

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Université de Lille I

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1

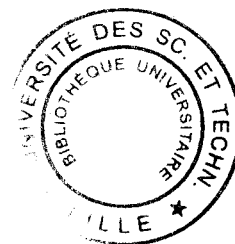
Discipline : Chimie Organique et Macromoléculaire

Présentée et soutenue publiquement

par

NICOLAS WILLAND

Le 8 Octobre 2003



CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE CHIMIOTHÈQUES

GENERALISTES ET FOCALISÉES.

APPLICATION A PLUSIEURS MODELES

BIOLOGIQUES ET STRUCTURAUX.

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur André TARTAR

JURY

M. André TARTAR	Professeur, Faculté de Pharmacie Lille 2	Président
M. Jean-Louis KRAUS	Professeur, Université de la Méditerranée	Rapporteur
M. Olivier LAFONT	Professeur, Faculté de Pharmacie Rouen	Rapporteur
M. Jacques BROCARD	Professeur, Université de Lille 1	Examineur
M. Jean-Claude GESQUIERE	Professeur, Faculté de Pharmacie Lille 2	Examineur
M. Michael ROE	Head of Chemistry, Ferring Southampton	Examineur

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Méthodologies en Chimie Combinatoire, Service de Chimie des Biomolécules, UMR-CNRS 8525 (Institut de Biologie de Lille et Faculté de Pharmacie de Lille 2), dirigé par Monsieur le Professeur Christian SERGHERAERT, grâce à une allocation de recherche ministérielle MENRT.

Il a fait l'objet d'une collaboration avec la société Ferring Research Limited, située à Southampton.

Monsieur André TARTAR

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. Je vous suis particulièrement reconnaissant de m'avoir accueilli dans votre laboratoire, de m'avoir donné l'opportunité de découvrir la chimie combinatoire et de m'avoir tant apporté sur le plan scientifique et personnel.

Monsieur Jean-Louis KRAUS et Monsieur Olivier LAFONT

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

Monsieur Michael ROE

Je suis très sensible à l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail en acceptant de m'ouvrir les portes de vos laboratoires et de collaborer dans la conception et l'élaboration des différents sujets que constitue cette thèse que vous me faites l'honneur de juger. Je vous en remercie.

Monsieur Jean-Claude GESQUIERE

Je vous remercie vivement de votre soutien scientifique et personnel tout au long de ces trois années de recherche. Vous m'avez été d'une aide précieuse de tous les instants. Vous me faites l'honneur de juger cette thèse, je vous en suis reconnaissant.

Monsieur Jacques BROCARD

Je vous remercie vivement de l'honneur que vous me faites d'accepter de juger cette thèse.

Je tiens également à remercier :

Terence BEGHYN et **Mikael CAUCHE** pour le travail qu'ils ont réalisé à mes côtés dans la synthèse de composés, présentés dans le chapitre 3.

tous les membres passés et présents du Laboratoire de Méthodologies en Chimie Combinatoire, **Christophe BOUTILLON**, **Olivier DEFERT**, **Rébecca DEPREZ-POULAIN**, **Fabien FECOURT**, **Jurgen JOSENS**, **Amaury KASPROWIAK**, pour leur soutien et leur amitié qu'ils m'ont témoignés tout au long de ces trois années.

Monsieur **Robert HAIGH** auquel j'associe tous les membres de la société Ferring pour m'avoir accueilli au sein de leur groupe, et m'avoir permis de découvrir le monde de l'industrie pharmaceutique. Ce fut une expérience extrêmement enrichissante sur les plans professionnels et humains.

tous les membres des équipes de l'Institut de Biologie de Lille et **Gérard MONTAGNE** en particulier, pour sa patience et son organisation à toute épreuve dans la réalisation des analyses RMN.

Monsieur **Guy NOVOGROCKI** pour son aide à la réalisation et au traitement des analyses radiocristallographiques.

Je tiens à associer à ce travail, mon amie, **Anne-Sophie MONNIER**, mes parents, **Gisèle et Paul WILLAND** et toute ma famille qui m'ont soutenu durant toutes ces années de dur labeur.

Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont rendu service et témoigné de la sympathie tout au long de ces années.

Publications et communications

ARTICLES

Peter Critchley, **M. Nicolas Willand**, Atvinder K. Rullay, David H. G. Crout.

Carbohydrate–protein interactions at interfaces: synthesis of thiolactosyl glycolipids and design of a working model for surface plasmon resonance.

Organic & Biomolecular Chemistry; Volume 1, Issue 6, Pages 928-938 (13 mars 2003).

Nicolas Willand, Jurgen Joossens, André L. Tartar, Jean-Claude Gesquière, D. Michael Evans and Michael B. Roe.

Solid and solution phase syntheses of the 2-cyanopyrrolidide DPP-IV inhibitor NVP-DPP-728.

Tetrahedron; Volume 58, Issue 28, Pages 5567-5754 (8 Juillet 2002).

Nicolas Willand, Jurgen Joossens, André L. Tartar, Jean-Claude Gesquière, D. Michael Evans and Michael B. Roe.

A solid phase strategy for the synthesis of NVP-DPP-728.

"Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis & Combinatorial Libraries", éditeur : R. Epton, 2002.

AUTRES COMMUNICATIONS (par affiche)

1/ **Nicolas Willand**, Jurgen Joossens, André L. Tartar, Jean-Claude Gesquière, D. Michael Evans and Michael B. Roe.

A solid phase strategy for the synthesis of NVP-DPP-728.

7th International symposium : "Solid Phase Synthesis & Combinatorial Libraries"

18-22 Septembre 2001, Southampton, Angleterre.

2/ **Nicolas Willand**, Jurgen Joossens, André L. Tartar, Jean-Claude Gesquière, D. Michael Evans and Michael B. Roe.

Solid phase synthesis of a DPP-IV inhibitor.

Drug Discovery Strategies: from lead to drugs.

16 Novembre 2001, Louvain-la-Neuve.

3/ **Nicolas Willand**, Jurgen Joossens, André L. Tartar, Jean-Claude Gesquière, D. Michael Evans and Michael B. Roe.

Utilisation de la protection orthogonale Dde/Boc en phase solide : application à la synthèse d'un inhibiteur de sérine protéase.

6^{èmes} Journées Jeunes Chercheurs (Société Française de Chimie)

5-6 Décembre 2001, Lille.

4/ **Nicolas Willand**, Niefang Yu, André L. Tartar, and Jean-Claude Gesquière.

A One pot Synthesis of trans-Isoquinolic Diacids from Amino Acids.

39^{èmes} Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique

1-4 Juillet 2003, Beaune.

