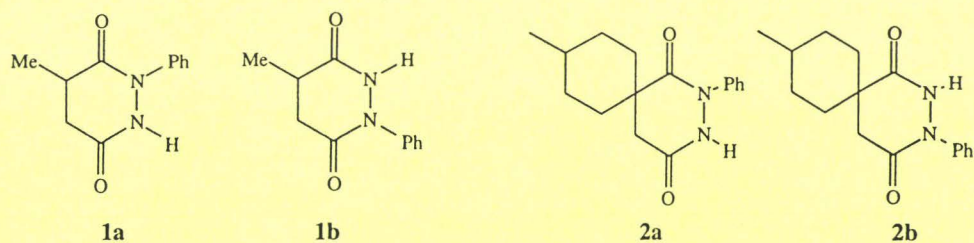
Assay	Anhydride	Method	Time	Yield (%) (a)
1		T	4 h	85
2		MW	4 min	87
3		T	24 h	80 (b)
4		MW	4 min	80
5		T	24 h	45 (c)
6		MW	4 min	74
7		T	48 h	0
8		MW	2 min	72
9		T	48 h	0
10		MW	2 min	87

T: traditional stirring at r.t.. MW : 500W microwave irradiation. (a) products isolated by flash chromatography. (b) mixture of the two regioisomers: 65 / 35. (c) mixture of the two regioisomers: 60 / 40.

Table 2 : Reaction of phenylhydrazine with various anhydrides

2-Anilinophthalimide was also obtained in assay 8, but as a by-product (23%). It could not be detected in assay 7, even if it was often the major product of the reaction according to the literature <sup>9</sup>.

For asymmetric anhydrides (assay 3 to 6), the two methodologies provide different results. Using the traditional methodology (assay 3 and 5), the two possible regioisomers were obtained (1a, 1b and 2a, 2b) as shown by reverse phase HPLC of the reaction medium. On the contrary, in both cases, only one isomer was obtained with MW irradiation (assay 4 and 6), identified as the minor isomer of previous experiments. Study of the 2D-NMR HSQC and HMBC spectra<sup>10</sup> allowed us to establish their structure as corresponding to the most hindered isomers **1a** and **2a**. This high regioselectivity is not a microwave effect since it was also observed when the reaction was conducted traditionally in refluxing acetic acid (concentration = 0.2M, reflux 1h, 58% yield) instead of room temperature. The lower yield can be explained by a slower rise in temperature leading to the degradation of phenylhydrazine in acetic acid, which does not occur by microwave irradiation.



scheme 2

In order to further extend the usefulness of this method, the reaction of succinic anhydride with various hydrazines was investigated (Table 3). One of the problems encountered with the classical method is that hydrazine hydrochlorides (which are generally the commercially available form) are not soluble in acetic acid. Although the use of other solvents such as a DMF / AcOH mixture overcomes this problem, the corresponding yields were significantly lower. In fact, reaction of succinic anhydride with phenylhydrazine chlorhydrate in a DMF/AcOH : 3/1 solution provided the corresponding pyridazine with a 80% yield after a 24 hours reaction time at room temperature (instead of a yield of 84% after 4h stirring).

Again, in these experiments, microwave irradiation improved yields and shortened reaction times. In the case of benzylhydrazine, we could isolate the desired derivative in a moderate yield (assay 18) using MW methodology whereas no product could be identified from the complex mixture obtained with a traditional room temperature stirring (assay 17).

In conclusion, microwave irradiation provides a simple and versatile method to prepare various pyridazinediones in high yield. The short reaction times minimize the alteration of sensitive compounds which often lead to complex mixtures following the traditional methods.



Assay	Hydrazine	Method	Reaction time	Yield (%)
11	2-MePhNHNH <sub>2</sub> · HCl	T (a)	48 h	50
12		MW	4 min	70
13	3-ClPhNHNH <sub>2</sub> · HCl	T (a)	6 h	64
14		MW	4 min	82
15	4-BrPhNHNH <sub>2</sub> · HCl	T (a)	6 h	70
16		MW	4 min	76
17	PhCH <sub>2</sub> NHNH <sub>2</sub> · 2 HCl	T (a)	48 h	0 (b)
18		MW	2 min	40 (c)

T: traditional stirring at r.t.. MW : 500W microwave irradiation. (a) 0.05 M in a DMF / AcOH : 3/1 solution.(b) little evolution of the reaction media, a lot of products appeared. (c) degradation of benzylhydrazine with microwave irradiation.

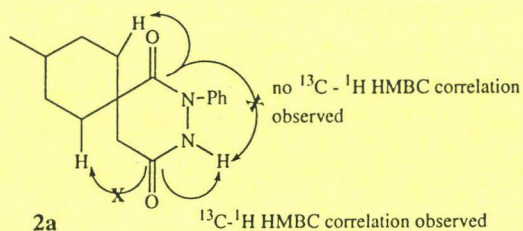
Table 3 : Reaction of succinic anhydride with various hydrazines

### Acknowledgments

We wish to thank Glaxo Research Laboratory for financial support, A. Lemaire for technical assistance and J.-M. Wieruszski for NMR assistance.

### References

- (1) Fischer, E. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1886**, 236, 147-160.
- (2) Taüber, E. *Ber.* **1895**, 28, 451-469.
- (3) Gottfried, H.; Hannelore, F. *Progress in Medical Chemistry* **1990**, 27, 1-49.
- (4) Negwer, M. *Organic Chemical Drugs and Synonyms* (Akademie - Verlag Berlin) **1987**, I-III.
- (5) Wermuth, C. G. *Actual. Chim. Thér.* **1985**, 12, 3-35.
- (6) Pilleboue-Melnyk, P. Doctorat de l'Université Paris VI (the 26th january 1993).
- (7) Typical procedure: To a solution of anhydride (0.1 mmol) in glacial acetic acid (2 ml) was added hydrazine (0.1 mmol). The resulting mixture was irradiated in a CEM SAM 155 microwave oven (500 W) for 2 - 6 min. and evaporated. The solid was purified by flash chromatography (pentane / EtOAc) to provide the desired compound which was analyzed (TLC, HPLC) and characterized (NMR).
- (8) Domestic microwave oven: Arthur Martin 506 25. Laboratory microwave oven : CEM SAM 155.
- (9) Katritzky, A.R.; Rees, C.W. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry* (Pergamon Press - Oxford) **1984**, vol. 3, 47.
- (10) HSQC (Hetero Single Quantum Coherence): <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H shift-correlation experiment in reverse mode (<sup>1</sup>J), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation): <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H long range shift-correlation experiment in reverse mode (<sup>1</sup>J, <sup>2</sup>J, <sup>3</sup>J, <sup>4</sup>J). HMBC correlation spots between C and H were reported below, the same correlation systems were observed for compound **1a**.



(Received in France 11 April 1996; accepted 17 April 1996)

## **CONCLUSION**

## CONCLUSION GENERALE

Dans ce mémoire, nous avons abordé un ensemble de domaines de la chimie organique appliquée à la découverte de nouveaux médicaments :

Partant d'un besoin concret en molécules actives dans le cas de la maladie de Chagas, nous nous sommes penchés sur les moyens d'accéder rationnellement à un médicament antiparasitaire en comprenant le mécanisme de résistance au stress oxydatif, une des défenses de l'hôte de *T. cruzi*. Nous avons contribué à la mise au point de la synthèse du trypanothion en phase solide. Ceci a permis, d'une part, d'alimenter le test de criblage mis au point au laboratoire et ouvre, d'autre part, une voie pour l'accès rationnel à des molécules analogues de ce ligand naturel. Ce travail nous a permis d'apprendre à utiliser les techniques de synthèse peptidique en phase solide. Le test de criblage mis au point au laboratoire permet de découvrir rapidement des inhibiteurs de la TR, nous avons décidé d'enrichir les collections de produits qui allaient l'alimenter en utilisant l'approche combinatoire.

Nous avons contribué à la synthèse de la première bibliothèque combinatoire du laboratoire : il s'agissait de tripeptides en mélange, présentés au criblage par sous-bibliothèques de 125 tripeptides et organisée selon une méthode originale : la répartition orthogonale. Si les bibliothèques orthogonales n'ont pas donné de résultat positif sur le test de criblage TR, elles ont en revanche permis l'identification d'un tripeptide, puissant antagoniste des récepteurs  $V_2$  porcins. Nous en avons conclu que la chimie combinatoire, particulièrement la méthode orthogonale, était adaptée à l'identification de petites molécules actives au sein d'un mélange. L'antagoniste identifié a fait l'objet d'une étude de relations structure/activité et. A une exception près, il a été impossible d'améliorer l'activité : le produit issu du criblage était déjà très puissant. Cependant le modèle animal était mal choisi car le tripeptide s'est avéré totalement inactif sur les récepteurs humains.

D'autres bibliothèques combinatoires ont été mises au point au laboratoire parmi lesquelles une bibliothèque faisant intervenir une nouvelle diversité : celle des anhydrides et des amines. Cette bibliothèque a permis l'identification d'un antagoniste du facteur X de la coagulation mais aussi de montrer les limites de la synthèse combinatoire en mélange. Un lot positif a été retenu, à l'aide d'une méthode de croisement, nous avons identifié un produit brut qui s'est révélé être impur. La fraction la plus active a été isolée : une réaction secondaire s'était produite et avait conduit à un produit actif imprévisible et long à identifier. Nous en avons déduit que la méthode combinatoire en mélange présentait encore des désavantages comme celui de conduire à des réactions secondaires ou d'engendrer des continuums d'activité.

Néanmoins, ce travail nous a permis de maîtriser les techniques combinatoires, en synthèse peptidique d'abord, puis en synthèse organique, ainsi que les techniques de purification et d'indentification structurale.

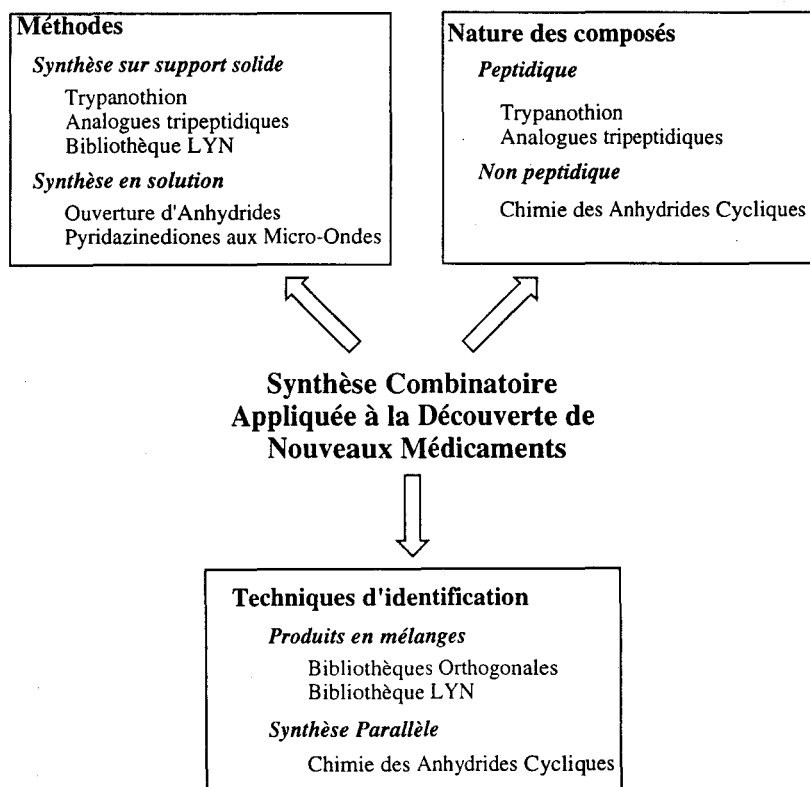
Une troisième partie a été consacrée à la synthèse organique rapide qui permet de supprimer les désavantages de la chimie combinatoire en mélange, tout en gardant l'idée de rapidité et de diversité. L'automatisation et l'informatisation de la synthèse organique sont un nouvel aspect de la chimie combinatoire. Nous nous sommes penchés sur des réactions « robustes », des chimies dites « d'assemblage », où un grand nombre de synthons réagissent en parallèle. Ainsi, nous avons ouvert des anhydrides par un grand nombre d'amines. Des nouvelles techniques ont aussi été employées comme le chauffage par les micro-ondes qui a permis d'accéder rapidement à des composés hétérocycliques avec de très bons rendements. Cette dernière partie nous a permis de nous familiariser avec la synthèse organique rapide et le chauffage par les micro-ondes, le contrôle qualité des matières premières et la validation des réactions sur des synthons modèles.

A l'avenir, la chimie combinatoire risque d'être basée uniquement sur la synthèse parallèle d'un grand nombre de composés. De plus en plus, le choix des synthons devient primordial, les recherches se tournent vers d'autres réactions de dimérisation, faisant

appel à la phase solide ou à l'emploi de réactifs immobilisés. Les capacités du criblage ont, elles-aussi, considérablement augmenté : la synthèse organique rapide et le criblage à haut débit (HTS) vont très certainement se rapprocher pour une meilleure interface entre la chimie et la biologie. Ce partenariat risque de déboucher à moyen terme sur l'identification de nombreuses molécules actives. La chimie thérapeutique vera son rôle renforcé : beaucoup de têtes de série seront à optimiser. Très vite un choix pourra être fait entre les molécules : celles qui auront les plus grandes chances de posséder une bonne biodisponibilité ou d'être les moins toxiques seront préférentiellement retenues. Gageons que de nouveaux médicaments sur le marché pourront d'ici 10 à 20 ans se vanter d'être les premiers à avoir été découverts grâce à la chimie combinatoire.

Dans le schéma 97, nous résumons l'ensemble des approches et des techniques que nous avons utilisées lors de ce travail.

**Schéma 97 : Résumé des différentes approches :**



# **PARTIE EXPERIMENTALE**

## GENERALITES EXPERIMENTALES

Les indications données ici sont valables pour toutes les parties de ce mémoire.

### 1/ Spectrométrie de masse

Sauf précision, l'analyse est faite sur un appareil Bio-Ion/ Applied Biosystem 20K, selon la technique du temps de vol (TOF), en utilisant un voltage de 15 kV pour accélérer les fragments et une source au  $^{252}\text{Cf}$  pour les générer. Les échantillons sont préalablement adsorbés sur une matrice de nitrocellulose.

### 2/ Résonance Magnétique Nucléaire

Les analyses sont réalisées sur des appareils BRUCKER 300 MHz et 600 MHz. Nous utilisons les abréviations suivantes : s pour singulet, d pour doublet, dd pour doublet de doublets, t pour triplet, td pour triplet dédoublé, q pour quadruplet, m pour multiplet non résolu. Les attributions suivent toujours le schéma suivant :

avec  $J$ =constante de couplage en Hz et  $\delta$ =déplacement chimique en ppm

$\delta$  (nature du massif,  $J$ , nombre de protons : identité des protons impliqués)

### 3/ Vaisselle utilisée pour les synthèses en phase solide

Elle est silanisée par le dichlorodiméthylsilane, et la fonction réactive chlorosilylée apparue est neutralisée par un lavage au méthanol en excès. Des « réacteurs » sont employés, il s'agit de récipients dont le fond est un verre fritté, munis d'un robinet permettant d'adapter un tuyau relié à une trompe à vide, avec un bouchon. Le « couplage » est la réaction d'un produit en solution sur un autre immobilisé sur le polymère. Lors du « rinçage » ou « lavage », les grains de polymères sont alors baignés de solvant en excès, agités puis « essorés » sous vide.

### 4/ Solvants

Les solvants sont stockés en présence de tamis moléculaire de 4 Angströms.

### 5/ Test de Kaiser

A une masse connue de résine, sont ajoutés 100  $\mu\text{L}$  de Phénol dans l'éthanol, 100  $\mu\text{L}$  de ninhydrine éthanolique, 100  $\mu\text{L}$  de KSCN dans la pyridine. L'incubation dure 5 mn à 100 °C, 470  $\mu\text{L}$  de méthanol sont ajoutés. La densité optique est lue à 570 nm, connaissant l'épsilon des fonctions amines des acides-aminés ( $15000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) la quantité d'amine présente dans la prise d'essai peut être déterminée.

## 6/ Test de Christensen

En présence d'acétone, donne une coloration bleu-noir avec la tétrachloro parbenzoquinone à saturation dans le toluène en présence de fonctions amines secondaires.

## PARTIE 1

### CHIMIE ANTIPARASITAIRE :

#### I/ METHODES ANALYTIQUES GENERALES POUR CETTE PARTIE :

##### 1/ La chromatographie (HPLC) :

a) Colonne préparative C18 nucléosil 25x200mm et détection à 250 nm par absorbance UV, le système d'éluants utilisés est : éluant A : 0,05% de TFA dans l'eau et éluant B, acétonitrile 50% dans l'éluant A. Le produit **1** a été élué à un débit de 4,9 ml/min avec une méthode isocratique à 100% du solvant A pendant 35 min, suivie d'un gradient linéaire pendant lequel l'éluant B passe de 0 à 100% en 90 min (soit 0,11%/min).

b) Colonne analytique C18 nucléosil 4,5x250 mm à un débit de 0,5 ml/min avec une méthode isocratique à 100% de l'éluant A pendant 5 min, suivie d'un gradient linéaire pendant lequel l'éluant B passe de 0 à 100% en 30 min (soit 3,33%/min).

Dans la suite de cette partie expérimentale, **tr** est le temps de rétention des différents produits analysés, la pureté HPLC est indiquée entre parenthèses, **tc** est le taux de conversion.

##### 2/ L'électrophorèse capillaire

Celle-ci a été réalisée sur un appareil Applied Biosystem A-HT. La séparation des produits est faite à 30°C dans un tampon citrate 20 mM dans l'eau (pH=2,5) ou de tampon borate 200 mM dans l'eau (pH=9,2) selon la polarité des produits à séparer, avec une différence de potentiel appliquée aux extrémités du capillaire de 25 à 30 kV. La détection des produits est faite par absorbance UV à 200 nm.