Sommaire

REMERCIEMENTS	3
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	5
SOMMAIRE	7
ABREVIATIONS	10
AVANT-PROPOS	13
CHAPITRE 1 :	15
CONCEPTION ET SYNTHÈSE D'INHIBITEURS DE LA DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV.	15
1. INTRODUCTION : LE DIABÈTE DE TYPE 2.	16
1.1. CAUSES ET CONSÉQUENCES.	16
1.2. STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES.	17
1.2.1. LES SULFONYLUREES.	17
1.2.2. LES BIGUANIDES.	18
1.2.3. LES INHIBITEURS DES α -GLUCOSIDASES.	19
1.2.4. LES DÉRIVÉS DE STRUCTURE THIAZOLIDINEDIONE.	20
2. L'INHIBITION DE LA DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV (DPP-IV), UNE NOUVELLE CIBLE PHARMACOLOGIQUE POUR LE TRAITEMENT DU DIABÈTE DE TYPE 2.	20
2.1. LE GLP-1 : GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1.	21
2.2. LA DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV.	23
2.3. STRUCTURE DE LA DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV.	23
2.3.1. BIOCHIMIE STRUCTURALE DE LA DPP-IV.	24
2.3.2. ÉTUDE RADIOCRISTALLOGRAPHIQUE DE LA DPP-IV.	26
2.4. LES INHIBITEURS DE LA DPP-IV.	30
2.4.1. MIMES DE SUBSTRAT INHIBITEURS COMPÉTITIFS.	30
2.4.2. INHIBITEURS COVALENTS.	31
2.4.3. CANDIDATS MÉDICAMENTS.	32
3. PHARMACOMODULATION EN SÉRIE « AMINE SECONDAIRE ».	34
3.1. SYNTHÈSE EN PHASE HOMOGENE DE NVP-DPP-728.	34
3.1.1. SYNTHÈSE DE NVP-DPP-728 DÉCRITE PAR NOVARTIS.	34
3.1.2. NOUVELLE VOIE DE SYNTHÈSE DE NVP-DPP-728.	35
3.2. SYNTHÈSE SUR SUPPORT SOLIDE DE NVP-DPP-728 ET DE CERTAINS ANALOGUES.	41
3.2.1. STRATÉGIE DE SYNTHÈSE.	41
3.2.2. CHOIX DU BRAS DE FONCTIONNALISATION DU POLYMÈRE.	41
3.2.3. CHOIX DU SUPPORT SOLIDE.	42
3.2.4. CHOIX DE LA STRATÉGIE DE SYNTHÈSE.	42
3.2.5. MISE AU POINT DE LA SYNTHÈSE.	44
3.2.6. PROTECTION DES FONCTIONS AMINIÈES.	47
3.3. DESHYDRATATION EN PHASE HOMOGENE.	54
3.3.1. PROTOCOLES DE DESHYDRATATION.	54
3.3.2. LIBÉRATION DES FONCTIONS AMINES.	55
3.4. RESULTATS.	56
4. CONCLUSION.	57

5. SYNTHÈSE PARALLÈLE DE NOUVEAUX INHIBITEURS.	59
5.1. CONCEPTION DE NOUVEAUX INHIBITEURS DE DPP-IV.	59
5.1.1. APPROCHE « ANALOGUES DU SUBSTRAT ».	59
5.1.2. CONCEPTION D'ANALOGUES D'UN INHIBITEUR DE DPP-IV : PRÉSENTATION DE TSL-255.	59
5.1.3. STRATÉGIE DE SYNTHÈSE.	63
5.1.4. AUTRE STRATÉGIE DANS LA VARIATION DU SUBSTITUANT DE LA CHAÎNE LATÉRALE : INSERTION D'UN NOYAU DE TYPE TRIAZINE SUR LA CHAÎNE LATÉRALE LYSINE OU ORNITHINE.	70
5.2. RESULTATS ENZYMATIQUES ET CONCLUSION.	73
CHAPITRE 2 :	82

CONCEPTION ET SYNTHÈSE D'UNE CHIMIOTHÈQUE FOCALISÉE SUR LA STRUCTURE D'UN ANTAGONISTE DU RECEPTEUR D'UNE HORMONE PEPTIDIQUE. **82**

1. INTRODUCTION.	83
2. SYNTHÈSE D'ANALOGUES DE FE999032.	85
2.1. SYNTHÈSE D'ANALOGUES DE LA 2,3,4,5-TETRAHYDRO-1H-BENZAZÉPINE.	86
2.1.1. PRÉSENTATION DES TETRALONES COMMERCIALEMENT DISPONIBLES.	87
2.1.2. SYNTHÈSE DES OXIMES.	88
2.1.3. SYNTHÈSE DES AZÉPINES.	92
2.2. ÉTUDE DE LA RÉACTION D'ACYLATION.	95
2.2.1. INTRODUCTION À LA CHIMIE DE LA FORMATION DE LIAISONS AMIDES EN PHASE LIQUIDE.	96
2.2.2. APPLICATION EN SYNTHÈSE PARALLÈLE.	100
2.3. SYNTHÈSE PARALLÈLE D'ACYLTHIOURÉES.	113
2.3.1. PRÉPARATION DES ACYLISOTHIOCYANATES.	113
2.3.2. SYNTHÈSE EN PHASE PARALLÈLE DES ACYLTHIOURÉES.	114
3. CONCLUSIONS.	118

CHAPITRE 3 : **120**

CONCEPTION, SYNTHÈSE, ÉTUDE STRUCTURALE ET ÉVALUATION DE NOUVELLES STRUCTURES PRIVILÉGIÉES. **120**

1. INTRODUCTION.	121
1.1. CHIMIOTHÈQUES DE NOUVELLE GÉNÉRATION.	121
1.1.1. LA PRISE EN COMPTE DE LA « DRUGABILITÉ ».	121
1.1.2. LA RÈGLE DES 5.	123
1.1.3. L'INCIDENCE DE LA FLEXIBILITÉ.	124
1.2. NOTION DE « STRUCTURE PRIVILÉGIÉE ».	125
1.2.1. DÉFINITION.	125
1.2.2. PRÉSENTATION DE STRUCTURES PRIVILÉGIÉES.	126
1.3. VALIDATION DE NOUVELLES STRUCTURES PRIVILÉGIÉES PAR LA CONCEPTION D'UNE CHIMIOTHÈQUE.	128
2. PRÉSENTATION DU SCHEMA SYNTHÉTIQUE.	131
2.1. PRÉSENTATION DES VOIES DE SYNTHÈSE ENVISAGÉES.	131
2.2. CHOIX DU GROUPEMENT PROTÉCTEUR.	131
2.2.1. PREMIÈRE ÉTAPE : SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS [CHROMÈNE-2,4'-PIPERIDIN]-4(3H)-ONE .	132
2.2.2. SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS [CHROMÈNE-2,4'-PIPERIDIN]-4(3H)-ONE OXIME.	133
2.2.3. EXTENSION DE CYCLE.	134

3. <u>ETUDE DE LA REACTIVITE DU DERIVE SPIRO[1,5-BENZOXAZEPINE-2,4'-N-BENZYL-PIPERIDINE] ET DE SA DIVERSIFICATION.</u>	136
3.1. ETUDE DE LA REACTIVITE DE L'AZOTE BENZOXAZEPINIQUE.	136
3.1.1. REACTION D'ALKYLATION.	136
3.1.2. REACTION D'ACYLATION.	137
3.2. APPORT DE DIVERSITE SUR LE NOYAU AROMATIQUE.	138
3.2.1. SYNTHESE D'UNE CHIMIOTHEQUE.	138
3.2.2. SYNTHESE DU 7-(BENZYLOXY)-1'-BENZYL-4,5-DIHYDRO-3 <i>H</i> -SPIRO[1,5-BENZOXAZEPINE-2,4'-PIPERIDINE].	140
3.3. DEPROTECTION DE LA PIPERIDINE.	142
3.3.1. A PARTIR DES DERIVES ALKYLES ET ACYLES.	142
3.3.2. INTRODUCTION D'UN GROUPEMENT PROTECTEUR BOC SUR LE COMPOSE 89.	143
3.4. CONCLUSION.	143
4. <u>ÉTUDE STRUCTURALE D'UNE SPIRO-BENZOXAZEPINE.</u>	145
4.1. ETUDE RADIOCRISTALLOGRAPHIQUE.	145
4.2. ETUDE EN RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE.	147
4.2.1. ATTRIBUTION DES SPECTRES ¹ H ET ¹³ C.	147
4.2.2. ETUDE ROESY.	150
5. <u>CONCEPTION, SYNTHESE ET CRIBLAGE D'UNE CHIMIOTHEQUE BASEE SUR LA STRUCTURE SPIRO[BENZOXAZEPINE-PIPERIDINE].</u>	154
5.1. CONCEPTION DE LA CHIMIOTHEQUE.	154
5.2. SYNTHESE PARALLELE DE LA BANQUE.	155
5.2.1. SYNTHESE DU PRECURSEUR.	155
5.2.2. FONCTIONNALISATION DE LA FONCTION AMINEE EN PLAQUES 96 PUIITS.	155
5.2.3. DEPROTECTION ET FONCTIONNALISATION DE L'AZOTE PIPERIDINIQUE.	156
5.3. CRIBLAGE ET RESULTATS BIOLOGIQUES.	157
5.3.1. RESULTATS BIOLOGIQUES.	157
5.3.2. PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES.	158
5.3.3. PARAMETRES PHARMACO-CINETIQUES.	158
6. <u>CONCLUSION.</u>	158
<u>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.</u>	159
<u>MATERIEL ET METHODES.</u>	165

Abréviations

[MH] ⁺ :	ion moléculaire en spectrométrie de masse.
Å :	angström.
AA :	acide aminé.
AcOEt :	acétate d'éthyle.
Ax :	axial.
Bn :	benzyle.
Boc :	<i>tert</i> -butyloxycarbonyle.
BOP :	benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate.
CCM :	chromatographie sur couche mince.
ClogP :	logarithme du coefficient de partage octanol/eau calculé.
COSY :	correlated spectroscopy.
Da :	Dalton.
DCC :	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide.
DCM :	dichlorométhane.
DCU :	<i>N,N'</i> -dicyclohexylurée.
Dde :	2-acétyldimédone.
DEPT :	distortionless enhancement by polarization transfer (expérience RMN du ¹³ C).
DIBALH :	diisobutylaluminium hydride (hydrure de diisobutylaluminium).
DIEA :	diisopropyléthylamine.
DMAP :	<i>N,N'</i> -diméthylaminopyridine.
DMF :	<i>N,N'</i> -diméthylformamide.
DMSO :	diméthylsulfoxyde.
DPP-IV :	dipeptidyl peptidase IV.
EDCI :	1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide.
Eq :	équatorial.
éq :	équivalent.
F% :	fraction biodisponible.
Fmoc :	9 <i>H</i> -fluoren-9-ylméthoxyloxycarbonyle.
g :	gramme.
GH :	growth hormone.
GLP-1 :	glucagon like peptide 1.
GnRH :	gonadotropin releasing hormone.

GPCR :	G-protein coupled receptor.
h :	heure.
HBTU :	hexafluorophosphate de 2-(1 <i>H</i> _benzotriazol-1-yl)-1,3,3-tétraméthyluronium.
HOBt :	1-hydroxybenzotriazole.
HSQC :	heteronuclear single quantum coherence (expérience RMN mettant en évidence les couplages ^1H - ^{13}C).
Hz :	hertz.
kDa :	kiloDalton.
Kg :	kilogramme.
L :	litre.
LC-MS :	liquid chromatography coupled to mass spectroscopy (chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse).
logP :	logarithme du coefficient de partage octanol/eau.
M :	molaire.
MeOH :	méthanol.
Min. :	minute.
mL :	millilitre.
mM :	millimolaire.
mmole :	millimole.
MW :	molecular weight.
nm :	nanometre.
nM :	nanomolaire.
NMP :	<i>N</i> -méthylpyrrolidone.
NOE :	nuclear overhauser effect.
NOESY :	nuclear overhauser effect spectroscopy.
OMS :	organisation mondiale de la santé.
PEP :	prolyl endopeptidase.
P _f :	point de fusion.
pM :	picomolaire.
PPAR :	peroxisome proliferator-activated receptor.
Ppm :	partie par million.
PTSA :	partitioned total surface area.
PSA :	polar surface area.
PyBrop :	hexafluorophosphate de tripyrrolidinobromophosphonium.
R _f :	rapport frontal.
RMN :	résonance magnétique nucléaire.

S _n Ar :	substitution nucléophile aromatique.
TA :	température ambiante.
TBTU :	tétrafluoroborate de O-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyluronium.
TFA :	acide trifluoroacétique.
TFAA :	anhydride trifluoroacétique
THF :	tétrahydrofurane.
Tic :	acide 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoléine-1-carboxylique.
T _R :	temps de rétention.
μL :	microlitre
μM :	micromolaire.

Nomenclature des 20 acides aminés :

Ala :	Alanine
Arg :	Arginine
Asn :	Asparagine
Asp :	Acide aspartique
Cys :	Cystéine
Gln :	Glutamine
Glu :	Acide glutamique
Gly :	Glycine
His :	Histidine
Ile :	Isoleucine
Leu :	Leucine
Lys :	Lysine
Met :	Méthionine
Phe :	Phénylalanine
Pro :	Proline
Ser :	Sérine
Thr :	Thréonine
Trp :	Tryptophane
Tyr :	Tyrosine
Val :	Valine

Avant-propos

Ce manuscrit intitulé « **CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE CHIMIOTHÈQUES GENERALISTES ET FOCALISÉES. APPLICATION A PLUSIEURS MODELES BIOLOGIQUES ET STRUCTURAUX.** » présente les travaux réalisés depuis trois ans au sein du laboratoire de Méthodologies en Chimie Combinatoire, dirigé par les Professeurs Jean-Claude GESQUIERE, Annie MARCINCAL et André TARTAR.

Ces travaux s'articulent autour de trois grands thèmes majeurs, l'inhibition d'une cible enzymatique dans le traitement du diabète de type 2, la mise au point de nouvelles méthodologies dans la synthèse de ligands d'un récepteur à sept domaines transmembranaires, couplé à une protéine G et la conception de nouvelles structures privilégiées dans la découverte d'outils et de cibles thérapeutiques.

Ces thèmes majeurs sont des sujets abordés à l'heure actuelle par l'industrie pharmaceutique et représentent une ouverture vers de nouvelles perspectives.