#### II/ SYNTHÈSE DU TRYPANOTHION (1) EN PHASE SOLIDE

##### 1/ Fonctionnalisation de la résine de Merrifield

Pour obtenir le polymère fonctionnalisé, 1g (0,7 mmol, 1 éq.) de résine chlorométhylée (0,7 mmol/g, 200-400 mesh, Novabiochem) est d'abord traitée avec 30 ml (3 éq.) d'un mélange entre une solution aqueuse d'acétate de potassium 0,2 M et du DMF, (50/50) ; le produit n'est pas isolé mais converti dans sa forme hydroxylée par saponification par un mélange de soude aqueuse 0,1M et de DMF (50/50) en excès. Enfin, un traitement par 20 ml d'une solution de phosgène à 20% dans le toluène permet d'obtenir la résine



méthylchloroformiate avec un rendement quantitatif. Le rendement a été déterminé après couplage de la  $\beta$ -alanine sur la résine, suivi de l'hydrolyse acide totale et analyse d'acides aminés. Le spectre IR de la résine hydroxyméthylée et de la résine méthylchloroformyl étaient identiques à ceux reportés par Letsinger<sup>72</sup>. La résine obtenue est appelée « polymère-OCOCI ».

## 2/ Protection de la spermidine

### *II-1-1/ Par le N-éthoxycarbonylphtalimide*

1 mmol de spermidine (145 mg) réagit avec 438 mg (2 eq.) de N-éthoxy carbonylphtalimide dans 5 ml de  $\text{CHCl}_3$ , 45 min à température ambiante pour obtenir la diphtaloyl spermidine. Le produit n'a pas été isolé, le milieu réactionnel a été caractérisé par SM et par HPLC.

**SM (TOF) :**  $M/z = 406,2 (M+H^+)$ , MM attendue = 405

**HPLC (C18 phase inverse) :**  $tc = 90\%$ ,  $tr = 43,1 \text{ min.}$

Le couplage de la diphtaloyl spermidine sur 0,7 mmol du polymère-OCOCI, est réalisé en présence d'un éq. de DIEA (122  $\mu\text{l}$ ) par rapport à la résine dans 20 ml de DCM, 72H à température ambiante. Après 3 lavages au DCM, l'hydrazinolyse est réalisée par action de 1 ml d'hydrazine aqueuse solubilisée dans 20 ml de DCM, 10 min à température ambiante mais conduit à une dégradation du lien résine-spermidine.

### *II-1-2/ Par le chlorure de tertiobutyldiphénylsilyle*

1 mmol de spermidine (145 mg) réagit avec 3 éq. de TBDPS-Cl (0,78 ml), en présence de 4,5 éq. de TEA (0,62 ml), dans 9 ml d'acétonitrile sous azote pendant 4H à température ambiante. Le produit obtenu n'a pas été isolé, le milieu réactionnel a été caractérisé par SM. **SM (TOF) :**  $M/z = 622,9 (M^+)$

A l'étape suivante, la  $N_1, N_8$ -disilylspermidine est utilisée telle quelle dans le milieu réactionnel : elle a été directement couplée sur 0,7 mmol de résine « polymère-OCOCI » en présence de DIEA (4,5 éq., 0,29 ml) après addition de 27 ml de dichlorométhane pour augmenter son gonflement, soit un ratio DCM/ $\text{CH}_3\text{CN}$  de 3/1 (v/v).

## 3/ Etude de stabilité du lien résine-spermidine

La déprotection des « TBDPS » est réalisée par un mélange THF/HCl 0,5N 2/1 v/v pendant 15 min à température ambiante et pour obtenir la spermidyl-résine. Après couplage du premier aminoacide Fmoc-Gly-OH et déprotection de la glycine, un test de Kaiser quantitatif permet de connaître la nouvelle charge de la résine : 0,35 mmol/g

#### 4/ Elongation de la chaîne peptidique et synthèse du T(S)<sub>2</sub> :

500 mg de spermidyl-résine (1 éq., 160 mmol) réagissent successivement avec les aminoacides Fmoc-Gly-OH (2,5 éq., 118,8 mg), Fmoc-Cys(S-Trt)-OH (2,5 éq., 234 mg), Z-Glu(OH)-O-Bn (2,5 éq., 148,4 mg) achetés chez Bachem.

A chaque étape de couplage, un aminoacide réagit sur la résine. Les fonctions acide carboxylique des aminoacides sont successivement activées *in situ* par action de l'HOBt (2,5 éq., 54 mg), du BOP (2,5 éq., 177 mg), en présence de DIEA (9 éq., 251  $\mu$ L) dans 10 ml de DMF. Un cycle de couplage dure 3h.

La résine est rincée 3 fois au DMF et 3 fois au DCM. La réaction est évaluée par le test de Kaiser. Un recouplage d'acide aminé peut avoir lieu dans les mêmes conditions jusqu'à obtention d'un test négatif. Les groupements Fmoc sont déprotégés par un mélange pipéridine/DMF 1/4 v/v pendant 30 min. Les couplages des deux aminoacides suivants ont lieu dans les mêmes conditions.

La résine est rincée 3 fois au DMF puis 3 fois au DCM.

Le clivage de la peptidyl résine a été réalisé selon les conditions standard de la coupure à l'acide fluorhydrique (10 ml d'HF par gramme de peptidyl résine), en présence de paracrésol (75 mg/ml d'HF) et de parathiocrésol (25 mg/ml d'HF) comme pièges à carbocations (ou « scavengers »). Après filtration et lavage dans l'éther éthylique du mélange fraîchement obtenu, le résidu acide (extrait par une solution d'acide acétique 5% dans l'eau) est lyophilisé.

Le lyophilisat de dihydrotrypanothion TSH a été aussitôt oxydé. L'oxydation par l'oxygène de l'air est réalisée à température ambiante dans une solution aqueuse d'acétate d'ammonium 0,04M à la concentration de 0,1 mg/ml, tandis que le pH est ajusté à 8,5 par une solution aqueuse d'ammoniaque. Une HPLC en phase inverse permet de contrôler la réaction : (*tr* = 24,2 min pour TSH et *tr* = 23,4 min pour T(S)<sub>2</sub>). Une HPLC préparative a permis d'obtenir le trypanothion disulfure T(S)<sub>2</sub> (*tr* préparatif = 63,5 min)

**Rdt** : 38%

**SM (TOF) M/z** = 723 (M+H<sup>+</sup>)

**HPLC (phase inverse C18, 250 nm)** : 100%, *tr* analytique = 23,4 min

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O)**

1,5 (m, 4H : H<sub>6</sub> et H<sub>2</sub> sp.); 1,8 (m, 2H : H<sub>7</sub> sp.); 2,1 (dd, J = 6Hz ; 15Hz, 4H : H<sub>β</sub> Glu); 2,6 (dd, J = 6Hz ; 15Hz, 4H : H<sub>γ</sub> Glu.); 2,9 (m, 6H : H<sub>β1</sub> Cys, H<sub>3</sub> et H<sub>5</sub> sp.); 3,2 (m, 6H : H<sub>β2</sub> Cys, H<sub>1</sub> et H<sub>8</sub> sp.); 3,7 (m, 5H : H<sub>α</sub> Gly, H<sub>α</sub> Glu); 4,6 (m, 2H : H<sub>α</sub> Cys)

## **PARTIE II : CHIMIE COMBINATOIRE**

### **CHAPITRE III : ETUDE DE RELATIONS STRUCTURE/ACTIVITE DE H-DTic-DTyr-DPnp-OH**

#### **I/ GENERALITES SUR LA SYNTHÈSE ET LES ANALYSES DES PRODUITS DE CE CHAPITRE**

##### **1/ Les polymères**

Tous les produits sont synthétisés en phase solide à partir de la résine de Merrifield (polystyrène réticulé avec 1% de divinylbenzène, 200-400 mesh, 0,7 mmol/g, Novabiochem) ou MBHA (résine chlorhydrate de 4-méthyl benzhydrylamine ; 0,77 mmol/g, Novabiochem ).

##### **2/ Les aminoacides**

Les aminoacides commerciaux protégés (tBoc-DAA-OH) ont été obtenus auprès de la société Bachem. Un exemple de protection d'un aminoacide est fourni, celui-ci est utilisé pour l'étude et est vendu non protégé. Une partie des tBoc aminoacyl résines a été préparée, les autres étaient déjà synthétisées pour réaliser les bibliothèques orthogonales, deux exemples de préparation sont donnés.

##### **3/ Contrôle des produits :**

a- La chromatographie HPLC en phase inverse est effectuée sur colonne C18 analytique nucléosil et la détection à 254 nm par absorbance UV, le système d'éluants utilisés est : éluant A : 0,05% de TFA dans l'eau et éluant B : acétonitrile 60% dans le solvant A. Les produits ont été élués à un débit de 0,7 ml/min avec une méthode isocratique à 100% de l'éluant A pendant 5 min, suivie d'un gradient linéaire pendant lequel l'éluant B passe de 0 à 100% en 30 min (soit 3,33%/min).

b- Une électrophorèse capillaire est effectuée sur le produit **23**. Le produit est dissous dans le tampon borate aqueux 20 mM (pH= 9,2). L'analyse dure 5 minutes, la tension appliquée est de 25 kV.

## II/ SYNTHESE GENERALE :

### II-1/ Synthèse d'une Boc-aminoacyl-résine « tBoc-AA-O-P ou tBoc-AA-NH-P »

#### II-1-1/ Protocole de protection d'un aminoacide, application à l'acide 6-méthoxy-1,2,3,4-tétrahydro-9H-pyridine(3,4,b)-indole-1 carboxylique (ou H-Mpi-OH) : (27)

4,06 mmol (1 g) de H-Mpi-OH sont dissous dans 200 mL d'un mélange de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% dans l'eau/tertobutanol (1/1), puis la solution est chauffée à 50 °C pendant quelques minutes. Après dissolution, 1,77 g (8,16 mmol, 2 éq.) de pyrocarbonate de tertibutyle sont ajoutés en maintenant le pH>9. La réaction dure une nuit à 30 °C. La suspension apparue est dissoute avec 20 mL d'eau, en contrôlant que le pH soit >9. La phase aqueuse est lavée à l'éther éthylique (20 mL), acidifiée par HCl 0,1M aqueux jusqu'à pH=3 puis extraite par l'acétate d'éthyle (3x20 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, évaporées à température inférieure à 50 °C pour conduire à 772 mg d'une huile jaune qui cristallise.

**Rdt** : 55%

**CCM (DCM/MeOH 9/1)**: Rf = 0,8

**SM (ie)** : M/z observé= 345 (MM-1) et 692 (2xMM) (MM théorique= 346 g/mol)

#### II-1-2/ Préparation d'une tBoc aminoacyl résine, « tBoc-DPcp-O-Polymère » (14).

Un sel de césium est préparé par réaction de 4,5 mmol de tBoc DPcp-OH Bachem (1,348 g) sur 2,25 mL d'une solution aqueuse de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. La réaction est instantanée. Le sel de césium obtenu est évaporé sous pression réduite à température inférieure à 50 °C. Le résidu sec est repris par un mélange toluène/éthanol, 1/1, pour éliminer l'eau restant par entraînement azéotropique. Le sel de césium est solubilisé dans le DMF (20 mL), avant d'ajouter 3 mmol de résine de Merrifield (4,285 g). La substitution s'effectue à 50 °C sous agitation pendant 36 H, en libérant des ions chlorures. La résine est rincée abondamment sur un verre fritté dans les conditions suivantes : 3 fois au DMF, 3 fois par un mélange DMF/eau 1/1, 3 fois par un mélange DMF/éthanol 1/1, 3 fois à l'éthanol, 2 fois au méthanol et enfin au DCM. Les 7 premiers lavages sont rassemblés, évaporés à sec et repris par 100 mL d'eau.

A une prise d'essai de 5 mL, volume précisément connu de cette solution aqueuse, 20 ml de nitrate d'argent titré, 5 mL d'acide nitrique, 1 ml de nitrobenzène, et 1 ml d'alun de fer ammoniacal sont ajoutés.

L'excès d'ions Ag<sup>+</sup> est dosé par une solution titrée de thiocyanate de potassium selon la réaction de Charpentier Vohlard<sup>73</sup>. Le rendement de la substitution est ainsi déterminé.

**Rdt**=87% (4,958 g de résine), **charge de la résine** = 0,523 mmol/g.

La résine est ensuite séchée et stockée dans un endroit sec.

**II-1-3/ Couplage de tBoc-DPnp-OH sur une résine MBHA** et obtention de tBoc-DPnp-NH-P ( conduisant à l'analogue **5**)

50  $\mu\text{mol}$  de résine MBHA (40 mg) sont neutralisées par un mélange DIEA/DCM (5/95) en excès puis lavées par le DMF.

Parallèlement, 150  $\mu\text{mol}$  de tBoc-DPnp-OH sont activées par action de l'HBTU (150  $\mu\text{mol}$ , 57 mg) et de l'HOBt (150  $\mu\text{mol}$ , 24 mg) en présence de DIEA (860  $\mu\text{mol}$ , 150  $\mu\text{l}$ ) dans le DMF (2,75 ml) puis cette solution est versée sur la résine fraîchement neutralisée. La substitution est évaluée et chiffrée par le test de Kaiser (voir généralités) et le couplage est renouvelé suivant le même protocole expérimental, si besoin est, jusqu'à ce que le test soit négatif.

**Rdt=100%** (81,5 mg), **charge de la résine** = 0,613 mmol/g

La résine est ensuite séchée et stockée dans un endroit sec.

## **II-2/ Protocole général pour la synthèse des tripeptides de l'étude de relations structure/activité (produits 2 à 32) :**

Ce protocole général s'applique à tous les tripeptides **2** à **32** de notre étude. Les variantes selon les analogues seront précisées.

### **II-2-1/ déprotection des groupement tBoc :**

30  $\mu\text{mol}$  de tBoc-DAA<sub>1</sub>-O-Polymère sont déprotégées par un mélange TFA/DCM (50/50) en excès pendant 2 min puis 20 min, puis rincées 1 fois au DCM. Après neutralisation par un mélange DIEA/DCM (5/95), la résine est rincée 2 fois au DCM, et 3 fois au DMF (chaque lavage dure 2 min).

### **II-2-2/ préparation de l'ester activé et couplage :**

L'ester activé de tBoc-DAA<sub>2</sub>-OH (120  $\mu\text{mol}$ , 4 éq., 0,4 M dans le DMF) est obtenu par action de l'HBTU (120  $\mu\text{mol}$ , 45,5 mg) et de l'HOBt (120  $\mu\text{mol}$ , 18,4 mg) solubilisés dans le DMF (240  $\mu\text{l}$ ), en présence de DIEA (480  $\mu\text{mol}$ , 83,8  $\mu\text{L}$ ). La solution obtenue est versée sur la résine préalablement déprotégée. Le couplage dure 1 H et il peut être renouvelé en fonction du résultat du test colorimétrique : le test de Kaiser est appliqué aux amines primaires, et le test de Christensen aux amines secondaires.

Si le test est négatif, la synthèse se poursuit par l'ancrage du 3<sup>ème</sup> aminoacide. tBoc-DAA<sub>3</sub>-OH (120  $\mu\text{mol}$ , 4 éq., 0,4 M dans le DMF) est activé dans les mêmes conditions parallèlement à la déprotection de la dipeptidyl résine. La réaction dure 1 h, le couplage est, là aussi, évalué par le test de Kaiser ou de Christensen. Si le test est négatif, une dernière déprotection de l'amine de AA<sub>3</sub> est effectuée selon a-, la résine est rincée au DMF, au DCM et séchée.

### **II-2-3/ coupure du lien tripeptide/résine :**

Le tripeptide est coupé de sa résine par un traitement à l'acide fluorhydrique (30 ml) pendant 1h30 à 0°C (les chaînes latérales sont déprotégées simultanément). La réaction se déroule en présence de paracrésol (75 mg/ml d'HF) et de parathiocrésol (25 mg/ml d'HF). HF est évaporé et le tripeptide est précipité par l'éther éthylique. Une suite de 3 centrifugations et de 3 reprises par l'éther élimine toute trace de crésols. Le peptide est solubilisé dans un minimum de TFA, reprécipité à l'éther, et une dernière centrifugation est effectuée. Le peptide solubilisé dans l'acide acétique est filtré sur filtre 0,45 µm pour éliminer la résine. Le filtrat est recueilli dans un flacon de lyophilisation. Les rendements sont calculés après pesées des poudres obtenues par lyophilisation.

### **III/ CAS PARTICULIERS ETUDIÉS:**

Le protocole général (II-2) est appliqué, nous mentionons ici les modifications.

#### **III-1/ Importance des extrémités libres :**

##### **III-1-1/ extrémités N terminales libres**

**Acétyl-DTic-DTyr-DPnp-OH (3)**, est obtenu en acétylant la tripeptidyl résine (2) H-DTic-DTyr-DPnp-O-Polymère (30 µmol) par une solution d'anhydride acétique (500 µl) dissous dans le DCM 50/50 (v/v). Le test de Kaiser évalue la réaction et la tripeptidyl résine est réacétylée si le test est positif.

**Thn-DTyr-DPnp-OH (4)** est obtenu en traitant la dipeptidyl résine H-DTyr-DPnp-O-P par un excès de 4 éq. d'anhydride de l'acide 2-tétrahydronaphtalène carboxylique. L'anhydride est obtenu par action de 120 µmol de DCC sur 240 µmol d'acide solubilisé dans le DCM (1 ml). Un précipité de DCU apparaît. Après filtration, le filtrat, qui est une solution d'anhydride naphtalène carboxylique, réagit directement sur l'extrémité amine de la dipeptidyl résine en présence d'un éq. de DIEA.

**Rdt :** 19%

**HPLC (Phase inverse C18, 254 nm) :** tc = 87,2%, tr = 29,3 min

**SM (TOF) :** M/z obtenu = 554 (M + Na<sup>+</sup>) (MM attendue=531)

##### **III-1-2/ extrémités C term libres**

**H-DTic-DTyr-DPnp-NH<sub>2</sub> (5)** a été préparé en utilisant l'acide tBoc-DPnp-NH-MBHA au lieu d'une tBoc-aminoacyl résine classique, le même protocole général (II, 2) est appliqué.

**SM (TOF) :** M/z obtenu = 532,6 (MM attendue=531,6 g/mol)

### III-2/ Importance de la chiralité

#### III-2-1/ Synthèse divergente de 8 diastéréoisomères de H-Tic-Tyr-Phe-OH (6 à 13)

2 lots séparés de 60  $\mu$ mol de résine tBoc-DPhe-O-Polymère (charge = 0,56 mmol/g, 2x107,5 mg), réagissent respectivement sur l'acide aminé tBoc-LTyr(2-Br-Bzl)-OH (2 équ., 59,3 mg) et sur tBoc-DTyr(2-Br-Bzl)-OH (2 équ., 59,3 mg). Les activations sont faites par l'HBTU (2 équ., 45,5 mg) et l'HOBt (2 équ., 18,5 mg) en présence de DIEA (4 équ., 42  $\mu$ l) dans le DMF (2 mL).

Les 2 dipeptidyl résines sont imbibées de DMF, divisées chacune en 2 et pour obtenir 4 dipeptidyl résines de 30  $\mu$ mol auxquelles on couple pour deux d'entre elles le tBoc-LTic-OH (2 équ., 60  $\mu$ mol, 16,7 mg) et, pour les deux autres, le tBoc-DTic-OH (2 équ., 60  $\mu$ mol, 16,7 mg). Les activations sont réalisées *in situ* avec l'HBTU (2 équ., 22,8 mg) et l'HOBt (2 équ., 9,2 mg) en présence de DIEA (4 équ., 21  $\mu$ l) dans le DMF (1ml).

Les quantités sont indiquées ici pour un réacteur. La même séquence réactionnelle est effectuée en parallèle avec 2 lots de 60  $\mu$ mol de résine tBoc-LPhe-O-Polymère (charge = 0,72 mmol/g, 2x83 mg). Ensuite les 8 tripeptidyl résines sont coupées de leur polymère par action de l'acide fluorhydrique anhydride dans les conditions générales.

Voici les résultats analytiques des différents analogues synthétisés.



<b>Tripeptide</b>	<b>Rdt</b> (Rdt HPLC C18) tr	<b>SM (TOF)</b>
H-DTic-DTyr-DPhe-OH (6)	<b>7%</b> (85%) 26,7 min	PM attendu=488 M/z obtenu=488,8
H-DTic-DTyr-LPhe-OH (7)	<b>7%</b> (95%) 22,5 min	PM attendu=488 M/z obtenu=488,3
H-DTic-LTyr-DPhe-OH (8)	<b>62%</b> (100%) 27,5 min	PM attendu=488 M/z obtenu=488,3
H-DTic-LTyr-LPhe-OH (9)	<b>36%</b> (93%) 26,3 min	PM attendu=488 M/z obtenu=488,7
H-LTic-DTyr-DPhe-OH (10)	<b>27%</b> (100%) 26,4 min	PM attendu=488 M/z obtenu=488,6
H-LTic-DTyr-LPhe-OH (11)	<b>41%</b> (100%) 27,5 min	PM attendu=488 M/z obtenu=488,5
H-LTic-LTyr-DPhe-OH (12)	<b>68%</b> (95%) 26,6 min	PM attendu=488 M/z obtenu=488,5
H-LTic-LTyr-LPhe-OH (13)	<b>14%</b> (100%) 26,6 min	PM attendu=488 M/z obtenu=488,6

### III-3/ Importance des chaînes latérales

#### III-3-1/ Variation de la position C terminale

Le protocole général est appliqué et les résultats analytiques obtenus pour les 8 tripeptides de formule générale H-DTic-DTyr-DAA<sub>1</sub>-OH sont les suivants :

<b>Tripeptide</b>	<b>Rdt</b> (Rdt HPLC C18) tr	<b>SM (TOF)</b>
H-DTic-DTyr-DPcp-OH (14)	<b>48 %</b> (99%) 24,4 min	MM attendue=522 M/z obtenu=523
H-DTic-DTyr-DPfp-OH (15)	<b>95 %</b> (99%) 34,8 min	MM attendue=505 M/z obtenu=506,3
H-DTic-DTyr-DNaa-OH (16)	<b>63 %</b> (97%) 25,2 min	MM attendue=539 M/z obtenu=538,7
H-DTic-DTyr-DThi-OH (17)	<b>16 %</b> (66%) 22,4 min	MM attendue=493 M/z obtenu=489,3
H-DTic-DTyr-DPhg-OH (18)	<b>53 %</b> (97%) 33,2 min	MM attendue=473 M/z obtenu=474,6
H-DTic-DTyr-DPip-OH (19)	<b>26 %</b> (97%) 35,3 min	MM attendue=501 M/z obtenu=502,5
H-DTic-DTyr-DPya-OH (20)	<b>93 %</b> (100%) 18,5 min	MM attendue=489 M/z obtenu=488,9
H-DTic-DTyr-N(Me)DPhe-OH (21)	<b>31 %</b> (69% brut) 34 min (99% purifié)	MM attendue=501 M/z obtenu=502,3

La purification du tripeptide **21** est effectuée par HPLC préparative, sur colonne C18 nucléosil et détection à 230 nm par absorbance UV, le système d'éluants utilisés est : éluant A : 0,05% de TFA dans l'eau et éluant B, acétonitrile 75% dans l'éluant A. Le produit **1** a été élué à un débit de 3 ml/min avec une méthode isocratique à 100% de l'éluant A pendant 18 min, suivie d'un gradient linéaire pendant lequel l'éluant B passe de 0 à 50% en 120 min (soit 0,41%/min).



### III-3-2/ Déclinaison de la position intermédiaire (22 à 24)

La préparation de 3 tripeptides du type H-DTic-DAA<sub>2</sub>-DPnp-OH donne les résultats analytiques suivants :

Tripeptide	Rdt (Rdt HPLC C18) tr	SM
H-DTic-DPcp-DPnp-OH (22)	79% (98%) 25,9 min	MM attendue=552 M/z obtenu=552,2
H-DTic-DThi-DPnp-OH (23)	25% (72%) 24,1 min	MM attendue=522 M/z obtenu=523,8
H-DTic-DPya-DPnp-OH (24)	71% (98%) 20,7 min	MM attendue=519 M/z obtenu=518,3

**H-DTic-DTic-DPnp-OH (25)** : selon les conditions générales, tBoc-DTic-OH est utilisé comme second aminoacide « AA<sub>2</sub> », sa disparition est évaluée par le test de Christensen. Après déprotection, le troisième aminoacide tBoc-DTic-OH réagit dans les conditions classiques d'activation et de couplage. La coupure HF et la lyophilisation suivent le protocole classique.

### III-3-3/ Déclinaison de l'acide aminé N-terminal (26 à 29)

La préparation de 3 tripeptides de formule générale H-DAA<sub>3</sub>-DTyr-DPnp-OH donne les résultats analytiques suivants :

Tripeptide	Rdt (Rdt HPLC C18) tr	SM
H-DTrp-DTyr-DPnp-OH (26)	14% (99,6%) 24,4 min	MM attendue=560,6 M/z obtenu=560,6
H-Mpi-DTyr-DPnp-OH (27) (2 diastéréoisomères)	40% (30,7%) 25,3 min (69,3%) 25,4 min	MM attendue=602,4 M/z obtenu=603,1
H-DNaa-DTyr-DPnp-OH (28)	58% (98,5%) 19,8 min	MM attendue=570 M/z obtenu=571,4

#### **Fmoc-DTyr-DPnp-OH (29) :**

Dans les conditions générales énoncées, le second aminoacide employé est ici Fmoc-DTyr(2-Br-Bzl)-OH. « AA<sub>2</sub> » n'est pas déprotégé et la croissance du dimère s'arrête à cette étape. La protection Fmoc est résistante à l'HF dans les conditions de l'expérience.

**Rdt** : 24 %,

**HPLC (phase inverse, C18, 254 nm)** : 89,6%, tr = 19,9 min

**SM (TOF)** : M/z obtenu = 618 (M + Na<sup>+</sup>), (MM attendue = 595)

### **III-3-4/ Dérivés de H-DTic-DTyr-DPcp-OH**

Les synthèses des produits indiqués ici suivent le même protocole général (II, 2), nous indiquons les variantes.

30  $\mu$ mol de l'aminocyl résine tBoc-DPcp-O-Polymère (57,7 mg) sont déprotégées classiquement par le mélange TFA/DCM 50/50 en excès. Après lavage au DCM, neutralisation par le mélange DIEA/DCM 5/95 en excès, la résine est rincée à nouveau au DCM. La tBoc-DTyr(2-Br-Bzl)-OH (120  $\mu$ mol, 59,3 mg) est couplée sur la résine dans le DMF en présence de HBTU/HOBT avec un excès de 4 éq. (selon le protocole général II, 2). La qualité de la réaction est évaluée par le test de Kaiser et un deuxième couplage est effectué dans les mêmes conditions. La tBoc dipeptidyl résine H-DTyr(2-Br-Bzl)-DPcp-O-Polymère est déprotégée par le mélange TFA/DCM (50/50) en excès, rincée au DCM, neutralisée par le mélange DIEA/DCM 5/95 et enfin rincée abondamment au DCM. Ensuite, les produits suivants sont obtenus :

**H-DTic-DTyr(OEt)-DPcp-OH (30)** : selon les conditions générales, tBoc-DPcp-O-Polymère est utilisé comme première aminocyl-résine « AA<sub>1</sub>-O-P », et tBoc-D-Tyr(OEt)-OH comme second aminoacide. Les conditions d'activation, de réaction, de coupure HF et de lyophilisation suivent les conditions générales énoncées plus haut.

**Rdt** : 96%

**HPLC (phase inverse, C18, 254 nm)** : 92,4%, tr = 38,1 min

**SM (TOF)** : M/z obtenu = 550,0 (MM attendue = 549,5)

**Benzoyl-DTyr-DPcp-OH (31)**, les 30  $\mu$ mol de dipeptidyl résine H-DTyr(2-Br-Bzl)-DPcp-O-Polymère sont acylés par l'anhydride benzoïque en excès (4 éq.). Cet anhydride est préparé extemporanément par action d'un équivalent de DCC (120,4 mg, 120  $\mu$ mol) sur 2 éq. d'acide benzoïque (29,3 mg, 240  $\mu$ mol) dissous dans le DCM (1 ml). Le précipité de DCU est éliminé par filtration et le filtrat contenant l'anhydride benzoïque est versé directement sur la résine en présence d'1 éq. de DIEA par rapport à la résine (6  $\mu$ l). La coupure HF et le traitement ultérieur suivent le protocole général (II, 2).

**Rdt** : 40%,

**HPLC (Phase inverse C18, 254 nm)** : 98,5%, tr = 28,2 min

**SM (TOF)** : M/z obtenu = 468,0, (MM attendue = 466,5)

**H-DPip-DTyr-DPcp-OH (32)**, la dipeptidyl résine H-DTyr(2-Br-Bzl)-DPcp-O-Polymère est acylée par l'acide tBoc-DPip-OH (4 éq., 27,5 mg) en présence d'HBTU et d'HOBT dans le DMF selon les conditions générales (II-2). Un deuxième couplage est réalisé tandis que la qualité de la réaction est évaluée par le test de Kaiser. La suite du traitement est fidèle à la description générale donnée plus haut.

**Rdt** : 92%

**HPLC (Phase inverse C18, 254 nm)**: 92,6%, tr = 22,8 min

**SM (TOF)** : M/z obtenu = 475,3, (MM attendue = 473,5)

#### **IV/ SYNTHESE D'UNE GRANDE QUANTITE DE L'ANTAGONISTE LE PLUS ACTIF, H-DTIC-DTYR-DPCP-OH (14) :**

(tétrahydroisoquinoléincaroxylytyrosylparachlorophénylalanine)

600  $\mu$ mol de Boc-DPcp-O-Polymère (1,154 g) sont déprotégées par un mélange TFA/DCM (50/50) 2 min puis 20min, lavées abondamment au DCM. La résine est neutralisée par un mélange DIEA/DCM (5/95) et lavées par le DCM avant d'être couplée avec une solution de 4 équ de Boc-DTyr(OBzl)-OH (2,4 mmol, 1,186 g) pendant 2 h dans 5 ml de DMF contenant de l'HBTU (2,4 mmol, 0,909 g) et de l'HOBT (2,4 mmol, 0,367 g). La DIEA est ajoutée extemporanément (9,6 mmol, 1,676 mL). Le test de Kaiser est positif au bout de 2 h de couplage, un second couplage est donc effectué dans les mêmes conditions pour rendre le test négatif.

La résine réagit ensuite avec l'acide aminé tBoc-DTic-OH (4 équ., 2,4 mmol, 0,664 g), strictement dans les mêmes conditions, pendant 2 h. Là aussi, un second couplage est nécessaire. Le tripeptide est ensuite déprotégé par un mélange TFA/DCM 50/50 en excès, coupé de la résine par un traitement à l'HF en présence de parathiocrésol et de para crésol, lyophilisé et analysé.

**Rdt** : 33% (158 mg)

**HPLC du brut d'HF (phase inverse C18, 254 nm)** : 99,0%, tr = 24,4 min

**SM (TOF)** : M/z = 523,3 g/mol , (MM attendue = 521,5)

Une chromatographie préparative est effectuée : aucune impureté ne peut plus être détectée. Le produit cristallise sous forme d'aiguilles en sortie d'HPLC préparative dans l'acétonitrile.

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O, DCl, pH=0,7)** :  $\delta$  =

2,75 (dd, J = 6 Hz, 1 H, H <sub>$\beta_2$</sub>  Pcp); 2,78 (d, J = 8,3 Hz, 2 H : H <sub>$\beta$</sub>  Tyr); 2,90 (m, 1 H : H <sub>$\beta_2$</sub>  Tic); 3,02 (dd, J = 6 ; 14 Hz, 1 H : H <sub>$\beta_1$</sub>  Pcp); 3,10 (m, 1H : H <sub>$\beta_1$</sub>  Tic); 4,10 (m, 1 H : H <sub>$\alpha$</sub>  Tic); 4,27 (2 d, 2 H, CH<sub>2</sub>NH Tic, système AB); 4,40 (t, J = 7,8 Hz, 1 H : H <sub>$\alpha$</sub>  Tyr); 4,45 (dd, J = 5,1 ; 11 Hz, 1 H : H <sub>$\alpha$</sub>  Pcp); 6,66 (d, J = 8,5 Hz, 2 H : H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub> Tyr); 6,92 (d, J = 8,5 Hz, 2 H : H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub> Tyr); 7,02 (d, J = 8,5 Hz, 2 H : H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub> Pcp); 7,1 (d, J = 7,3 Hz, 1 H : H<sub>5</sub> Tic); 7,17 (d, J = 8,5 Hz, 2 H : H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub> Pcp); 7,18 (m, 3 H : H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> Tic).

## **V/ DETERMINATION DE LA CAPACITE D'INHIBITION DE LA LIAISON DE LA VASOPRESSINE A SON RECEPTEUR :**

Les tests de binding ont été effectués par la société CEREP. Les expériences sont réalisées sur des cellules d'épithélium rénal de porc de la lignée LLC-PK<sub>1</sub><sup>74</sup>. La molécule de référence est l'arginine vasopressine ou "AVP", les conditions expérimentales mettent en présence le récepteur V<sub>2</sub>, le ligand marqué (<sup>3</sup>H)AVP à la concentration de 3 nM, l'AVP froide à la concentration de 2 μM, pendant 180 mn, à 4°C. Après l'incubation, les cellules sont rapidement filtrées puis lavées par du tampon froid. Les filtres sont alors transférés dans des fioles contenant du liquide scintillant et la radioactivité fixée est déterminée par un compteur à scintillation liquide. Chaque composé est testé à 3 concentrations. La liaison spécifique du ligand radioactif sur les récepteurs est calculée par la différence entre la liaison totale et la liaison non spécifique déterminée en présence d'un excès de ligand non radioactif. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> (concentration inhibant de 50% la liaison spécifique) sont calculées pour la molécule de référence (AVP), à partir de la courbe de compétition selon un modèle de régression non linéaire. Tous les composés de cette étude sont solubilisés dans le DMSO pour l'obtention de solutions mères à la concentration de 5 mg/mL. Les dilutions ultérieures sont effectuées dans l'eau.

## **CHAPITRE IV**

### **LA BIBLIOTHEQUE LYN**

#### **I/ METHODES ANALYTIQUES GENERALES**

##### **I-1/ HPLC**

L'HPLC a été réalisée sur colonne analytique de type cyano et la détection à 215 nm par absorbance UV, le système d'éluants utilisés est : éluant A : 0,05% de TFA dans l'eau et éluant B, Acétonitrile 60%, TFA 0,0425%, eau qsp 1 L. Les produits ont été élués à un débit de 1 mL/min avec une méthode isocratique à 100% de l'éluant A pendant 5 min, suivie d'un gradient linéaire pendant lequel l'éluant B passe de 0 à 100% en 30 min (soit 3,33%/min).

##### **I-2/ Spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse est réalisée par la méthode d'ionisation chimique en phase gaz par le méthane, l'appareil est de type quadrupole.

### I-3/ Vaisselle

Des réacteurs de synthèse en phase solide d'une capacité de 25 mL sont utilisés, mais aussi des seringues de 5 mL de type ABIMED n° 80271. Ces seringues possèdent un fritté à leur extrémité : en appuyant sur le piston, on chasse les excès de solvant tout en retenant les grains de polymère sur le fritté, une solution de couplage ou de lavage peut à nouveau être aspirée. Les grains de polymères portant les réactifs ne quittent jamais la seringue.

## II-ETUDE PRELIMINAIRE

### II-1/ Etude comparée du couplage des 6 anhydrides sur la résine tBoc-Gly-O-Polymère (33 à 38)

#### *II-1-1/ Préparation de la résine tertibutyloxycarbonylglycine*

60 mmol (10,5 g, 1,5 éq) de N-tertibutyloxycarbonylglycine réagissent pour former un sel de césium avec une solution aqueuse de carbonate de césium 1 M (30 mL). Le sel de césium obtenu est évaporé sous pression réduite à température inférieure à 50 °C. Le résidu sec est repris par un mélange toluène/éthanol-1/1, pour créer un entraînement azéotropique de l'eau. Le produit sec obtenu est repris par 400 mL de DMF. 40 mmol (57 g) de résine de Merrifield Novabiochem sont ajoutées à la solution de sel de tertibutyloxycarbonylglycyl césium. Le couplage est réalisé à 50 °C, sous agitation lente pendant 36 h. La réaction libère des ions chlorures. La résine est ensuite lavée à travers un fritté : 3 fois au DMF, 3 fois par un mélange DMF/eau 1/1, 3 fois par un mélange DMF/éthanol 1/1, 3 fois à l'éthanol, 2 fois au méthanol, et abondamment au DCM. Les 7 premiers lavages sont évaporés, le dosage des chlorures est effectué selon la méthode de Charpentier Vohlard.