Réalisés en association avec la société Ferring, ces travaux s'inscrivent dans une collaboration étroite entre la recherche académique et le développement industriel.

La première partie de cette thèse a pour objet la présentation, dans un premier temps, de deux nouvelles voies de synthèse d'un inhibiteur de référence, de la Dipeptidyl Peptidase IV. Une enzyme qui est considérée comme nouvelle cible pharmacologique dans le traitement du diabète de type 2. Dans un deuxième temps, la conception et la synthèse parallèle de nouveaux inhibiteurs de la DPP-IV sont abordées.

La seconde partie de ce manuscrit, expose la conception et la synthèse d'une chimiothèque, de 480 produits, construite autour de la structure d'un hit identifié par criblage à haut débit, dans un test d'inhibition de la liaison du GnRH à son récepteur. Cette synthèse a pour but la découverte de relations structure-activité dans la liaison de ces nouvelles structures avec le récepteur.

Enfin, la troisième partie présente une toute autre approche dans la découverte de nouvelles thérapies. Contrairement aux deux premières, décrites ci-dessus, une nouvelle stratégie très récente consiste à intervenir non plus après le criblage mais avant celui-ci en introduisant certaines contraintes dès la conception des chimiothèques, de telle sorte que les

molécules qui en seront issues présentent directement des caractéristiques favorables à un développement pharmaceutique. Dans le travail que nous avons réalisé, nous avons voulu montrer qu'il était possible de prendre en compte également un second critère qui est d'augmenter le pourcentage de composés actifs en privilégiant les structures connues pour leur capacité d'interaction avec les cibles pharmacologiques importantes.

Pour des raisons de stratégies industrielles, certains des résultats des travaux effectués au sein de Ferring n'ont pas pu être développés et présentés dans ce manuscrit.

CHAPITRE 1 :
Conception et synthèse d'inhibiteurs de la
Dipeptidyl Peptidase IV.

1. INTRODUCTION : LE DIABETE DE TYPE 2.

Le diabète de type 2 est une maladie caractérisée par deux types d'anomalies: des altérations de la production d'insuline (insulinosécrétion) et des anomalies des effets de l'insuline sur ses tissus cibles (insulinosensibilité). Le diabète de type 2 correspond à l'ancienne terminologie du diabète non insulino-dépendant (D.N.I.D.).

Le diabète de type 2 représente la forme la plus commune de diabète quelle que soit la région du monde étudiée et concerne actuellement environ 180 millions de personnes au niveau planétaire. Sa progression extrêmement rapide depuis quelques années a conduit l'OMS à parler d'épidémie, utilisant ce terme pour la première fois pour désigner une maladie non infectieuse.

Le diabète de type 2 représente 85 à 90 % des diabètes. Il pose un réel problème de santé publique car sa prévalence (rapport entre le nombre de cas observés dans une population et le nombre total d'individus de cette population) augmente parallèlement au vieillissement, à l'urbanisation, à la sédentarisation et au développement de l'obésité dans les populations industrialisées.

Les populations en voie de développement ne sont pas épargnées en raison des modifications de leur mode de vie : sédentarisation et migration en zone urbaine. Elles deviennent même aujourd'hui la cible principale de la maladie.

1.1. Causes et conséquences.

Les mécanismes, qui conduisent chez les patients atteints d'un diabète de type 2 à une détérioration progressive de l'insulinosécrétion, ne sont pas connus avec certitude. L'hypothèse de la glucotoxicité, liée à l'élévation de la concentration de glucose dans le sang, est reconnue comme la plus vraisemblable actuellement.

Les complications microvasculaires (rétinopathie, néphropathie, et neuropathie) sont la conséquence directe d'une toxicité du glucose.

Les complications macrovasculaires regroupent les accidents vasculaires cérébraux, les accidents coronariens et l'artérite au niveau des membres inférieurs. Ces lésions ne sont pas spécifiques au diabète. Mais contrairement à la population générale, les diabétiques sont touchés à un âge plus jeune. L'atteinte coronaire représente la principale cause de décès du diabète de type 2. Les accidents vasculaires cérébraux sont la deuxième cause de décès.

C'est une maladie multifactorielle : des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux, qui affectent l'insulinosécrétion et l'action de l'insuline, concourent à son développement et à son évolution.

1.2. Stratégies thérapeutiques.

Il n'existe pas de traitement curatif du diabète. Le but du traitement du diabète de type 2 est de combattre la progression de la maladie même, et d'empêcher le développement des complications chroniques en réalisant et en maintenant un bon contrôle métabolique.

Les hypoglycémiantes oraux sont le troisième volet du traitement du diabète non insulino-dépendant, après la diète et l'activité physique.

Il existe actuellement quatre familles d'hypoglycémiantes oraux : les sulfonylurées, les biguanides, les inhibiteurs des α -glucosidases et les thiazolidinediones.

1.2.1. Les sulfonylurées.

Les sulfonylurées stimulent la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas en les sensibilisant à l'action du glucose.

Elles se lient à un récepteur situé sur la membrane plasmique, appelé SUR (sulfonyleurea receptor), et dont on ne connaît pas le médiateur endogène, et inhibent l'efflux de potassium de la cellule β par fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants. L'élévation de la concentration de potassium intra-cellulaire qui s'ensuit crée une dépolarisation cellulaire suffisante pour déclencher l'ouverture des canaux calcium voltage-dépendants. C'est en définitive l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire qui provoque la sécrétion d'insuline.

Les sulfonylurées peuvent, de plus, inhiber la sécrétion de glucagon et sensibiliser les tissus cibles à l'action de l'insuline.

Les sulfonylurées s'administrent par voie orale, se fixent aux protéines plasmatiques, ont des demi-vies plasmatiques allant de cinq à dix heures et sont métabolisés au niveau hépatique.

Les nouveaux hypoglycémiantes, comme le Glicazide, sont actifs à doses beaucoup plus faibles que les anciens, comme le tolbutamide, qui ne sont plus commercialisés.

Il existe actuellement de nombreuses sulfonylurées utilisées pour le traitement du diabète de type 2. La structure d'un composé de première génération et celle d'un composé de deuxième génération, tous deux administrés par voie orale, sont présentées à la figure 1.

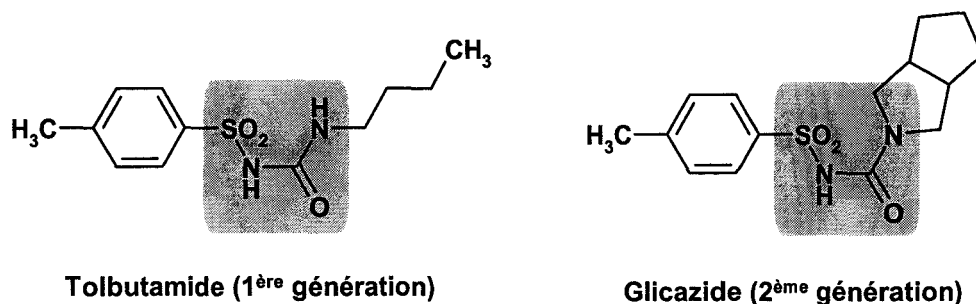


Figure 1. Structures de sulfonurées utilisées dans le traitement du diabète de type 2.