**Rdt : 100%, charge de l' aminoacyl résine : 0,64 mmol/g.**

#### *II-1-2/ Couplage des anhydrides sur la résine (33 à 38)*

6 lots de 312,5 mg de résine tBoc-Gly-O-Polymère (200 µmol) sont réparties dans 6 réacteurs. La fonction amine de l' aminoacyl résine est déprotégée par un mélange TFA/DCM (50/50) pendant 2 min, puis 20 mn. Après un rinçage au DCM, la résine est neutralisée par un mélange DIEA/DCM (5/95) pendant 2 min, rincée 2 fois au DCM, puis 3 fois au DMF, toujours pendant 2 min. Au total, 10 éq. d'anhydrides (2 mmol) dissous dans 2 ml de DMF réagissent sur la résine : phtalique (296,2 mg), glutarique (228,2 mg), 2,2-diméthylsuccinique (256,3 mg), diglycolique (232,1 mg), diacétyltartrique (468,0 mg). Deux couplages successifs de 1 mL de chaque solution d'anhydride (5 éq.) sont effectués en présence d'un éq. de DIEA (200 µmol, 35 µL), pendant 1 h sous agitation.

### *Cas particulier du produit 38 :*

Le 6<sup>ème</sup> lot de résine préalablement déprotégée réagit sur l'anhydride naphthalène dicarboxylique. Cet anhydride étant peu soluble dans le DMF ( $S = 12,5 \text{ g/L}$ ), une solution 400 mg d'anhydride dissous dans 32 mL de DMF est préparée et couplée sur la résine à raison de 4 mL renouvelés tous les quarts d'heure.

Au bout d'une heure, la résine est séchée sous vide, 3 mg sont pesés pour réaliser un test de Kaiser quantitatif. Les prises d'essai sont lavées par le DMF, le méthanol, puis l'ether éthylique en tubes à essai tarés. Quand la résine est bien sèche, les tubes sont pesés et subissent le test de Kaiser. Le rendement de disparition de la fonction amine de la glycine est calculé ( $\epsilon = 15000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### *II-1-3/ Couplage de l'acyl amino-acyl résine à la benzylamine*

Les 6 lots de 200  $\mu\text{mol}$  d'acyl-aminoacyl résines **33** à **38** obtenues à l'étape précédente sont activés par l'HBTU (3 éq., 600  $\mu\text{mol}$ , 227,4 mg) en présence d'HOBt (3 éq., 600  $\mu\text{mol}$ , 91,8 mg) et de DIEA (10 éq., 2 mmol, 349,2 mL) dans le DMF pendant 10 min. La résine est lavée au DMF pour éliminer les excès d'agent de couplage. Une solution de benzylamine (122 mg; 1,14 mmol) dissoute dans 6 mL de DMF est préparée : dans chaque réacteur contenant la résine activée, 1 mL de cette solution (soit 0,95 éq. de benzylamine) est déposé, la réaction a lieu en présence de DIEA (400  $\mu\text{mol}$ , 70  $\mu\text{L}$ ) pendant 1h30.

La disparition de la benzylamine est évaluée par le test de Kaiser sur le surnageant auquel 1 mL de DMF a été ajouté. Un volume précisément connu (50  $\mu\text{L}$ ) de ce surnageant est prélevé. Le rendement de couplage de la benzylamine est calculé après étalonnage de la benzylamine. Un recouplage est effectué dans les mêmes conditions.

Le test colorimétrique des fonctions carboxyliques présentes sur la résine est effectué : les fonctions COOH sont neutralisées par la soude 0,05 M (2 g/L) dans le DMF en présence d'ether couronne 18-C-6. Après un lavage au DMF, le bromure de paranitrophénacétyle réagit sur la résine pendant 10 min. Après un second lavage au DMF, la diéthylamine révèle les grains de résine : la coloration est rose fuchsia pour les grains de résine porteurs de fonctions acides, et rose très clair pour les grains de résine qui n'en portent pas.

Après rinçage au DMF puis au DCM, la résine est séchée parfaitement. Le clivage des produits est effectué par traitement à l'acide fluorhydrique anhydre, 1H30 à 0°C. Après évaporation de l'HF, les produits sont directement solubilisés dans un mélange tertiobutanol/eau (3/1) et filtrés directement dans le flacon de lyophilisation. Les rendements sont déterminés par pesées des lyophilisats.

## II-2/ Etude comparée du couplage de 7 amines sur la résine succinyl-Gly-O-Polymère (composés 39 à 45) :

### II-2-1/ Préparation d'une résine succinyl glycy-O-Polymère

700  $\mu\text{mol}$  de la résine tBoc-Gly-O-Polymère (1,156 g) sont déprotégés avec le mélange TFA/DCM (50/50) en excès. 2 fois 5 éq. d'anhydride succinique (2 x 3,5 mmol, 700 mg) solubilisés dans 6 mL de DMF réagissent sur la résine pendant 2 fois 1 h, à raison de 3 ml (5 éq.) à chaque couplage. Le couplage est contrôlé par le test de Kaiser qualitatif. La résine est imbibée de DMF et divisée en 7 parts égales placées dans 7 réacteurs silanisés.

### II-2-2/ Couplage des 7 amines différentes (39 à 45)

Les 7 résines succinyl-Gly-O-Polymère vont être activées par l'HBTU (3 éq., 0,3 mmol, 113,2 mg) en présence d'HOBt (3 éq., 0,3 mmol, 45,9 mg) et de DIEA (10 éq., 1 mmol, 174,6  $\mu\text{L}$ ) dans le DMF pendant 10min.

Les 7 amines (2 x 0,95 éq., 190  $\mu\text{mol}$ ) sont solubilisées dans 2 ml de DMF : benzyldiazine (37,1 mg), benzylméthylamine (23,5 mg), pipéronyl pipérazine (41,8 mg), Noréphédrine (28,7 mg), benzylamine (20,4 mg),  $\alpha$ -méthyl-alanine-O-Bzl (41,3 mg), tétrahydrofurfurylamine (19,6 mg). 1 mL de chaque solution d'amines réagit sur la résine en présence de 3 éq. de DIEA (300  $\mu\text{mol}$ , soit 52,4  $\mu\text{L}$ ) pendant 2 h pour le premier couplage. Au terme de ce couplage, très exactement 50  $\mu\text{L}$  du surnageant sont prélevés pour quantifier la quantité d'amine disparue par le test de Kaiser pour les amines primaires ou par le test de Christensen pour les amines secondaires.

Les  $\epsilon$  ont été déterminés en réalisant une gamme étalon des amines :

Pour le test de Kaiser quantitatif :

benzyldiazine	20 798 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
noréphédrine	81 358 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
tétrahydrofurfurylamine	196 420 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

Pour le test de Christensen quantitatif :

benzylméthylamine	25 372 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
pipéronylpipérazine	34 685 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

Après le premier couplage, les résultats permettent de connaître le pourcentage d'amine disparu. Un second couplage d'amines sur la résine est effectué après réactivation de la résine dans les mêmes conditions. Le deuxième couplage dure 2 h. Le test colorimétrique des fonctions carboxyliques sur résine est appliqué.

Une coupure à l'acide fluorhydrique est réalisée en fin de synthèse. Dans le cas particulier de l' $\alpha$ -méthyl-alanine-O-Bzl, le parathiocrésol (25 mg/ml d'HF) et le paracrésol (75 mg/ml d'HF) sont ajoutés à la résine avant l'HF, puis éliminés après évaporation de l'HF au moyen de l'éther éthylique qui les solubilise tout en faisant précipiter le produit de la réaction. Par une suite de lavages à l'éther et de centrifugations, on élimine toute trace de ces pièges à carbocations.

Dans tous les cas, les produits sont ensuite solubilisés dans un mélange DMF/AcOH (3/0,1) et lyophilisé. Les rendements sont déterminés après pesées des lyophilisats.

## **II-3/ Bibliothèque de validation**

### ***II-3-1/ Fixation des aminoacides (étape n°1) :***

Les tBoc-aminoacides sont ancrés à la résine MBHA (30  $\mu$ mol) à raison de 4 éq. d'aminoacides par fonction amine de la résine dans le DMF. L'activation est faite *in situ* par un mélange HBTU/HOBt/ DIEA 1/1/4 dans le DMF pendant 2 h à ta. Après réaction, les amines ne sont plus détectables sur 10 mg de résine par le test de Kaiser. La déprotection des fonctions amine des aminoacyl résines est effectuée par le mélange TFA/DCM 50/50.

### ***II-3-2/ Couplages de anhydrides (étape n°2)***

Les anhydrides réagissent avec une stœchiométrie de 10 éq. en 2 couplages de 2 fois 5 éq. dans 2 mL de DMF. Pour l'anhydride naptalène 1,8-dicarboxylique, peu soluble dans le DMF, 1 mL de DMSO est ajouté et le couplage est effectué à l'étuve à 50 °C.

### ***II-3-3/ Activation des fonctions COOH des 27 Résines (étape n°3)***

L'activation est réalisée par un mélange HBTU/ HOBt, 3 éq. chacun en présence de 10 éq. de DIEA, pendant 10 min, dans 200  $\mu$ l de DMF. L'excès de réactif de couplage est lavé rapidement pour éviter les réactions secondaires.

### ***II-3-4/ Couplage des amines (étape n°4)***

Chaque tube à essai contient 30  $\mu$ mol de résine et réagissent avec 0,95 éq. d'amine. Ce couplage est réalisé pendant 1 h dans 200  $\mu$ L de DMF en présence de 2 éq. de DIEA (10  $\mu$ L). Au bout d'une heure de réaction, un test de Kaiser quantitatif est réalisé dans les conditions suivantes : 1 mL de DMF est ajouté aux 210  $\mu$ L du milieu réactionnel, 50  $\mu$ L sont prélevés. Les 27 prises d'essai sont lavées 3 fois par le DMF, 1 fois par le MeOH, 1 fois par l'éther éthylique et séchées, avant d'appliquer le protocole du Kaiser quantitatif.



### ***II-3-5/ Bibliothèque de validation en mélange de 27 produits :***

90  $\mu\text{mol}$  d' aminoacyl résine (D-Ala-O-Polymère : 150 mg, D-Pnp-O-Polymère : 150 mg, D-Tic-O-Polymère : 155,2 mg), sont mélangées encore sèches. Le mélange obtenu est divisé en trois parties. 10 éq. d'anhydride (succinique : 90 mg, phtalique : 133,3 mg, tétraméthylène glutarique : 151,2 mg) sont solubilisés dans 4 mL de DMF. Sur chaque portion de résine, 2 mL de solution d'anhydride (5 éq.) sont déposés en présence d'1 éq. de DIEA (16  $\mu\text{L}$ ). Le test de Kaiser évalue qualitativement la réaction. Un recouplage est effectué et évalué par le test de Kaiser. Les 3 aminoacyl résines sont mélangées.

3 amines (benzylamine : (9,4  $\mu\text{L}$ , 0,95 éq.), noréphédrine : (12,9 mg, 0,95 éq.), tétrahydrofurfurylamine : (8,8  $\mu\text{L}$ , 0,95 éq.) sont mélangées, solubilisées dans 2 ml de DMF en présence de DIEA (141,4  $\mu\text{L}$ , 3 éq.) puis couplées sur la résine après une activation par l'HBTU (307 mg, 3 éq.), l'HOBt (124 mg, 3 éq.), en présence de DIEA (471,4  $\mu\text{L}$ , 10 éq.). Le couplage dure 2 h et le test de Kaiser quantitatif est réalisé en prenant arbitrairement la valeur d' $\epsilon$  égale à celle de la tétrahydrofurfurylamine, la valeur la plus haute. Après calcul, le rendement de couplage est de 89% à la fin de ces 2 heures. Un recouplage est effectué dans les mêmes conditions après réactivation. La coupure HF de la résine précède une analyse par électrophorèse capillaire (25 min, 25 kV, tampon borate) 25 pics sont détectés sur les 27 attendus.

### **II-4/ Test de stabilité des dimères**

#### ***II-4-1/ Synthèse de la succinyl valine polymère (46)***

1 mmol de tBoc-DVal-O-P (charge=0,61 mmol/g, 1,639 g) est déprotégée par le mélange TFA/DCM 50/50 en excès pendant 2 min puis 20 min. Elle est ensuite rincée au DCM, neutralisée avec le mélange DIEA/DCM 5/95 en excès puis encore rincée abondamment au DCM, puis au DMF avant de réagir sur l'anhydride succinique (0,5 g solubilisé dans 1 mL de DMF) pendant 1h. Un test de Kaiser et un second couplage d'anhydride sont effectués dans les conditions classiques. La résine est stockée à 4°C après 3 lavages au DMF, 3 lavages au DCM et un séchage à l'étuve.

#### ***II-4-2/ Synthèse de l'exo-3,6-époxy-1,2,3,6-tetrahydrophthalyl valine polymère (49)***

Le protocole est identique, l'anhydride est différent : 0,830 g d'anhydride exo-3,6-époxy-1,2,3,6-tetrahydrophthalique sont dissous dans 3,5 ml de DMF. Le couplage a lieu dans les mêmes conditions.

#### ***II-4-3/ Synthèse du composé 48***

106  $\mu\text{mol}$  de la résine **46** (174 mg) sont lavées au DMF, activés par le mélange HBTU/HOBt 0,5M dans le DMF (3 éq., 600 $\mu\text{L}$ ) en présence de DIEA (10 éq., 174  $\mu\text{L}$ ).

Après un rinçage au DMF, 4 éq. de H-Gly-O-Et.H<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> (55,8 mg dans 1,2 mL de DMF) réagissent sur la résine activée en présence de 5 éq. de DIEA (0,53 mmol, 93 µL). Une réactivation et un recouplage de la même quantité d'amine permettent de rendre négatif le test de Kaiser. Après 2 lavages au DMF, 3 au DCM, la résine est séchée correctement. 4 mg de résine placés dans un tube à hydrolyse acide totale sont hydrolysés par un mélange acide propionique/HCl 12 N 50/50 en excès. L'hydrolyse dure 3 h à 100°C et après dilution, une analyse d'acides aminés marqués par la ninhydrine est effectuée. La synthèse du composé **51** suit le même protocole à partir de la résine **49**.

### III/ SYNTHESE DE LA BIBLIOTHEQUE LYN

#### III-1/ Chronologie et organisation de la synthèse de dimères

12 anhydrides réagissent sur 20 aminoacyl résines.

La synthèse est séparée en trois parties. Dans chaque partie ou « cycle », quatre anhydrides sont couplés aux 20 aminoacyl résines, 80 dimères sont obtenus. Les 81 amines réagissent sur les 80 dimères, ce qui donne 80 mélanges de 81 produits soit 6400 produits différents par cycle. Les 80 mélanges sont coupés du polymère. A la fin du cycle, une série de 4 autres anhydrides réagit sur les 20 aminoacyl résines... 8 jours de travail sont nécessaires pour effectuer un « cycle ».

##### *III-1-1/ Formation des dimères (étapes n°1 et 2)*

Chaque jour, 1 même anhydride réagit sur 10 aminoacyl résines différentes (0,2 mmol) dans 10 réacteurs silanisés en parallèle. Les aminoacyl résines **A, B, C, D, E, F, G, I, J, K**. (attention pas la résine **H**) réagissent pendant les 4 premiers jours et les aminoacyl résines **H, L, M, N, P, Q, R, S, T, U** les 4 autres jours suivants.

**Les quatre premiers jours**, les tBoc-aminoacyl résines **A, B, C, D, E, F, G, I, J, K** (0,2 mmol) sont rincées dans le DCM 2 fois 2 min, puis déprotégées par le mélange TFA/DCM (50/50) 2 min, puis 20 min. Après un lavage au DCM 2 min, les résines sont neutralisées par le mélange DIEA/DCM (5/95) pendant 2 min, lavées au DCM 2 fois 2 min, lavées au DMF 3 fois 2 min. Pendant la déprotection, l'anhydride (15 mmol) est solubilisé dans le DMF qsp 7,5 ml (2M), si possible, sinon, qsp 15 mL (1M). 0,5 mL de la solution d'anhydride 2 M (ou 1 mL de la solution d'anhydride 1 M) (5 éq.) réagissent sur la résine imbibée de DMF en présence de 2 éq. de DIEA (70 µL) pendant 1h30. Après rinçage au DMF, la résine encore imbibée subit les tests de Kaiser ou de Christensen pour vérifier la complétion de la réaction.

200 µL de la solution d'anhydride 2 M (ou 400 µL de la solution 1 M) (2 éq.) réagissent sur la résine imbibée de DMF en présence de 2 éq. de DIEA (70 µL) pendant 1h30. La

résine est lavée 3 fois 2 min au DMF et subit les tests de Kaiser ou de Christensen et 3 fois 2 min au DCM puis séchée et enfin stockée à 4°C.

**Les quatre jours qui suivent**, les Fmoc-aminoacyl résines *H, P, Q, R, S, T, U* (0,2 mmol) sont rincées par la NMP, déprotégées par le mélange pipéridine/NMP (20/80) pendant 2 heures, lavées à la NMP 2 fois 2 min, et lavées au DMF 3 fois 2 min. Les tBoc-aminoacyl résines *L, M, N* (0,2 mmol) sont rincées par le DCM pendant 2 fois 2 min, déprotégées par le mélange TFA/DCM (50/50) pendant 2 min, puis 20 min, lavées au DCM 2 min, neutralisées par le mélange DIEA/DCM pendant 2 min, lavées au DCM 2 fois 2 min et enfin, lavée au DMF 3 fois 2 min.

Pendant la déprotection, l'anhydride (15 mmol) est solubilisé dans le DMF qsp 7,5 mL (2M) , si possible, sinon, qsp 15 mL (1M).

0,5 mL de la solution d'anhydride 2 M (ou 1 mL de la solution d'anhydride 1 M) (5 équ.) réagissent sur la résine imbibée de DMF en présence de 2 équ. de DIEA (70 µL) pendant 1h30. Après rinçage au DMF, la résine encore imbibée subit les tests de Kaiser ou de Christensen pour vérifier la complétion de la réaction.

200 µL de la solution d'anhydride 2 M (ou 400 µL de la solution 1 M) (2 équ.) réagissent sur la résine imbibée de DMF en présence de 2 équ. de DIEA (70 µL) pendant 1h30. La résine est lavée 3 fois 2 min au DMF et subit les tests de Kaiser ou de Christensen et 3 fois 2 min au DCM puis séchée et enfin stockée à 4°C.

NB : Un troisième couplage est envisageable si les tests de Kaiser ou de Christensen sont positifs c'est-à-dire s'il reste des fonctions amines libres sur le polymère.