Le mode d'action des sulfonurées rend compte de deux effets secondaires néfastes :

- la prise de poids, secondaire à la stimulation de l'insulino-sécrétion. Elle est en général modeste, de 2 à 3 kgs.
- mais surtout le risque hypoglycémique. Il s'observe avec toutes les sulfonurées hypoglycémiantes sans exception. Toutefois il est plus important avec les sulfonurées de première génération à durée d'action particulièrement longue.

1.2.2. Les biguanides.

La métformine est un biguanide (figure 2). Elle diminue l'hyperglycémie sans risque d'hypoglycémie car elle n'abaisse pas la glycémie du sujet sain.

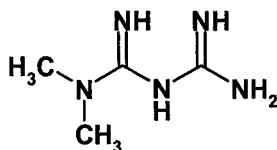


Figure 2. Structure d'un biguanide: la métformine.

Son mécanisme d'action est complexe. Elle agit en présence d'insuline :

- en favorisant l'utilisation du glucose par les tissus, notamment par les muscles squelettiques,
- en inhibant la néoglycogénèse hépatique, c'est-à-dire la formation du glycogène à partir des acides aminés et des lipides.

Contrairement aux sulfonurées, la métformine ne stimule pas la sécrétion d'insuline. Elle peut donc être considérée comme un potentialisateur de l'effet de l'insuline.

Elle est indiquée dans le traitement du diabète de type 2 non équilibré par un régime approprié, particulièrement chez les sujets en surpoids.

L'effet indésirable le plus grave de la métformine est l'acidose lactique, qui peut être mortelle, dont les signes prémonitoires sont des crampes, des troubles digestifs, des

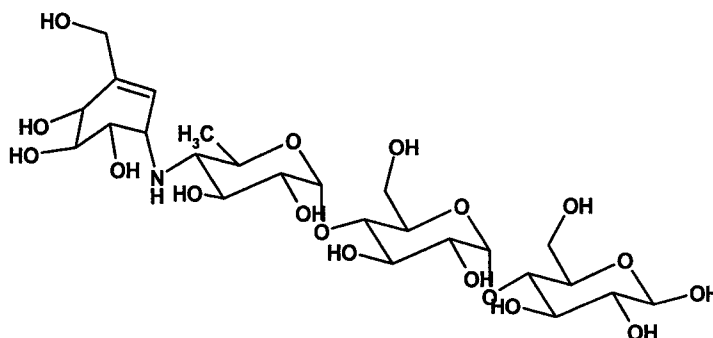
douleurs abdominales intenses, de l'asthénie. Cette acidose lactique se voit surtout chez l'insuffisant rénal ou l'insuffisant hépatique. Elle peut avoir d'autres effets indésirables : troubles digestifs divers, nausées, vomissements, diarrhées, surtout en début de traitement.

1.2.3. Les inhibiteurs des α -glucosidases.

Les α -glucosidases intestinales libèrent le glucose par hydrolyse des résidus d'amidon, des oligosaccharides et des disaccharides. Cette hydrolyse est nécessaire à l'absorption digestive des glucides car seuls les monosaccharides comme le glucose et le fructose sont absorbés.

Les α -glucosidases sont inhibées par des produits comme l'acarbose ou le miglitol, l'absorption digestive du glucose est réduite et retardée, et par là-même, l'hyperglycémie post-prandiale.

L'acarbose (figure 3) est un pseudotétracosaccharide qui se fixe avec une très grande affinité aux α -glucosidases et les inhibe. Son effet est de courte durée car il est hydrolysé et inactivé par les amylases et des enzymes bactériennes.



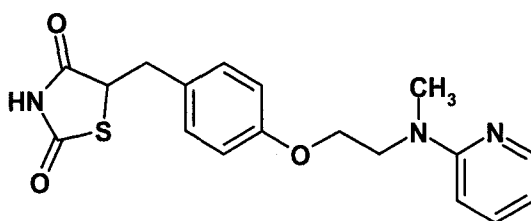
Acarbose

Figure 3. Structure de l'acarbose: inhibiteur de α -glucosidase.

L'inconvénient majeur est la stagnation et la fermentation des sucres non digérés dans l'intestin, responsables de flatulences, de douleurs digestives, de diarrhée, surtout en début de traitement.

1.2.4. Les dérivés de structure thiazolidinedione.

Les thiazolidinediones (figure 4), dont le chef de file a été la troglitazone, représentent une nouvelle classe thérapeutique utilisée dans le traitement du diabète de type 2 pour lutter contre l'insulinorésistance en augmentant l'utilisation périphérique du glucose.



Rosiglitazone

Figure 4. Structure d'une thiazolidinedione: rosiglitazone.

Leur mode d'action, original, implique les récepteurs nucléaires activés par des molécules lipidiques endogènes, les PPARs. Les thiazolidinediones se lient en effet aux PPARs du sous-type gamma, et cette liaison stimule l'expression de différents gènes impliqués dans l'utilisation du glucose au niveau du muscle et du tissu adipeux. La troglitazone a été utilisée lors d'essais cliniques, soit en monothérapie, soit en association avec des sulfonylurées, avec de la métformine ou avec de l'insuline. Globalement, ces essais montrent une diminution des glycémies à jeun et post-prandiales.

Les effets secondaires, outre les hypoglycémies si la troglitazone est utilisée en association, sont représentés essentiellement par une toxicité hépatique, qui nécessite une surveillance rapprochée des enzymes hépatiques au cours du traitement. L'évolution pondérale au long cours ainsi que l'effet sur la prévention cardiovasculaire, chez des patients par définition à risque, représentent enfin deux questions non encore résolues.

2. L'INHIBITION DE LA DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV (DPP-IV), UNE NOUVELLE CIBLE PHARMACOLOGIQUE POUR LE TRAITEMENT DU DIABETE DE TYPE 2.

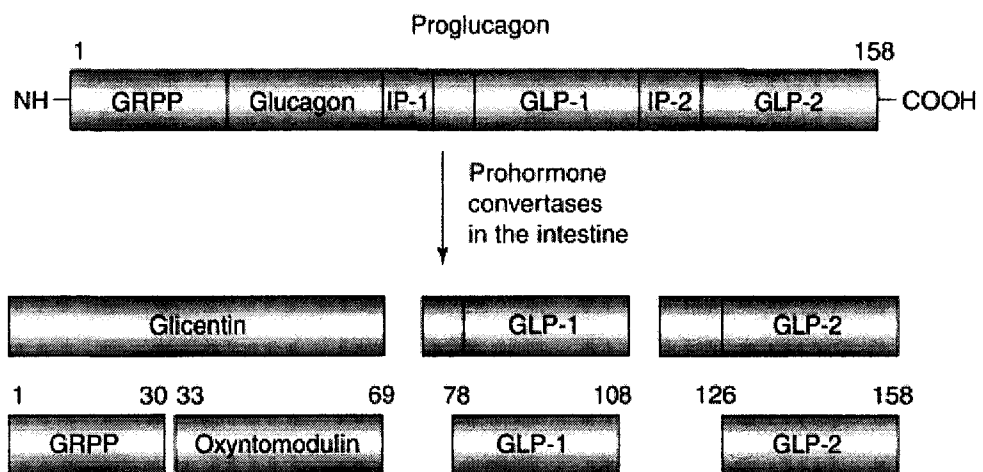
La gravité de la pathologie, son extension rapide et l'absence de médicaments totalement satisfaisants ont contribué à faire du diabète de type 2 un domaine de recherche privilégié pour l'industrie pharmaceutique. Parmi les nouvelles cibles thérapeutiques envisagées, le GLP-1 est sans doute l'une des plus prometteuses.