### *III-1-2/ Vérification de la complétion de la réaction pour les aminoacyl résines suivantes*

	Test de Kaiser	Test de Christensen
4 premiers jours	<i>B, C, D, E, F, I, K</i>	<i>A, G, J</i>
4 jours suivants	<i>H, L, M, N, P, Q, R, S, T, U</i>	<i>M</i>

Le couplage des amines est indépendant de la préparation des dimères. Les dimères sont conservés à 4°C pendant une courte période.

### **III-2/ Couplage de 81 amines sur les dimères (étapes 3 et 4)**

20 dimères réagissent avec 81 amines dans une journée. 0,180 mmol de chaque dimère réagissent en seringues de 5 mL. Deux solutions mères sont préparées : une contenant les amines primaires, l'autre les secondaires pour une période de 4 jours. 3x0,95 équ. de chaque amine (pour 3 couplages de 0,95 équ.) sont pesées. La quantité totale des amines à

peser est de  $(20 \times 4 \times 0,95 \times 0,18) = 41,0$  mmol. Comme il y a 81 amines, chaque amine sera pesée à raison de  $41,0 / 81 = 0,563$  mmol.

### ***III-2-1/ Préparation de la solution des 44 amines secondaires en mélange (groupe II)***

Individuellement, 0,563 mmol de chaque amine est dissoute dans 1,4 mL de DMF en récipient muni d'un bouchon. Les 44 solutions obtenues sont collectées dans un erlenmeyer de 250 mL et 1,4 mL de DMF supplémentaire rince chaque récipient (concentration individuelle = 0,2M). Le volume final est de 123,2 mL. Après agitation, le contenu de l'erlenmeyer est divisé en 8 fois 15 ml dans des pots à penicilline. Ces pots sont stockés bouchés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . La solution est de couleur brune.

### ***III-2-2/ Préparation de la solution des 37 amines primaires en mélange (groupe I)***

Individuellement, 0,563 mmol de chaque amine est dissoute dans 1,4 mL de DMF en récipient muni d'un bouchon. Les 37 solutions obtenues sont collectées dans un erlenmeyer de 250 mL et 1,4 mL de DMF supplémentaires rincent chaque récipient (concentration individuelle = 0,2 M). Le volume final est de 103,6 ml. Après agitation, le contenu de l'erlenmeyer est divisé en 8 fois 12,9 ml dans des pots à penicilline. Ces pots sont stockés bouchés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . La solution est de couleur rouge.

### ***III-2-3/ Premier couplage avec les amines du groupe II :***

0,180 mmol de dimères sont activées d'abord par 3 éq (0,54 mmol soit 1,08 mL) d'une solution 0,5 M d'HBTU/HOBT dans le DMF, en présence de DIEA, (10 éq, 279,4  $\mu\text{L}$ ) pendant 10 min. Après deux rinçages au DMF de 2 min, 0,516 éq. ( $0,95 \times 0,18 \times 44 / 81$ ), de la solution d'amines II (92,88 mmol, 462,1  $\mu\text{L}$ ) réagissent en présence de 1,5 éq. de DIEA (47  $\mu\text{L}$ ) pendant 2h30, aiguilles en l'air. Les résines sont rincées 3 fois au DMF.

### ***III-2-4/ Deuxième couplage avec les amines du groupe I***

Les dimères sont réactivés et rincés dans les mêmes conditions. Après deux rinçages au DMF de 2 min, 0,434 éq. ( $0,95 \times 0,18 \times 37 / 81$ ), de la solution d'amines II (78,11 mmol, 388,6  $\mu\text{L}$ ) réagissent en présence de 1,5 éq. de DIEA (47  $\mu\text{L}$ ) pendant 1h30, aiguilles en l'air. Les résines sont rincées 3 fois au DMF.

### ***III-2-5/ Troisième couplage avec le mélange des amines II+I***

Les dimères sont réactivés et rincés dans les mêmes conditions. 0,95 éq. de toutes les amines réagissent : 464,4  $\mu\text{L}$  de la solution II et 390,5  $\mu\text{L}$  de la solution I en présence de 94  $\mu\text{L}$  de DIEA pendant une nuit. Après 3 lavages au DMF et 3 au DCM pendant 2 min,

un bouchon de caoutchouc est posé délicatement sur les seringues sans l'enfoncer, les seringues sont séchées sous vide au dessiccateur toute une nuit.

### ***III-2-6/ Détails pour les couplages :***

Avant de commencer, les 2 solutions d'amines sont décongelées pendant une heure. Avant d'activer ou de coupler, le volume de solution nécessaire sera préparé dans des mini-récipients à bouchons de type « eppendorf » de 1,5 mL avec : la solution d'activateurs, la DIEA nécessaire à l'activation, qu'on ne mélange pas aux activateurs, puis la solution II, à laquelle les 47  $\mu$ L de DIEA du couplage sont ajoutés, la solution I (+ 47  $\mu$ L de DIEA), le mélange II+I (+ 94  $\mu$ L de DIEA). Ces solutions sont prêtes à être aspirées.

### ***III-2-7/ Préparation de la solution d'HOBt/HBTU 0,5 M***

L'HOBt (50 mmol, 7,7 g) et l'HBTU (50 mmol, 18,95 g) sont dissous dans le DMF qsp 100 mL. La solution a une concentration finale de 0,5 M.

### **III-3/ Coupure à l'acide fluorhydrique anhydride (étape 5)**

Les aminoacides fixés sur une résine de type Merrifield n'ont pas de groupe protecteur mais ceux qui sont fixés sur une résine de type MBHA ont des groupes protecteurs sensibles au TFA. La déprotection est faite par le TFA (500ml) en présence d'un mélange de pièges à carbocations : phénol (37,5 g), parathiocrésol (25 g), éthanedithiol (20 mol), eau (25 ml) pendant 2 fois 2 min, puis 5 min, 15 min, et enfin 60 min. Un lavage abondant 3 fois au DCM en excès permet d'éliminer le TFA et les pièges à carbocations. La résine est séchée une nuit à l'étuve avant de procéder à la coupure. A l'aide du multi-poste de 24 places, les produits sont coupés de la résine. Le volume maximal d'HF liquide par réacteur est de 1,25 mL, ce qui correspond à une distillation de 30 mL d'HF au total. La coupure a lieu à 0°C pendant 2h après avoir piégé l'HF à -180°C grâce à l'azote liquide, la remontée à 0°C s'effectue pendant les 30 premières minutes. L'HF est ensuite évaporé et piégé sur chaux sodée. Les résidus sont solubilisés dans un mélange DMF/AcOH (3/0,1), filtrés sur filtre 0,45  $\mu$ m pour retenir la résine et le tout est rincé deux fois par 5 mL d'AcOH. La solution est congelée et lyophilisée.

## **IV-DETERMINATION DE LA STRUCTURE D'UN COMPOSE ACTIF :**

### **IV-1/ Préparation du dimère LYN/Gi (produit 52) :**

tBoc-DTic-O-Polymère (7,975 g; 3,19 mmol) est déprotégée par le mélange TFA/DCM 50/50 en excès et neutralisée. Un excès d'anhydride exo-3,6-époxy-1,2,3,6-tétrahydrophthalique (4,769 g; 28,7 mmol) est solubilisé dans le DMF (qsp 18 mL). La solution obtenue est utilisée pour 3 couplages où chaque fois 6 mL de solution réagissent sur la résine en présence de DIEA (1,671 mL). Le test de Christensen permet d'évaluer la

réaction. Après 3 lavages au DMF et 3 au DCM pendant 2 min à chaque fois, la résine est séchée.

**Rdt** : 100% (5,377 g), **charge de la résine** : 0,58 mmol/g.

## **IV-2/ La déconvolution**

### *IV-2-1/ Constitution des groupes d'amines*

Des mélanges équimoléculaires d'amines sont réalisés selon la répartition dans une concentration de 0,2 M par mélange d'amines. 0,254 mmol de chaque amine est dissoute dans 1,37 ml de DMF. Pour reconstituer les mélanges, 0,5 mL de chaque solution d'amine sont prélevés et mélangés selon les règles énoncées, l'amine 11+ l'amine 12 + l'amine 13... + l'amine 19 donnent le groupe 1X ainsi de suite jusqu'à l'amine 91 + l'amine 92 + l'amine 93... + l'amine 99 qui donnent le groupe 9X. Il en est de même pour les groupes verticaux de X1 à X9.

### *IV-2-2/ couplage des amines sur la résine*

9 fois 50 mg de résine LYN/Gi (**52**) réagissent après activation (mélange HBTU/HOBt 50/50 0,5M dans le DMF, 148  $\mu$ L, en présence de DIEA 42  $\mu$ L), sur les mélanges d'amines (120  $\mu$ L de chaque mélange en présence de 63,8  $\mu$ L d'une solution de DIEA à 20% dans le DMF). 3 couplages durent respectivement 2h30, 1h30 et 1 nuit. Ils impliquent des quantités identiques d'amines et sont précédés de réactivations.

## **IV-3/ Synthèse des produits de croisement *LYN/Gi/34*, *LYN/Gi/35*, *LYN/Gi/44*, *LYN/Gi/45***

4x100 mg de la résine LYN/Gi (**52**) (0,058 mmol) sont activés par 348  $\mu$ L du mélange d'activateurs HBTU/HOBt 0,5 M dans le DMF en présence de 101,3  $\mu$ L de DIEA. Après 2 lavages au DMF, un excès d'amine **34**, **35**, **44**, **45** (116  $\mu$ mol dans 1,16 mL de DMF) réagissent sur la résine en présence de 30,4  $\mu$ L de DIEA ou 50,6  $\mu$ L dans le cas d'une amine chlorhydrate. Trois couplages précédés de réactivations sont effectués dans des conditions identiques. Ils durent respectivement 2h30, 1h30, 1 nuit comme lors de la synthèse de la bibliothèque. Les résines sont lavées au DMF et au DCM, séchées et coupées par l'acide fluorhydrique sans piège à carbocations puisque le Tic n'a pas de chaîne latérale protégée. Après HF les rendements sont les suivants :

LYN/Gi/34 : 36%, LYN/Gi/35 : 40%,

LYN/Gi/44 : 48%, LYN/Gi/45 : 24%.

Les produits obtenus ne sont pas purs en HPLC.

## **IV-4/ Purification par HPLC préparative et localisation de l'activité**

Sur 1 mg des 2 lots les plus actifs, *LYN/Gi/34* et *LYN/Gi/44*, une HPLC préparative est réalisée dans les conditions suivantes : sur une colonne préparative C18, en détectant à

215 nm par absorbance UV, le système d'éluants utilisés est : éluant A : 0,05% de TFA dans l'eau et éluant B, acétonitrile 80% dans l'éluant A. Les produits ont été élués à un débit de 1 mL/min avec une méthode isocratique à 100% de l'éluant A pendant 10 min, suivie d'un gradient linéaire pendant lequel l'éluant B passe de 0 à 50% en 90 min (soit 0,55%/min). Chaque pic est collecté dans un tube différent, concentré et subit le test biologique. La société Glaxo fournit le profil biologique selon l'activité inhibitrice de chaque tube.

#### **IV-5/ Synthèse d'une grande quantité de LYN/Gi/34, purification du brut et caractérisation du produit le plus actif (54)**

La même synthèse de LYN/Gi/34 est entreprise à une plus grande échelle, strictement dans les mêmes conditions. Les quantités sont les suivantes : 1 g de résine LYN/Gi (52) est activé avec 3,46 mL d'activateurs et 1 mL de DIEA. Enfin 3 couplages de l'amine (474,8 mg dans 6 mL de DMF à raison de 2 mL par couplage en présence de DIEA) permettent d'obtenir le produit *LYN/Gi/34*.

Après purification, le produit obtenu (celui qui porte le maximum d'activité) a les caractéristiques suivantes :

**Rdt** en produit isolé après HPLC préparative : 3% (4,5 mg)

**SM (ie)** : 383 (détection positive), 381 (détection négative)

**SM (FAB)** : 382

**HPLC (Phase inverse, C18, 215 nm)** : 98%, **tr** : 53,2 min

**RMN : <sup>1</sup>H, (600MHz, DMSO)**

2 conformères : appelés ici « conf 1 » et « conf 2 », sont présents dans un rapport 56/44.

4,46 (d, J = 17,5Hz, 1H : CHNH conf 1); 4,70 (d, J = 15,8Hz, 1H : CHNH conf 2); 4,77 (d, J = 15,8Hz, 1H : CHNH conf 2); 5,00 (dd, J = 6,0Hz ; 3,1Hz, 1H : H<sub>α</sub>Tic conf 1); 5,05 (d, J = 17,5Hz, 1H : CHNH conf 1); 5,41 (dd, J = 6,0Hz / 3,1Hz, 1H : H<sub>α</sub>Tic conf 2); 6,43 (d, J = 11,8Hz, 1H : H éthylénique B conf 1); 6,48 (d, J = 11,8Hz, 1H : H éthylénique B conf 2), 6,48 (d, J = 11,8Hz, 1H : H éthylénique A conf 1); 6,65 (d, J = 11,8Hz, 1H : H éthylénique A conf 2); 6,66 (d, J = 8,5Hz, 1H : H<sub>3</sub> conf 2); 6,68 (d, J = 8,5Hz, 1H : H<sub>3</sub> conf 1); 6,96 (dd, J = 8,5Hz / 2,5Hz, 1H : H<sub>2</sub> conf 2); 6,99 (dd, J = 8,5Hz ; 2,5Hz, 1H : H<sub>2</sub> conf 1); 7,20 (m, 4H : H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub> Tic); 7,25 (d, J = 2,5Hz, 1H : H<sub>1</sub> conf 2); 7,31 (d, J = 2,5Hz, 1H : H<sub>1</sub> conf 1); 8,84 (s, 1H : CONH conf 2); 9,09 (s, 1H : CONH conf 1); 9,98 (d, J = 12,5Hz, 1H : Ph-OH conf 2); 10,18 (d, J = 12,5Hz, 1H : Ph-OH conf 1); 13,00 (pic large, 1H : COOH).

## **PARTIE III CHIMIE AUTOMATISEE**

### **I/ OUVERTURE D'ANHYDRIDES EN SOLUTION**

#### **I-1/ Contrôle des anhydrides**

##### *I-1-1/ Déshydratation des diacides*

A 50 mmol de diacide est additionnée 50 mL d'une solution d'anhydride trifluoroacétique à 2% dans l'anhydride acétique de telle sorte que la concentration de la solution soit de 1M. Le milieu est agité 4 heures à température ambiante ou au reflux selon la solubilisation. La solution peut être lyophilisée après addition du même volume d'acide acétique ou évaporée sous pression réduite.

L'anhydride est contrôlé par RMN, l'analyse met en évidence la disparition du pic de l'acide à 10-12 ppm et la simplification des massifs autrefois dédoublés.

L'anhydride est utilisé rapidement après cette cyclisation.

##### *I-1-2/ Contrôle RMN des anhydrides*

Les solvants les plus couramment utilisés sont le chloroforme et l'acétonitrile deutérés. Il nous est apparu que des solutions d'anhydrides préparées dans le DMSO s'hydrolysent plus vite que dans le chloroforme ou l'acétonitrile deutérés.

##### *I-1-3/ Contrôle CCM des anhydrides*

Le solvant de migration est le plus souvent l'acétate d'éthyle pur ou un mélange dichlorométhane/méthanol : 9,5/0,5. Une observation en lumière UV est d'abord faite, vient ensuite la révélation colorimétrique.

Cette première méthode a été mise au point au laboratoire : la pulvérisation d'une solution de phénylhydrazine 1% dans l'acide acétique puis le chauffage de la plaque à l'épiradiateur permet de révéler principalement les anhydrides en C5 en formant in situ une pyridazinedione.

Une autre solution de révélation peut être utilisée, il s'agit d'un mélange fait extemporanément entre deux solutions A et B, 9/1 : Solution A 75 mg de vert de bromocrésol, 25 mg de bleu de bromophénol dans 100 ml d'éthanol, solution B : 250 mg de  $\text{KMnO}_4$ , 500 mg de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dans 100 mL d'eau distillée.<sup>75</sup>

#### **I-2/ Protocole général d'ouverture des anhydrides par les amines pour la réalisation de la bibliothèque de validation**

0,4 mmol d'anhydride sont solubilisées dans 1 mL de DMF (0,4 M). 0,4 mmol d'amine et 0,4 mmol de DIEA sont solubilisées dans 4 mL de DMF (0,1 M). La solution d'anhydride est versée sur la solution d'amine. Le milieu est agité à température ambiante pendant 5h. Des tests CCM et HPLC permettent de contrôler la réaction en cours. Après



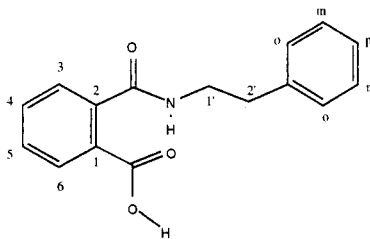
les 5h, la solution est évaporée sous pression réduite, à température inférieure à 40°C en faisant un azéotrope DMF/tétrachloroéthylène (1/5). Le résidu sec est alors solubilisé dans l'acétate d'éthyle et lavé par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique de pH 3. La phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, évaporée et le résidu est contrôlé par CCM et par HPLC. Lorsque la pureté du produit obtenu est insuffisante, une purification par chromatographie sur couche épaisse de silice ou HPLC préparative est effectuée.

### I-3/ résultats analytiques

**55**

**Acide N-(phénéthyl)-phtalamique**

MM = 269



**Rdt : 90%**

**SM (TOF, m/z) : 269,0**

**CCM (DCM/MeOH/AcOH 8/2/0,1) : Rf = 0,5**

**HPLC (phase inverse C18, 254 nm) : 100%, tr = 22,9 min**

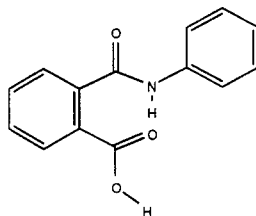
**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :**

2,8	(t, J=8 Hz, 2H : H <sub>2</sub> )
3,4	(m, 2H : H <sub>1'</sub> )
7,2	(m, 5H : 2H <sub>o</sub> , 2H <sub>m</sub> , H <sub>p</sub> )
7,4	(m, 1H : H <sub>6</sub> )
7,5	(m, 2H : H <sub>4</sub> , H <sub>5</sub> )
7,7	(m, 1H : H <sub>3</sub> )
8,7	(t non résolu, 1H : NH)

**56**

**Acide N-(phényl)-phtalamique**

MM = 241



**Rdt : 90%**

**SM (TOF, m/z) : 241,9**

**CCM (DCM/MeOH/AcOH 9/1/0,1) : Rf = 0,25**

**HPLC (phase inverse C18, 254 nm) : 100 %, tr = 21,2 min**

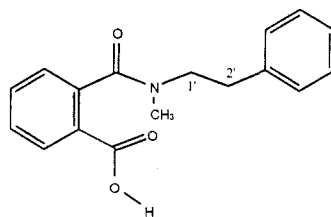
**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :**

7-8	(m, 9H : aromatiques)
8,7	(s, 1H : NH)

57

Acide N,N-(méthylphénéthyl)-phtalamique

MM=283



Rdt : 87 %

SM (TOF, m/z) : 283,7

CCM (DCM/MeOH/AcOH 9/1/0,1) : Rf = 0,66

HPLC (phase inverse C18) : 100 %, tr = 24,3 min

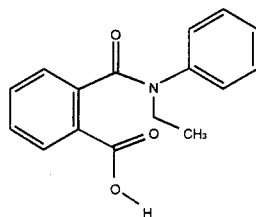
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) : 2 conformations 50/50

2,6	(s, 3H : CH <sub>3</sub> )
2,7	(dd, J = 5 ; 9Hz, 1H : H <sub>2'</sub> , conf 1)
2,9	(dd, J = 5 ; 9Hz, 1H : H <sub>2'</sub> , conf 2)
3,1	(dd, J = 8 ; 9 Hz, 1H : H <sub>1'</sub> , conf 1)
3,6	(dd, J = 8 ; 9 Hz, 1H : H <sub>1'</sub> , conf 2)
7,3	(m, 9H : aromatiques)
13,2	(s, 1H : COOH)

58

Acide N,N-(éthylphényl)-phtalamique

MM = 269



Rdt : 72 %

SM (TOF, m/z) : 269,8 (M/z), 292,2 (MM + 23), 252,1 (MM - 17), 224,1 (MM - 45)

CCM (DCM/MeOH/AcOH 9/1/0,1) : Rf = 0,75

HPLC (phase inverse C18, 254 nm) : 86,3 %, tr = 23,3 min

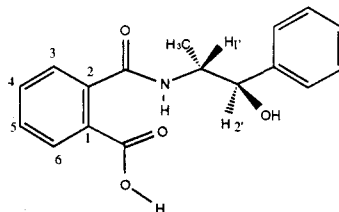
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :

1,1	(t, J = 7 Hz, 3H : CH <sub>3</sub> )
3,8	(q, J = 7 Hz, 2H : CH <sub>2</sub> )
7,5	(m, 9H : aromatiques)
13,5	(s, 1H : COOH)

59

Acide N-((1'R,2'S)-1'-méthyl-2'-hydroxyphénéthyl)-phtalamique

MM = 299



Rdt : 89,3 %

SM (TOF, m/z) : 300,0

CCM (DCM/MeOH 9/1) : Rf = 0,3

HPLC (phase inverse C18, 254 nm) : 99 %, tr = 20,2 min

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :

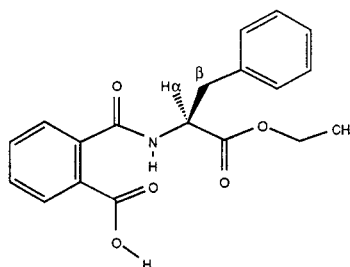
1,1	(d, J = 7 Hz, 3H : CH <sub>3</sub> )
4,1	(m, 1H : H <sub>1'</sub> )
4,7	(d, J = 5,5 Hz, 1H : H <sub>2'</sub> )
5,3	(s, 1H : OH)
7,1	(m, 1H : H <sub>5</sub> )

7,3	(m, 5H : aromatiques)
7,5	(m, 2H : H <sub>3</sub> , H <sub>4</sub> )
7,7	(m, 1H : H <sub>6</sub> )
8,1	(d, J = 8,5 Hz, 1H : CONH)
12,5	(s, 1H : COOH)

## 60

### N-Phtalyl phénylalaninate d'éthyle

MM = 341



Rdt : 79%

SM (TOF, m/z) : 341,6

CCM (DCM/MeOH 8/2) : Rf = 0,5

HPLC (phase inverse C18, 254 nm) : 100 %, tr = 25,5 min

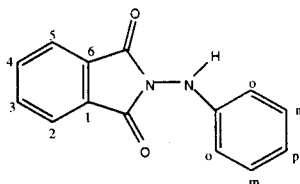
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :

1,1	(t, J=7 Hz, 3H : CH <sub>3</sub> )
3,1	(d, J= 5Hz, 2H : H <sub>β</sub> )
4,1	(q, J = 7 Hz, 2H : CH <sub>2</sub> )
4,6	(m, 1H : H <sub>α</sub> )
7,5	(m, 9H : aromatiques)
8,8	(d, J= 7Hz, 1H : NH)
11,9	(s, 1H : COOH)

## 61

### N-(phénéthylamino)-phtalimide

MM = 238



Rdt : 96%

CCM (DCM/MeOH/AcOH 9/1/0,1) : Rf = 0,7

HPLC (phase inverse C18, 254 nm) : 100%, tr = 20,1 min

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :

après purification, on n'isole que le phtalimide

6,7	(m, 3H : 2H <sub>o</sub> et H <sub>p</sub> )
7,2	(m, 2H : 2 H <sub>m</sub> )
7,9	(m, 4H : H <sub>3</sub> , H <sub>4</sub> , H <sub>5</sub> , H <sub>6</sub> )
8,5	(s, 1H : CONH)
10,1	(s, 1H : COOH)

62

Acide N-(1'-furfurylhydrazyl)-  
phtalamique

MM = 255,5

Rdt : 99%

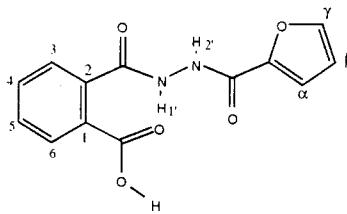
SM (TOF, m/z) : 255,5 (MM - OH)

CCM (DCM/MeOH/AcOH 9/1/0,1) : Rf = 0,3

HPLC (phase inverse C18, 254 nm) : 100 %, tr = 15,5 min

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :

6,7 (m, 1H : H<sub>β</sub>)  
7,4 (m, 1H : H<sub>β</sub>)  
7,9 (m, 5H : H<sub>α</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>)  
11,2 (s, 1H : COOH)



63

Acide N-(paranitrophenylhydrazonyl)-  
phtalamique

MM = 313

Rdt : 99%

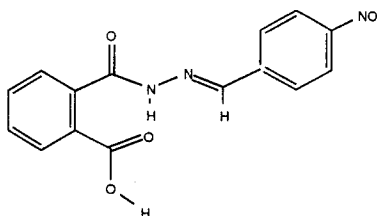
SM (TOF, m/z) : 313,5

CCM (DCM/MeOH/AcOH 9/1/0,1) : Rf = 0,4

HPLC (phase inverse C18, 254 nm) : 98%, tr = 23,8 min

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :

7,9 (m, 8H : aromatiques)  
12,1 (s, 1H : NH)  
13,0 (s, 1H : COOH)



64

Acide N-(5-aminoindazolyl)-  
phtalamique

MM = 281

Rdt : 74%

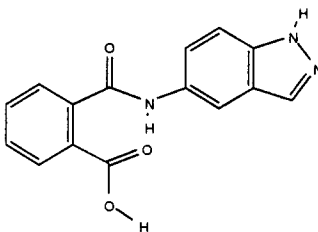
SM (TOF, m/z) : 281,6 et 264,4 (MM - OH)

CCM (DCM/MeOH/AcOH 9/1/0,1) : Rf = 0,76

HPLC (phase inverse C18, 254 nm) : 83,8% (tr = 19,2 mn) et 15,2% d'imide  
supposé (tr = 24 mn)

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :

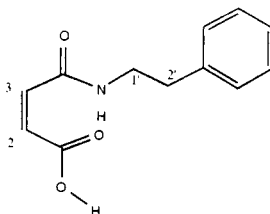
7,8 (m, 8H : aromatiques)  
10,6 (s, 1H : CONH)  
13,0 (s, 1H, COOH)



71

Acide N-(phénéthyl)-maléamique

MM = 219



Rdt : 70%

SM (TOF, m/z) : 219

CCM (DCM/MeOH/AcOH 9/1/0,1) : Rf = 0,53

HPLC (phase inverse C18, 254 nm) : 100%, tr = 23 min

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d6) :

2,8 (t, J = 7Hz, 2H : H<sub>2</sub>)

3,4 (m, 2H, H<sub>1</sub>)

6,2 (d, J = 12Hz, 1H : H<sub>3</sub>)

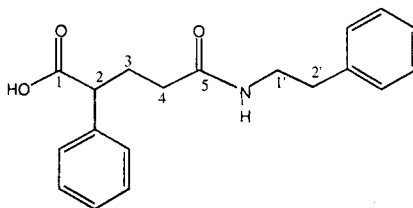
6,4 (d, J = 12Hz, 1H : H<sub>2</sub>)

7,3 (m, 5H : aromatiques)

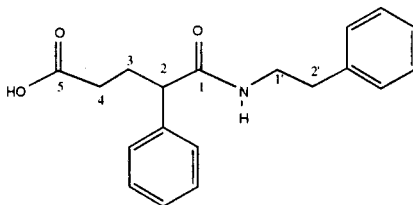
9,1 (m, 1H : CONH)

72

Acide (R,S) 2-phényl-N-(phénéthyl)-glutaramique



Acide (R,S) 4-phényl-N-(phénéthyl)-glutaramique



MM = 311

Rdt : 88%, deux régioisomères A et B non séparés, A/B = 66/33

SM (TOF, m/z) : 312,2; 295,5 (MM - OH + H<sup>+</sup>); 267,6 (MM - COOH)

CCM (DCM/MeOH/AcOH 9/1/0,1) : Rf = 0,61 et 0,57

HPLC (phase inverse C18, 254 nm) : 100% (25,6 et 25,9 min)

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d6) :

2,0 (m, 4H : H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>)

2,7 (m, 2H, H<sub>2</sub>)

3,2 (t, J = 6Hz, 2H A : H<sub>1</sub>)

3,5 (t, J = 6Hz, 2H B : H<sub>1</sub>)

7,5 (m, 10H : aromatiques)

7,9 (t, J = 6Hz, 1H A : NHCO)

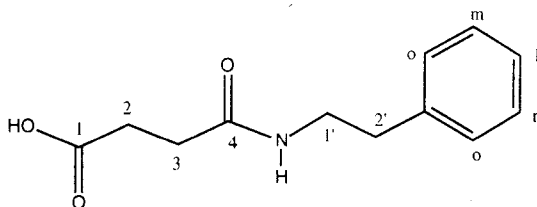
8,1 (t, J = 6Hz, 1H B : NHCO)

12,1 (s, 1H : COOH)

68

Acide N-(phénéthyl)-succinamique

MM = 221



Rdt : 90%

SM (TOF, m/z) : 221,0

CCM (DCM/MeOH/AcOH 9/1/0,1) : Rf = 0,4

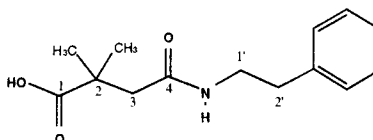
HPLC (phase inverse C18, 215 nm) : 94,7%, tr = 20 min

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :

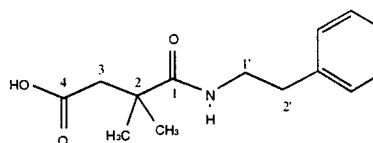
2,3	(t, J = 7Hz, 2H : H <sub>3</sub> )
2,4	(t, J = 7Hz, 2H : H <sub>2</sub> )
2,7	(t, J = 7Hz, 2H : H <sub>2</sub> )
3,2	(m, 2H : H <sub>1'</sub> )
7,2	(m, 3H : 2H <sub>o</sub> , H <sub>p</sub> )
7,3	(m, 2H : 2H <sub>m</sub> )
8,0	(t, J = 5,5Hz, 1H : CONH)
12,0	(s, 1H : COOH)

69

Acide 2,2-diméthyl-N-(phénéthyl)-succinamique



Acide 3,3-diméthyl-N-(phénéthyl)-succinamique



MM = 249

Rdt : 77%, deux régioisomères A et B, non séparés, A/B = 62,5/37,5

SM (TOF, m/z) : 249,0

CCM (DCM/MeOH/AcOH 9/1/0,1) : Rf = 0,6 et 0,7

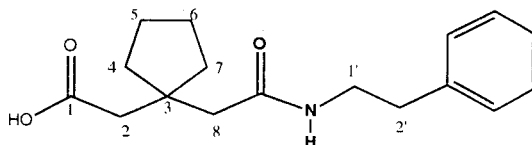
HPLC (phase inverse C18, 254 nm) : 94,1% tr = 22,7 et 22,9 min

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :

1,1	(s, 6H A : CH <sub>3</sub> )
1,2	(s, 6H B, CH <sub>3</sub> )
2,3	(s, 2H A : H <sub>3</sub> )
2,4	(s, 2H B : H <sub>3</sub> )
2,7	(t, J = 7Hz, 2H : H <sub>2</sub> )
3,2	(m, 2H : H <sub>1'</sub> )
7,2	(m, 5H : aromatiques)
7,5	(t, J = 5,5Hz, 1H B : CONH)
7,9	(t, J = 5,5Hz, 1H A : CONH)
12,0	(s, 1H : COOH)

73

**Acide N-(phénéthyl)-3,3-tétraméthylène-glutaramique**



MM = 289

Rdt : 97%

SM (TOF, m/z) : 290,6 et 271,1(-H<sub>2</sub>O)

CCM (DCM/MeOH/AcOH 9/1/0,1) : R<sub>f</sub> = 0,87

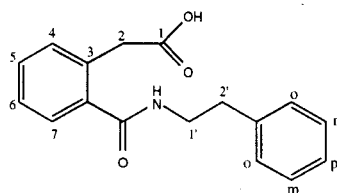
HPLC (phase inverse C18, 254 nm) : 100% tr = 26,3 min

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :

1,5	(m, 8H : H <sub>4</sub> , H <sub>5</sub> , H <sub>6</sub> , H <sub>7</sub> )
2,2	(s, 2H : H <sub>8</sub> )
2,4	(s, 2H : H <sub>2</sub> )
2,7	(t, J = 7Hz, 2H : H <sub>2</sub> )
3,3	(m, 2H : H <sub>1</sub> )
7,2	(m, 5H : aromatiques)
8,0	(t, J = 5,5 Hz, 1H : NH)
12,2	(s, 1H, COOH)

74

**Acide 2-(N-phénéthyl)carboxamido-phénylacétique**



MM = 283

Rdt : 81%, un seul régioisomère connu par co-injection avec une référence obtenue par une autre méthode

SM (TOF, m/z) : 284,4

CCM (DCM/MeOH/AcOH 9/1/0,1) : R<sub>f</sub> = 0,77

HPLC (phase inverse C18, 254 nm) : 90,6%, tr = 24,8 min

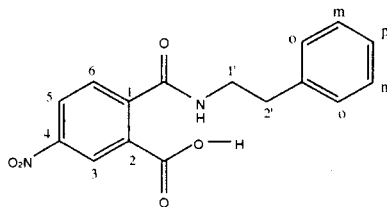
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :

2,7	(t, J = 7,5Hz, 2H : H <sub>2</sub> )
3,3	(m, 2H : H <sub>1</sub> )
3,8	(s, 2H : H <sub>2</sub> )
7,2	(m, 6H : H <sub>7</sub> + 2H <sub>o</sub> , 2H <sub>m</sub> , H <sub>p</sub> )
7,3	(td, J = 1,5 ; 7,5Hz, 1H : H <sub>5</sub> )
7,5	(td, J = 1,5 ; 7,5 Hz, 1H : H <sub>6</sub> )
7,8	(dd, J = 1,5 ; 7,5 Hz, 1H : H <sub>4</sub> )
8,0	(t, J = 5,5Hz, 1H : NH)
12,9	(s, 1H : COOH)

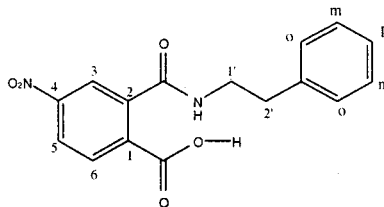
66

**Acide 2-(N-phénylcarboxamido)-5-nitrobenzoïque**

(numérotation affichée non conforme, utilisée pour l'attribution RMN)



**Acide 2-(N-phénylcarboxamido)-4-nitrobenzoïque**



Rdt : 52%, deux régioisomères **A** et **B**, non séparés **A/B** = 66/33

SM (TOF, m/z) : 314,9

CCM (DCM/MeOH/AcOH 9/1/0,1) : Rf = 0,22 et 0,33

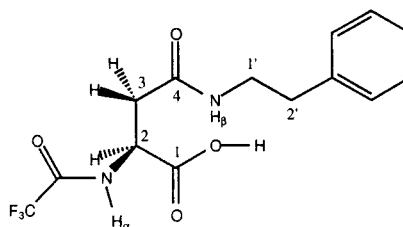
HPLC (phase inverse C18, 254 nm) : 50 % tr = 24,3 et 24,8 min

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :

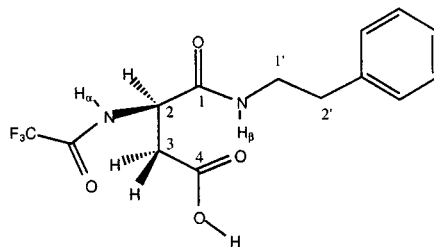
2,9	(m, 2H : H <sub>2</sub> )
3,4	(m, 2H : H <sub>1</sub> )
7,3	(m, 5H : 2 H <sub>o</sub> , 2 H <sub>m</sub> , H <sub>p</sub> )
7,6	(d, J = 8,5 Hz, 1H <b>B</b> : H <sub>6</sub> )
8,0	(dd, J = 2 ; 8,5 Hz, 1H <b>A</b> : H <sub>5</sub> )
8,1	(d, J = 2 Hz, 1H <b>B</b> , H <sub>3</sub> )
8,3	(dd, J = 2 ; 8,5 Hz, 1H <b>B</b> : H <sub>5</sub> )
8,4	(d, J = 8,5 Hz, 1H <b>A</b> , H <sub>6</sub> )
8,5	(d, J = 2 Hz, 1H <b>A</b> , H <sub>3</sub> )
8,6	(t, J = 5,5 Hz, 1H <b>A</b> : NH)
8,7	(t, J = 5,5 Hz, 1H <b>B</b> : NH)
14,0	(s, 1H : COOH)