2.1. Le GLP-1 : Glucagon-Like Peptide-1.

Le GLP-1 est une hormone peptidique de 30 acides aminés possédant une fonction amide C-terminale, propre à de nombreux neuropeptides et hormones. Sa séquence primaire est la suivante :

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-NH₂

Le GLP-1 est produit au niveau intestinal par maturation enzymatique d'un précurseur comportant 158 acides-aminoés. Cette maturation, représentée à la figure 5, se fait en deux étapes, la première conduisant au GLP-1 (1-36) lui-même maturé en GLP-1 (7-36) qui est responsable de l'activité biologique.



Trends in Endocrinology and Metabolism

Figure 5. Etapes de la maturation du précurseur du GLP-1.

Le GLP-1 (7-36) est alors sécrété par les cellules épithéliales L de l'intestin au cours de la prise alimentaire, en réponse à l'absorption de glucose ou d'acides gras par les capillaires mésentériques qui conduisent à la veine hépatoportale puis au foie. Après son passage par les capillaires hépatiques, le GLP-1 est ensuite redistribué par le sang circulant dans les autres tissus de l'organisme.

Le GLP-1 est le plus fort agent stimulateur de la sécrétion d'insuline connu (insulinotropie). Son action insulinotrope sur les cellules β du pancréas a été largement décrite et représente un des effets majeurs de cette hormone. De manière remarquable, son action insulinotrope est strictement dépendante de l'augmentation du métabolisme du glucose par la cellule β , prévenant ainsi tout risque d'hypoglycémie qui pourrait survenir car la sécrétion d'insuline n'est stimulée par le GLP-1 qu'en état d'hyperglycémie. D'autres effets

anti-hyperglycémiant du GLP-1 ont été décrits. En effet, ce peptide diminue également la sécrétion du glucagon, ralentit la vidange gastrique, diminue la prise alimentaire en augmentant la satiété, favorise l'augmentation de la masse β des îlots de Langerhans et la différenciation cellulaire. Dans leur ensemble, ces effets préviennent à court terme l'absorption massive et répétée de glucose, ainsi que des épisodes hyperglycémiques marqués et nombreux et, à long terme, les effets délétères de l'hyperglycémie et de la perte de fonctionnalité du pancréas endocrine des diabétiques de type 2.

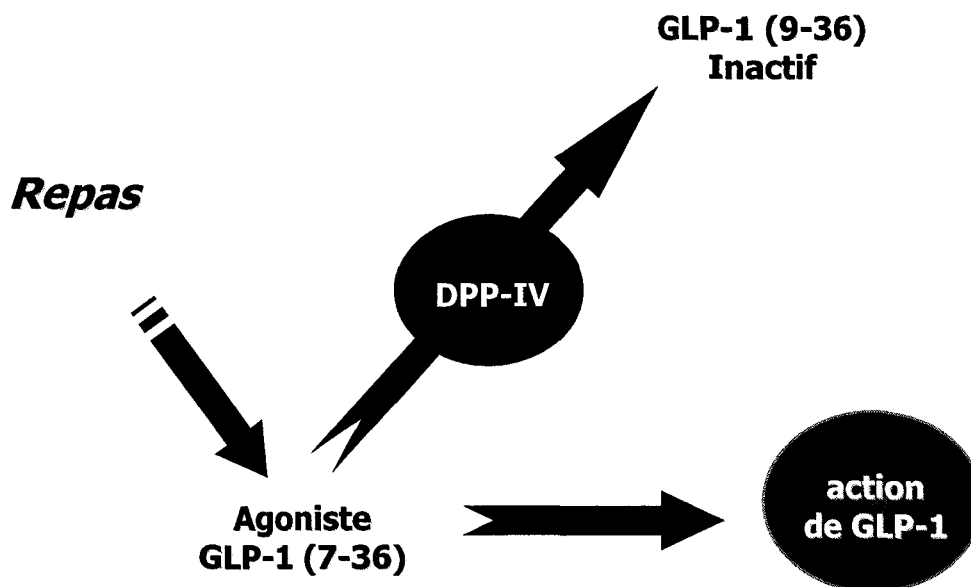


Figure 6. Les différentes voies affectées par la DPP-IV et par GLP-1.

Des essais cliniques réalisés chez des patients atteints d'un diabète de type 2, ont montré l'efficacité de l'administration de GLP-1 en injection intraveineuse ou sous-cutanée dans la régulation du niveau de glucose sanguin. Malheureusement, le GLP-1, rapidement dégradé dans la circulation sanguine a une demi-vie qui ne dépasse pas 5 min. Ceci limite l'application thérapeutique à des perfusions ou des injections de forme retard.

Pour contourner ce problème, des analogues peptidiques plus stables du GLP-1 ont été optimisés et ont démontré leur potentiel dans la régulation du glucose.

Cependant, même si le problème de la demi-vie peut être résolu de cette manière, il subsiste celui de la voie d'administration, parentérale, qui continue à constituer un inconvénient majeur au développement d'un médicament d'utilisation courante.

Une approche classique dans ce cas consiste non pas à utiliser une augmentation du GLP-1 par administration exogène, mais au contraire à diminuer la dégradation du GLP-1 endogène, stratégie d'autant plus efficace que sa demi-vie est très courte.

Pour ce faire, il convient d'une part d'identifier les voies enzymatiques de dégradation et d'en concevoir des inhibiteurs spécifiques de petite taille qui pourront ainsi être administrés par voie orale.

Les études de la dégradation du GLP-1 qui ont été réalisées ont conclu à un rôle prépondérant joué par une exopeptidase particulière : la Dipeptidyl Peptidase IV. Cette protéase clive en effet le GLP-1 au niveau de son extrémité *N*-terminale entre les résidus Ala et Glu libérant le dipeptide His-Ala et une forme tronquée du GLP-1 dépourvue d'activité biologique.

La contribution de la DPP-IV dans l'inactivation de ce peptide et ainsi dans la régulation du taux de glucose sanguin a été confirmée chez des souris n'exprimant pas cette enzyme¹.

Une autre approche thérapeutique consiste donc à diminuer la dégradation du GLP-1 endogène en utilisant des d'inhibiteurs sélectifs de la DPP-IV².