70

**Acide N-(phényl)-2-(trifluoroacétamido)-succinamique**



**Acide N-(phényl)-3-(trifluoroacétamido)-succinamique**



MM = 332

Rdt : 87 %, deux régioisomères **A** et **B**, non séparés **A/B** = 62,5/37,5

CCM (DCM/MeOH/AcOH 9/1/0,1) : Rf = 0,31 et 0,53

HPLC (phase inverse C18, 215 nm) : 100%, tr = 23,5 et 23,7 min

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :

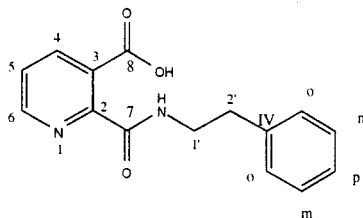
2,7	(m, 2H : H <sub>2</sub> )
3,3	(m, 2H : H <sub>1</sub> )



4,6	(m, 3H : H <sub>2</sub> , H <sub>3</sub> )
7,3	(m, 5H : aromatiques)
8,1	(t, J = 5,5Hz, 1H A : CONH <sub>β</sub> )
8,2	(t, J = 5,5Hz, 1H B : CONH <sub>β</sub> )
9,6	(d, J = 8Hz, 1H B : CONH <sub>α</sub> )
9,7	(d, J = 8Hz, 1H A : CONH <sub>α</sub> )
13,0	(s, 1H : COOH)

## 67 B

### Acide 2-(N-phénylcarboxamido)pyridine-3-carboxylique



MM = 270

Rdt : 71%, un seul régioisomère

SM (TOF, m/z) : 269,9

CCM (DCM/MeOH/AcOH 9/1/0,1) : Rf = 0,5

HPLC (phase inverse C18, 254 nm) : 94,3%, tr = 22,6 min

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :

2,86	(t, J=7Hz, 2H : H <sub>2</sub> )
3,47	(m, 2H : H <sub>1</sub> )
7,2	(m, 5H : aromatiques)
7,62	(dd, J = 5 ; 8Hz, 1H : H <sub>3</sub> )
8,06	(dd, J = 1 ; 8Hz, 1H : H <sub>4</sub> )
8,68	(dd, J = 1 ; 5Hz, 1H : H <sub>6</sub> )
8,75	(t, J = 5,5Hz, 1H : NH)
13,2	(s, 1H, COOH)

RMN <sup>13</sup>C (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) HSQC, HMBC

35	C <sub>2</sub> , HSQC avec H <sub>2</sub> , HMBC avec H <sub>1</sub> et H <sub>6</sub>
42	C <sub>1</sub> , HSQC avec H <sub>1</sub> , HMBC avec H <sub>2</sub>
126	C <sub>5</sub> , HSQC avec H <sub>5</sub> , HMBC avec H <sub>6</sub>
127	C <sub>m</sub> , HSQC avec H <sub>m</sub>
129	C <sub>6</sub> , HSQC avec H <sub>6</sub> , HMBC avec H <sub>2</sub>
	C <sub>o</sub> , HSQC avec H <sub>o</sub>
130	C <sub>3</sub> , HMBC avec H <sub>5</sub>
137	C <sub>4</sub> , HSQC avec H <sub>4</sub> , HMBC avec H <sub>6</sub> , H <sub>5</sub>
140	C <sub>IV</sub> , HMBC H <sub>1</sub> , H <sub>2</sub> , H <sub>o</sub>
150	C <sub>6</sub> , HSQC avec H <sub>6</sub> , HMBC avec H <sub>4</sub> , H <sub>5</sub>
151	C <sub>2</sub>
166	C <sub>7</sub> (CONH), HMBC avec H <sub>1</sub> , CONH et pas avec H <sub>4</sub>
169	C <sub>8</sub> (COOH), HMBC avec H <sub>4</sub>

## II/ UTILISATION DES MICRO-ONDES POUR LA SYNTHÈSE DES PYRIDAZINEDIONES

### II-1/ Procédure-type pour obtenir les pyridazinediones

A une solution d'anhydride (0,1 mmol) dans l'acide acétique glacial (2 mL), 0,1 mmol d'hydrazine sont additionnées. Le mélange résultant est irradié dans un four micro-ondes de type CEM SAM 155 à 500W pendant 2 à 6 min et évaporé. Le solide obtenu est purifié par chromatographie flash par un mélange éluant pentane/AcOEt ou DCM/MeOH pour obtenir le produit désiré.

### II-2/ Méthodes de Chromatographie

#### Méthode A :

Sur colonne C18 nucléosil, à un débit de 1 mL/min avec une méthode isocratique à 100% de l'éluant A pendant 5 min, suivie d'un gradient linéaire pendant lequel l'éluant B passe de 0 à 100% en 30 min (soit 3,33%/min).

#### Méthode B :

Sur colonne C18 à un débit de 2,75 mL/min avec une méthode isocratique à 100% de l'éluant A pendant 0,5 min, suivie d'un gradient linéaire pendant lequel l'éluant B passe de 0 à 100% en 5 min (soit 20 %/min).

#### Méthode C :

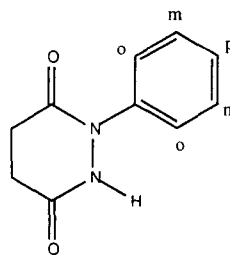
Sur colonne C18 nucléosil à un débit de 1 mL/min avec une méthode isocratique à 100% de l'éluant A pendant 1 min, suivie d'un gradient linéaire pendant lequel l'éluant B passe de 0 à 100% en 15 min (soit 6,66 %/min).

### II-3/ Résultats analytiques

76

#### 1-phényl-4,5-dihydropyridazin-3,6-dione

MM=189



Rdt : 87%

CCM (DCM/MeOH 9/1) : R<sub>f</sub> = 0,33

HPLC (phase inverse C18, méth A, 254 nm) : tr = 18,9 min

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-CD<sub>3</sub>OD) :

2,4-2,7 (m, 4H : CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)

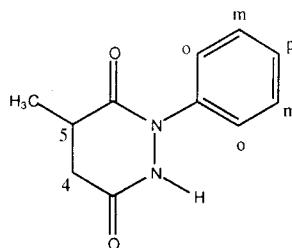
6,7 (m, 3H, H<sub>o</sub>, H<sub>p</sub>)

7,1 (t, J=8Hz, 2H : H<sub>m</sub>)

78

**5-méthyl-1-phényl-4,5-dihydropyridazin-3,6-dione**

MM=203



Rdt : 80%

CCM (Pentane/AcOEt 5/5) : Rf = 0,25

HPLC (phase inverse C18, méth A, 254 nm) : tr = 19,9 min

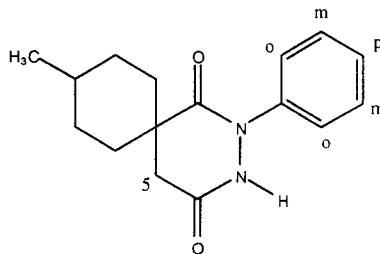
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d6) :

1,3	(d, J=7Hz, 3H : CH <sub>3</sub> )
2,3	(m, 1H : H <sub>5</sub> )
3,0	(m, 2H : H <sub>4</sub> )
6,7	(d, J=8Hz, 2H : H <sub>o</sub> )
6,8	(t, J=8Hz, 1H : H <sub>p</sub> )
7,1	(t, J=8Hz, 2H : H <sub>m</sub> )
8,4	(s, 1H : NH)

80

**N-phényl-9méthyl-2,3-diazaspiro (5,5) undécène-1,4-dione**

MM=271



Rdt : 74%

CCM (Pentane/AcOEt 5/5) : Rf = 0,8

HPLC (phase inverse C18, méth A, 254 nm) : tr = 29,2 min

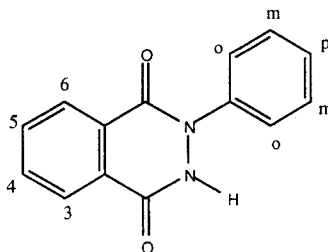
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d6) :

0,9	(d, J=7Hz, 3H : CH <sub>3</sub> )
1,0-1,7	(m, 9H : cyclohexyl)
2,8	(s, 2H : H <sub>5</sub> )
6,6	(d, J=8Hz, 2H : H <sub>o</sub> )
6,8	(t, J=8Hz, 1H : H <sub>p</sub> )
7,2	(t, J=8Hz, 2H : H <sub>m</sub> )
8,9	(s, 1H : NH)

82

**1-phénylbenzo(1,2-d)pyridazin-3,8-dione**

MM=237



Rdt : 72%

CCM (Pentane/AcOEt 5/5) : Rf = 0,55

HPLC (phase inverse C18, méth B, 254 nm) : tr = 3,75 min

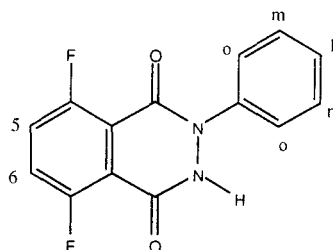
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d6) :

7,4	(t, J = 8Hz, 1H : H <sub>p</sub> )
7,5	(t, J = 8Hz, 2H, H <sub>m</sub> )
7,6	(d, J = 8Hz, 2H : H <sub>o</sub> )
7,8-8,3	(m, 4H : aromatiques)

84

**4,7-difluoro-1-phénylbenzo(1,2-d)pyridazin-3,8-dione**

MM=273



Rdt : 87%

CCM (Pentane/AcOEt 6/4) : Rf = 0,70

HPLC (phase inverse C18, méth A, 254 nm) : tr = 21,0 min

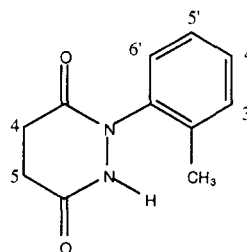
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :

6,8	(m, 3H : H <sub>o</sub> , H <sub>p</sub> )
7,2	(t, J = 8Hz, 2H : H <sub>m</sub> )
7,8	(m, 2H : H <sub>5</sub> , H <sub>6</sub> )
8,6	(s, 1H, NH)

86

**1-(o-toluy)-4,5-dihydropyridazin-3,6-dione**

MM=204



Rdt : 70%

CCM (DCM/MeOH 9/1) : Rf = 0,3

HPLC (phase inverse C18, méth C, 254 nm) : tr = 18,9 min

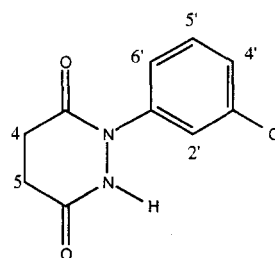
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :

2,2	(s, 3H, CH <sub>3</sub> )
2,7	(m, 4H, H <sub>4</sub> , H <sub>5</sub> )
6,4	(d, J = 8Hz, 1H : H <sub>6'</sub> )
6,7	(t, J = 8Hz, 1H : H <sub>5'</sub> )
7,0	(t, J = 8Hz, 1H : H <sub>4'</sub> )
7,1	(d, J = 8Hz, 1H : H <sub>3'</sub> )
7,7	(s, 1H : NH)

88

**1-(3'-chlorophényl)-4,5-dihydropyridazin-3,6-dione**

MM=223,5



Rdt : 82%

CCM (DCM/MeOH 9/1) : Rf = 0,24

HPLC (phase inverse C18, méth C, 254 nm) : tr = 20,4 min

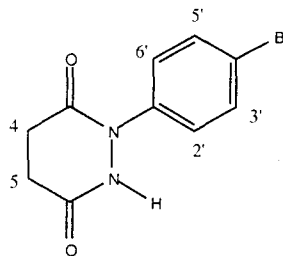
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d<sub>6</sub>) :

2,3-2,5	(m, 4H, H <sub>4</sub> , H <sub>5</sub> )
6,5-6,7	(m, 3H : H <sub>2'</sub> , H <sub>4'</sub> , H <sub>6'</sub> )
7,1	(t, J=8Hz, 1H : H <sub>5'</sub> )
9,7	(s, 1H, NH)

90

**1-(4'bromophényl)-4,5-dihydropyridazin-3,6-dione**

MM=268



Rdt : 76%

CCM (DCM/MeOH 9/1) : Rf = 0,25

HPLC (phase inverse C18, méth C, 254 nm) : tr = 21,3 min

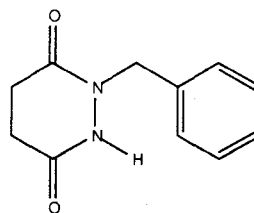
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz-DMSO-d6) :

2,3-2,5 (m, 4H, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>)  
6,7 (d, J = 8Hz, 2H : H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>)  
7,2 (d, J = 8Hz, 2H : H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>)  
9,7 (s, 1H, NH)

92

**1-benzyl-4,5-dihydropyridazin-3,6-dione**

MM=203



Rdt : 40%

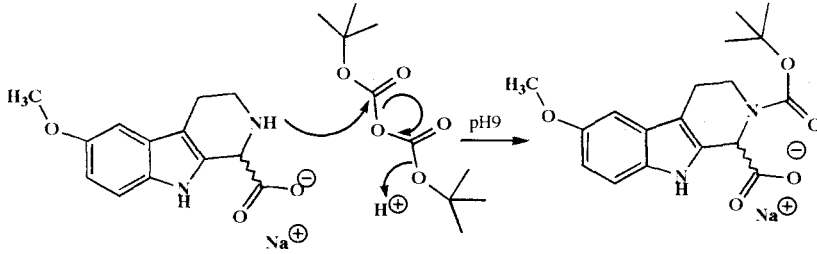
HPLC (phase inverse C18, méth C, 254 nm) : tr = 18,1 min



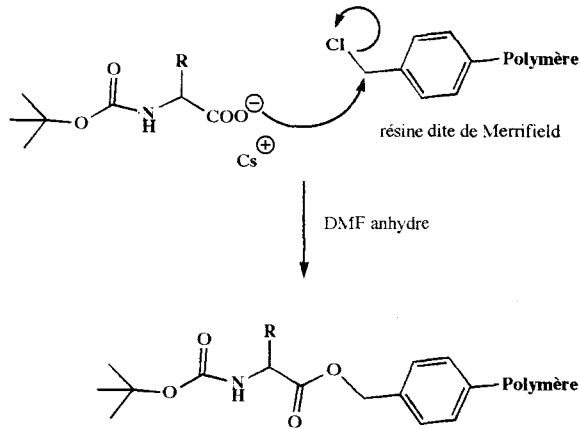
# **ANNEXE**

# ANNEXE 1

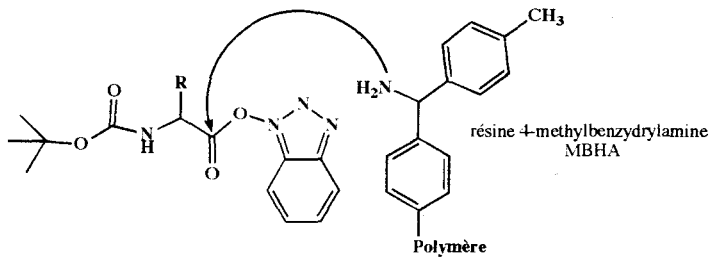
## Protection de l'acide aminé H-Mpi-OH par un tBoc



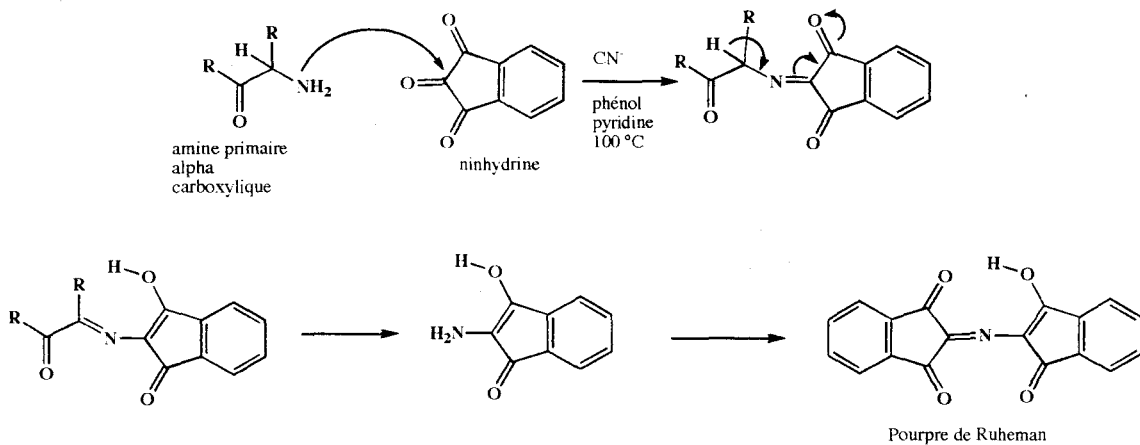
## Ancrage d'un tBoc-aminoacide à la résine de Merrifield