2.2. La Dipeptidyl Peptidase IV.

La Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV, EC 3.4.14.5) est une protéase à sérine possédant une homologie de séquence et une structure similaire à celles de la prolyl oligopeptidase ou de l'acétylcholinestérase. La DPP-IV est présente dans tout le corps, tant sous forme circulante dans le plasma que fixée sur la membrane cellulaire. Elle est produite par une variété de tissus et d'organes comme les reins, le foie et l'intestin.

La DPP-IV est une aminopeptidase clivant spécifiquement les peptides possédant une proline ou une alanine en pénultième position de la séquence *N*-terminale.

La DPP-IV intervient dans la dégradation de neuropeptides, d'hormones et de chemokines. Si l'on a pu souvent démontrer *in vitro* qu'un grand nombre de peptides sont substrats de cette enzyme, son rôle physiologique n'a pu être réellement prouvé que dans un nombre très limité de cas (l'hormone de croissance est l'un d'entre eux).

2.3. Structure de la Dipeptidyl Peptidase IV.

L'étude par radiocristallographie de la structure de DPP-IV n'a été publiée que très récemment, plus d'un an après que le travail décrit dans cette partie de la thèse eût été terminé.

¹ Marguet D. and al.; Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, *97*, pp 6864-6879.

² Holst J. J. and al.; Inhibition of the activity of Dipeptidyl Peptidase-IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes*, **1998**, *47*, pp 1663-1670.

Dans un premier paragraphe, nous décrivons les informations dont nous disposons à l'époque, puis dans un second, les informations supplémentaires apportées par la résolution de la structure.

2.3.1. Biochimie structurale de la DPP-IV.

Les études enzymologiques effectuées sur la DPP-IV ont permis d'en connaître certaines propriétés importantes :

- La DPP-IV est une glycoprotéine membranaire de type 2.
- Il en existe une forme circulante, enzymatiquement active qui est produite par clivage d'un domaine d'ancrage transmembranaire.
- Elle est composée de deux sous-unités identiques de 110 kDa.
- Chaque sous-unité comporte 766 acides aminés.
- La triade catalytique sérine, acide aspartique, histidine se situe dans le domaine de 260 acides aminés localisé en partie *C*-terminale.
- Un modèle en a été construit sur la base de son homologie avec les prolyl endopeptidases (PEP).

Sur la base de ces informations, il a été possible de proposer des hypothèses très précises sur le mécanisme catalytique et, à partir de celles-ci, d'en concevoir des inhibiteurs puissants et spécifiques.

Les protéases catalysent en effet le clivage de liaisons amides liant deux acides aminés par attaque nucléophile sur le groupement carbonyle scissile et elles sont classées en familles selon le mécanisme catalytique qu'elles mettent en jeu. Si toutes ont en commun la formation d'un intermédiaire tétraédrique résultant de l'attaque par une fonction nucléophile, elles diffèrent par la nature de cette fonction nucléophile.

Dans le cas des protéases à sérine, famille enzymatique à laquelle appartient la DPP-IV, le nucléophile est le groupe hydroxyle d'une sérine située dans le site catalytique. La « triade catalytique » Ser, His, Asp permet un transfert de charge qui va promouvoir la nucléophilie de la sérine par l'établissement de liaisons hydrogènes.

Le clivage de la liaison amide comporte plusieurs étapes qui sont représentées à la figure 7:

- La formation d'un complexe covalent enzyme-substrat (intermédiaire tétraédrique) par attaque nucléophile de la sérine, l'oxyanion ainsi généré est stabilisé par deux liaisons hydrogènes.
- L'acylation de la sérine, menant à une acyl enzyme et à la libération d'une amine primaire, emportant un proton fourni par l'histidine.

- L'hydrolyse de la liaison ester par une molécule d'eau, ce qui libère un groupement carboxylique.

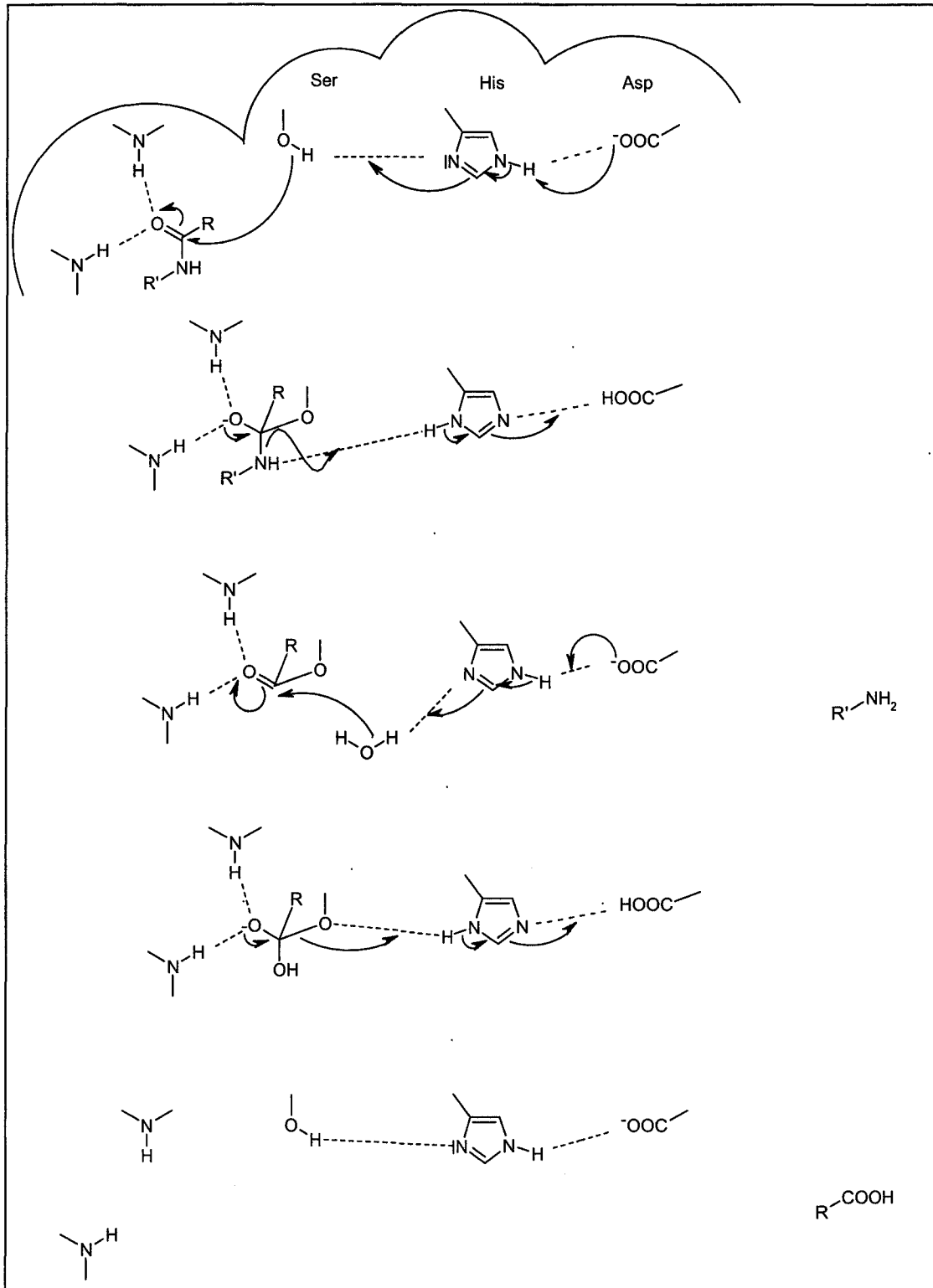


Figure 7. Mécanisme réactionnel impliquant la triade catalytique d'une protéase à sérine