## Ancrage d'un tBoc-aminoacide à la résine MBHA

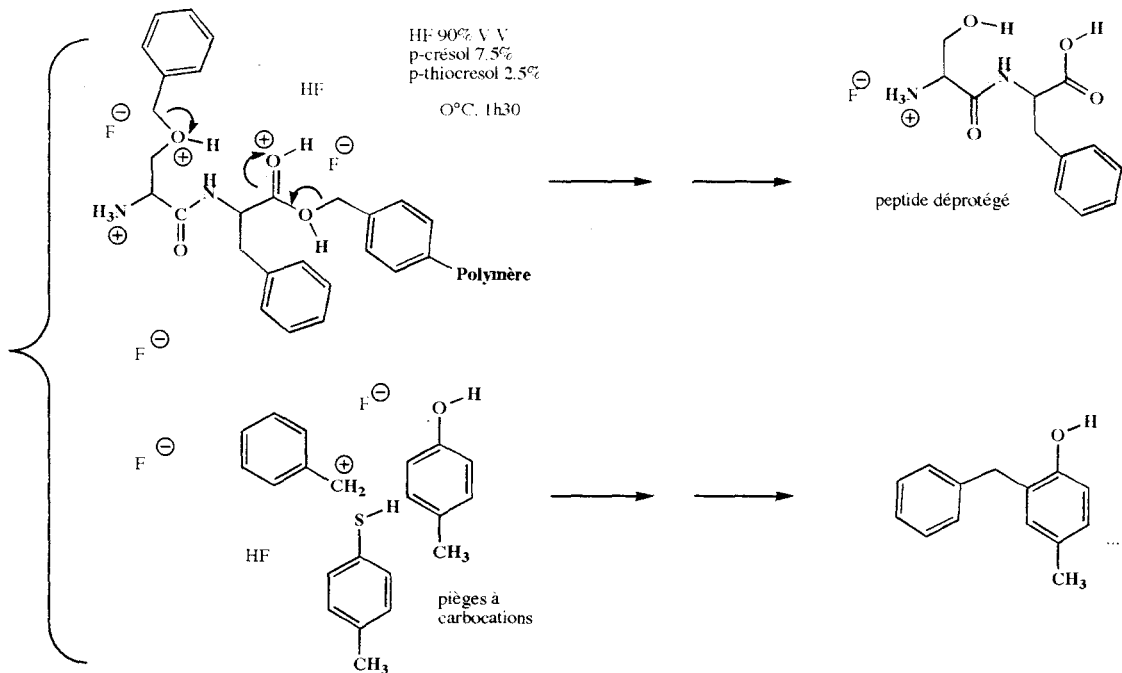


## Test de Kaiser

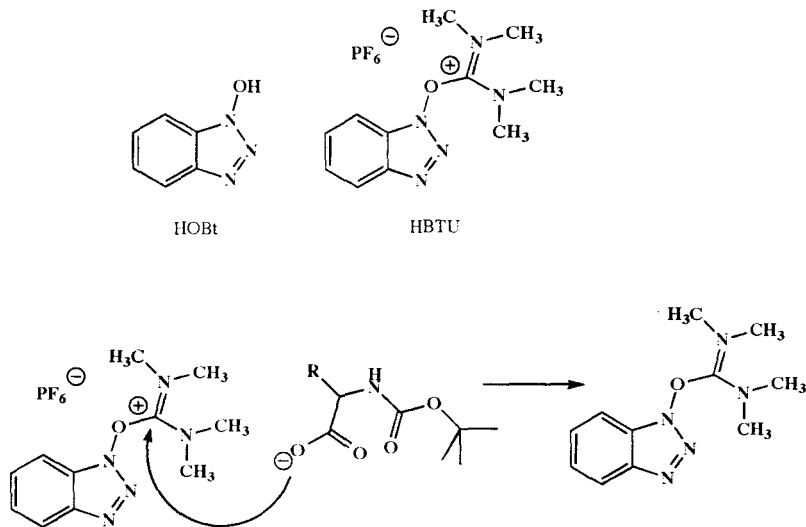


# ANNEXE 2

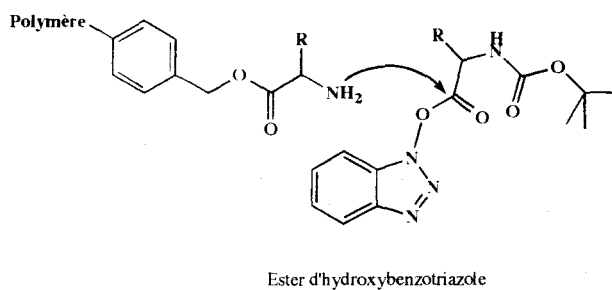
## Déprotection "High-HF"



## Activation



## Couplage

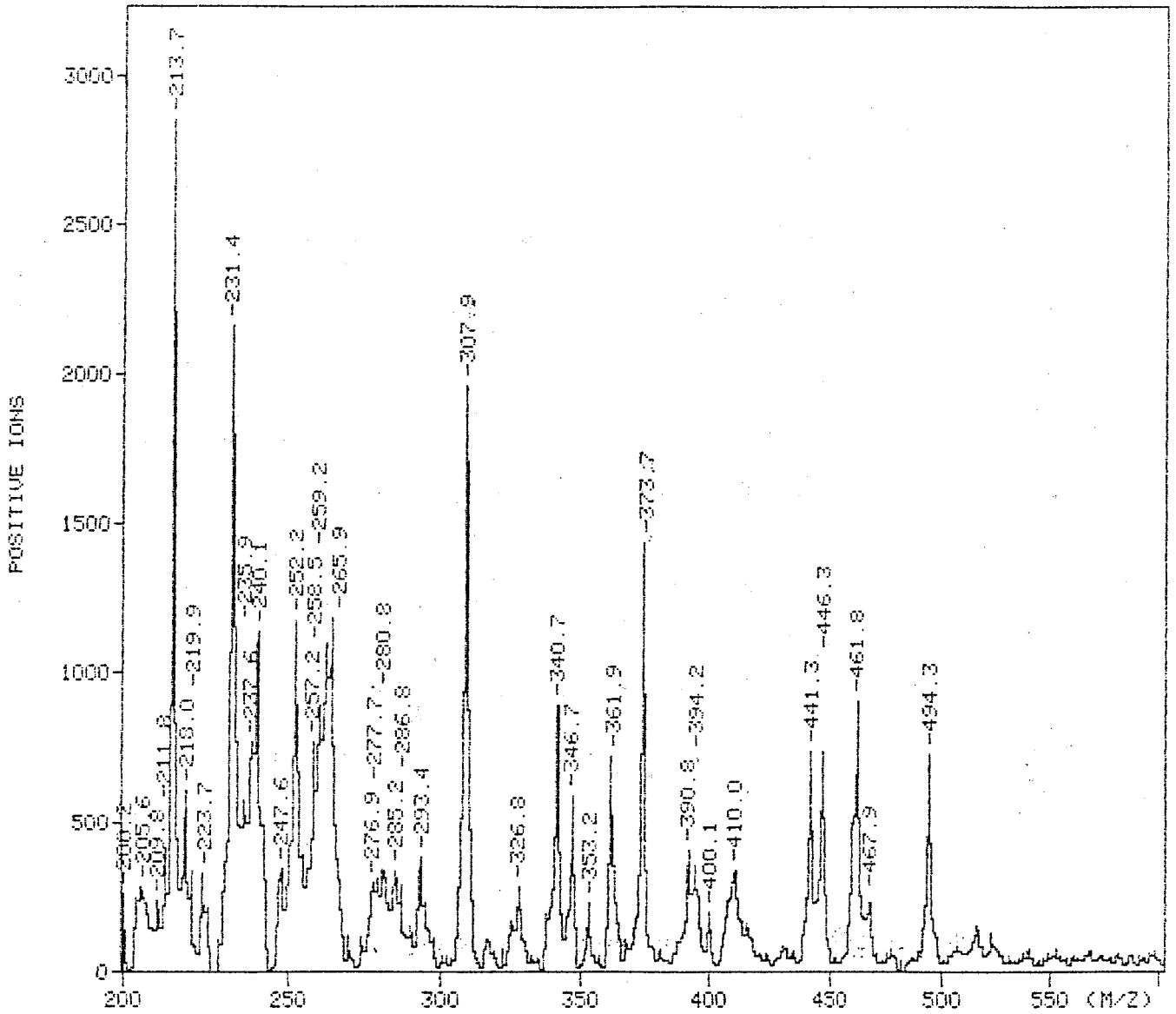




# ANNEXE 3

## Spectre de masse de la bibliothèque de validation de 27 produits en mélange

(Sum of 2 channels)



## **BIBLIOGRAPHIE**

# BIBLIOGRAPHIE

- 
- <sup>1</sup> OMS, Comité d'experts  
Lutte contre la maladie de Chagas  
*OMS, série de rapports techniques*, **1991**, n°811
- <sup>2</sup> C. Walsh, M. Bradley, K. Nadeau  
*T. B. I. S.*, Août **1991**, *16*, 305-309
- <sup>3</sup> A. Tromelin, M. Moutiez, D. Mezziane-Cherif, M. Aumercier, A. Tartar, C. Sergheraert  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, (10), 1971-1976
- <sup>4</sup> A. Fairlamb, P. Blackburn, P. Ulrich, B.T. Chait, A Cerami  
*Science*, **1985**, *227*, 1485-1487
- <sup>5</sup> G.B. Henderson, P. Ulrich, A. Fairlamb, A. Cerami  
*J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1986**, 593
- <sup>6</sup> M. Aumercier, D. Mezziane-Cherif, M. Moutiez, A. Tartar, C. Sergheraert  
*Analytical Biochemistry* **1994**, *223*, 161-164
- <sup>7</sup> V. Fauchet, L. Bourel, A. Tartar, C. Sergheraert  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, *4*, (21), 2559-2562
- <sup>8</sup> A. Fairlamb, P. Blackburn, P. Ulrich, B.T. Chait, A Cerami  
*Science*, **1985**, *227*, 1485-1487
- <sup>9</sup> G. Henderson, J. Glushka, D. Cowburn, A. Cerami  
*J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1*, **1990**, 911-914
- <sup>10</sup> A. Fairlamb, A. Cerami  
*Annu. Rev. Microbiol.*, **1992**, *46*, 695-729
- <sup>11</sup> A. Fairlamb, P. Blackburn, P. Ulrich, B.T. Chait, A Cerami  
*Science*, **1985**, *227*, 1485-1487
- <sup>12</sup> G.B. Henderson, P. Ulrich, A. Fairlamb, A. Cerami  
*J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1986**, 593
- <sup>13</sup> G. Sosnovsky, J. Lukszo,  
*Naturforsch*, **1986**, *41b*, 122
- <sup>14</sup> G. Nefkens  
*Nature*, **1960**, 309
- <sup>15</sup> L. Overman, M. Okazaki, P. Mishra  
*Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4391
- <sup>16</sup> Kaiser, Colescott, Bossinger, Cook  
*Analytical Biochemistry*, **avril 1970**, *34*, n°2
- <sup>17</sup> Sarin, Kent, Tam, Merrifield  
*Analytical Biochemistry*, **1981**, *117*, 147-151
- <sup>18</sup> *Tetrahedron Lett.* **1975**, 1216
- <sup>19</sup> S. Shames, A. Fairlamb, A. Cerami, C. Walsh

---

*Biochemistry*, **1986**, *25*, 3519

<sup>20</sup> S. De Castro, M. Soeiro, K. Higashi, M. Meirelles

*Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **1992**, *87*, 209-215

<sup>21</sup> E. Gordon, R. Barret, W. Dower, S. Fodor, M. Gallop

*J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 1385-1401

<sup>22</sup> M. Gallop, R. Barret, W. Dower, S. Fodor, E. Gordon

*J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 1233-1251

<sup>23</sup> *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 112-170

(série d'articles de différents auteurs)

<sup>24</sup> L. Bourel, X. Williard, I. Pop, R. Baudelle, D. Horvath, B. Déprez, P. Melnyk, A. Tartar

*L'actualité chimique*, déc. **1995**, 33-40

<sup>25</sup> P. Melnyk, L. Bourel, X. Williard, I. Pop, D. Horvath, B. Déprez, A. Tartar

*Actualités de chimie thérapeutique*, **1995**, 22e série, 51-66

<sup>26</sup> X. Williard, I. Pop, L. Bourel, D. Horvath, R. Baudelle, P. Melnyk, B. Déprez, A. Tartar

*Eur. J. Med. Chem.*, **1996**, *36*, 87-98

<sup>27</sup> R. Baudelle, L. Bourel, R. Poulain, S. Vendeville, A. Tartar

« Premier symposium français sur la chimie combinatoire, Rennes 29-30 Octobre 1996 »

*L'actualité chimique*, à paraître en Janvier **1997**

<sup>28</sup> R. Houghten, C. Pinilla, S. Blondelle, J. Appel, C. Dooley, J. Cuervo

*Nature*, **1991**, *354*, 84-86

<sup>29</sup> C. Pinilla, J. Appel, P. Blanc, R. Houghten

*Biotechniques*, **1992**, *13*, 901-905

<sup>30</sup> C. Dooley, R. Houghten

*Life Sci.*, **1993**, *52*, 1509-1517

<sup>31</sup> B. Déprez, X. Williard, L. Bourel, H. Coste, F. Hyafil, A. Tartar

*J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 5405-5406.

<sup>32</sup> K. Lam, S. Salmon, E. Hersh, V. Hruby, W. Kazmierski, R. Knapp

*Nature*, **1991**, *354*, 82-84

<sup>33</sup> K. Janda

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 10779-10785

<sup>34</sup> W. Rapp

« Automation and Miniaturisation. New Strategies in Combinatorial Chemistry »

1er Symposium Français sur la Chimie Combinatoire, Rennes 29-30 octobre 1996

<sup>35</sup> R. Zuckermann, J. Kerr, S. Kent, W. Moos

*J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 10646-10647

<sup>36</sup> R. Zuckermann, E. Martin, D. Spellmeyer, G. Stauber, K. Shoemaker, J. Kerr, G.

Figliozzi, D. Goff, M. Siani, R. Simon, S. Banville, E. Brown, L. Wang, L. richter, W. Moos

*J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 2678-2685

<sup>37</sup> C. Cho, E. Moran, S. Cherry, J. Stephans, S. Fodor, C. Addams, A. Sundaram, J. Jacobs,

P. Schutz

---

*Science*, **1993**, *261*, 1303-1305

<sup>38</sup> M. Patek, B. Drake, M. Lebl

*Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 9169-9172

<sup>39</sup> S. Hobbs de Witt, J. Kiely, C. Stankovic, M. Schroeder, D. Reynolds Cody, M. Pavia,  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 6909-6913

<sup>40</sup> C. Chen, L. Ahlbergrandall, R. Miller, A. Jones, M. Kurth

*J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 2661-2662

<sup>41</sup> D. Goff, R. Kuckerman,

*J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 5748-5749

<sup>42</sup> A. Furka, E. Campian, M. Peterson, H. Saneii

« Combinatorial Chemistry : past and present developments »

Solid Phase Synthesis and Combinatorial Chemistry Libraries, Edimburg, Sept 12-18, **1995**

<sup>43</sup> X. Williard

« Nouvelle méthode de découverte de nouveaux médicaments : première partie :  
conception et synthèse d'une bibliothèque combinatoire de 15625 molécules. Evaluation  
pharmacologique »,

Mémoire pour l'obtention du DEA de Chimie Organique, Université de Lille I, le 22 Juin **1994**

<sup>44</sup>B. Déprez

Thèse de Doctorat en Chimie Organique de l'Université de Lille I, à soutenir en **1997**

<sup>45</sup> T. Christensen

*Acta Chemica Scandinavica, B*, **1979**, *33*, 763-766

<sup>46</sup> P. Gross, D. Richter, G. Robertson

*Vasopressin*, IVth International Vasopressin Conference, May 23-27, **1993**, Berlin, Germany

<sup>47</sup> F. Laszlo, F. Laszlo Jr, D. De Wied

*Pharmacological Review*, **1991**, *43*, (1), 73-108

<sup>48</sup> L. Bourel

« Nouvelle méthode de découverte de nouveaux médicaments. Deuxième partie :  
synthèse d'analogues d'un antagoniste tripeptidique du récepteur à la vasopressine de type 2.

Premiers résultats des tests biologiques sur récepteurs rénaux porcins »

Mémoire pour l'obtention du DEA de Chimie Organique, Université de Lille I, le 22 Juin **1994**

<sup>49</sup> R. Merrifield

*J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149

<sup>50</sup> Manning *et coll.*

*J. Med. Chem.*, **1982**, *25*, 45-50

<sup>51</sup> Hagler

*The peptides*, Meienhofer J. Ed. , Academic Press, New York, **1985**, *7*, 213-299

<sup>52</sup> Hagler *et coll.*

*Science*, **1985**, *227*, 1309-1315

<sup>53</sup> W. Kazmierski, H. Yamamura, V. Hruby

*J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 2275-2283

---

<sup>54</sup> J. Bartos, M. Pesez

Pratique de l'analyse organique colorimétrique et fluorimétrique, 2e éd. Masson

<sup>55</sup> O. Keller, J. Rudinger

*Helv. Chim. Acta.*, **1975**, 58, (2), 62-63, 531-541

<sup>56</sup> J. Billman, W. Harting

*J. Am. Chem. Soc.*, **1948**, 70, 1473

<sup>57</sup> G. Nefkens

*Nature*, **1960**, 4709, 309

<sup>58</sup> I. Pop, B. Déprez, A. Tartar

*J. Org. Chem.*, accepté pour publication

<sup>59</sup> Y. Jean, F. Volatron

Les orbitales moléculaires en chimie, introduction et application. Ed. Mc Graw Hill, 305-308

<sup>60</sup> Speckamp *et coll.*

*Tetrahedron*, **1978**, 34, 179-187

<sup>61</sup> T. Watanabe, S. Ohki (Tokyo Coll. Pharm., Tokyo, Japan)

*Yakugaku Zasshi*, **1973**, 93, (7), 845-53

<sup>62</sup> a) A. Bose, M. Manhas, B. Banik, E. Robb

*Res. Chem. Intermed.*, **1994**, 20, (1), 1-11

b) A. Bose, M. Manhas, M. Ghosh, V. Raju, K. Tabei

*Heterocycles*, **1990**, 30, (2), 741-744

c) A. Loupy

*Spectra Analyse*, Nov-Déc. **1993**, 175

<sup>63</sup> L. Bourel, A. Tartar, P. Melnyk

*Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, (24), 4145-4148

<sup>64</sup> E. Fischer

*Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1886**, 236, 147-160

<sup>65</sup> E. Täuber

*Ber.*, **1895**, 28, 451-469

<sup>66</sup> H. Gottfried, F. Hannelore

*Progress in Medicinal Chemistry*, **1990**, 27, 1-49

<sup>67</sup> M. Negwer

*Organic Chemical Drugs and Synonyms* (Akademie - Verlag Berlin), **1987**, I-III

<sup>68</sup> C. Wermuth

*Act. Chim. Thér.*, **1985**, 12, 3-35

<sup>69</sup> P. Pilleboue-Melnyk

Doctorat de Chimie de l'Université de Paris VI, 26 janvier 1993

<sup>70</sup> Four domestique : Arthur Martin 506 25

Four de laboratoire : CEM SAM 155

---

<sup>71</sup> A. Katritzky, C. Rees

*Comprehensive Heterocyclic Chemistry* (Pergamon Press-Oxford), **1984**, 3, (47)

<sup>72</sup> R. Letsinger, M. Koenet, V. Mahadevan, D. Jerina

*J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 5163

<sup>73</sup> M. Guernet, M. Hamon

Abrégé de Chimie Analytique, tome 1, Chimie des solutions, 2e édition, 137-138

<sup>74</sup> H. Lutz

*J. Biol. Chem.* **1982**, 267, 1109

<sup>75</sup> J. Paskova, V. Munk, *J. Chromatog.* **1960**, 4, 241.