2.3.2. Etude radiocristallographique de la DPP-IV.

La structure de la DPP-IV complexée avec un inhibiteur non covalent a été récemment publiée (code PDB : 1N1M).³ Bien que non disponible à l'époque où nous avons réalisé nos travaux, cette étude s'est avérée précieuse à plusieurs égards :

- elle a permis de confirmer définitivement les hypothèses concernant le mécanisme catalytique, montrant le positionnement des trois résidus dans le site,
- elle a permis de montrer comment se faisait la « détection » de l'extrémité *N*-terminale du substrat, indispensable à l'activité de dipeptidyl peptidase.
- Grâce à la cocrystallisation avec un inhibiteur compétitif analogue de substrat, Valine-Pyrrolidine (Val-Pyr), elle nous a éclairé sur son positionnement exact au sein du domaine catalytique.
- Enfin, et surtout, elle nous a fourni une explication à l'inactivité de certains de nos analogues. Cette partie sera développée dans la discussion.

Structure globale de DPP-IV dans le cristal.

L'étude radiocristallographique de DPP-IV a été réalisée à partir d'une enzyme recombinante correspondant à la forme soluble de l'enzyme humaine, commençant à partir du résidu Ser39. Cette structure correspond à la forme prédominante de DPP-IV, présente en circulation dans le plasma sanguin.

Le complexe enzyme DPP-IV-analogue de substrat (Val-Pyr, $K_i=2 \mu\text{M}$) a été cristallisé et la résolution obtenue a été de 2.5 Å.

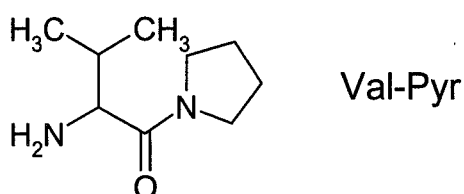


Figure 8. Structure d'un analogue de substrat de la DPP-IV: Val-Pyr.

DPP-IV, cocrystallisée avec Val-Pyr, forme un homodimère dans le cristal, ce qui est en accord avec les données biochimiques montrant que seule la forme dimère est la forme active de l'enzyme.⁴

³ Rasmussen H. B., Branner S., Wiberg F. C., Wagtmann N. R.; Crystal Structure of Human Dipeptidyl Peptidase IV/Cd26 in Complex with a Substrate Analogue; *Nat. Struct. Biol.*, **2003**, *10*, pp 19-25.

⁴ Gorrel M. D., Gysbers V., McCaughan G. W.; CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes; *Scand. J. Immunol.*, **2001**, *54*, pp 249-264.

Chaque sous-unité est constituée de deux domaines:

- Un domaine appelé α/β -hydrolase
- Un domaine appelé β -propeller.

Entre ces deux domaines, il existe une large cavité de 30 à 45 Å de profondeur et un bras étendu servant d'attache aux deux sous-unités.

□ **Domaine α/β -hydrolase.**

Le domaine α/β -hydrolase, domaine le plus proche de la membrane cellulaire, est constitué des acides aminés 39-51 et 506-766. Ce domaine contient les résidus Ser630, Asp708 et His740 qui constituent la triade catalytique. Ce domaine consiste en un feuillet β pris en sandwich par des hélices α .

□ **Domaine β -propeller.**

Ce domaine est constitué des résidus 55 à 497 et il est formé par 8 pales de feuillets β antiparallèles. On retrouve dans ce domaine les résidus Glu205 et Glu206 qui interviennent dans la reconnaissance de la partie terminale des peptides substrats.

La molécule Val-Pyr est localisée dans une petite poche, proche de la cavité, localisée entre les deux domaines α/β -hydrolase et β -propeller, à proximité de la triade catalytique.

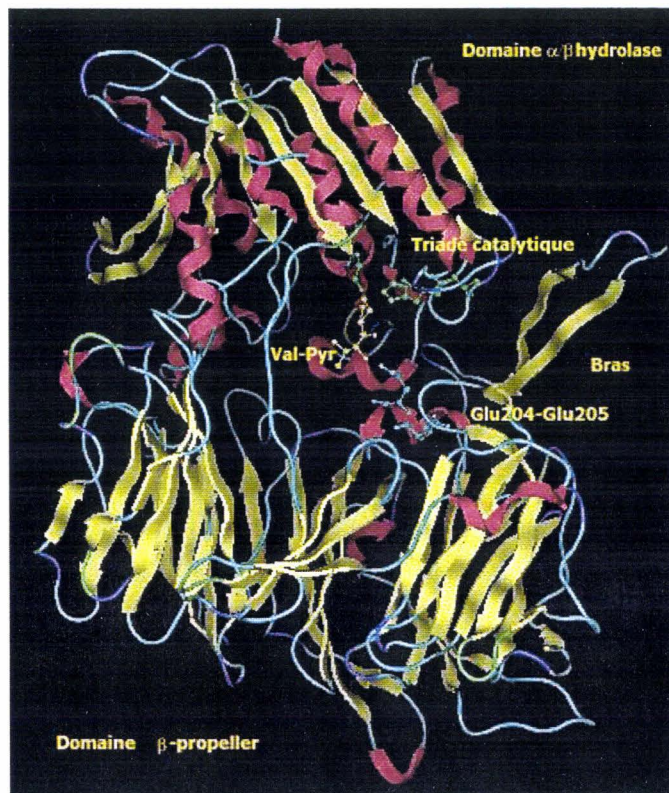


Figure 9. Structure de la sous-unité de la DPP-IV.

En figure 9, les informations mentionnées sont décrites en caractères jaunes. La molécule Val-Pyr est représentée dans le site catalytique en jaune, les résidus de la triade catalytique Ser630, Asp708 et His740 sont représentés en vert et les deux résidus Glu 204 et Glu205 sont représentés en bleu.

□ **Site catalytique:**

La structure du site actif révèle comment est assurée la spécificité de la DPP-IV vis-à-vis de ses substrats. Des résidus présents dans les deux domaines interviennent dans la liaison au substrat:

□ Deux résidus glutamyle Glu205 et Glu206 (domaine β -propeller), qui interagissent avec la fonction amine libre du fragment Valine de Val-Pyr. Ces deux résidus représentent le site de reconnaissance de la partie *N*-terminale du peptide substrat et jouent un rôle prépondérant dans l'alignement du substrat avant clivage. Ces résidus sont placés sur une hélice horizontale (résidus 201-207), située à proximité du site actif, limitant l'entrée de ce site actif à deux acides aminés uniquement, ce qui confirme que la DPP-IV est une dipeptidyl peptidase.

□ Le cycle pyrrolidine de Val-Pyr s'insère dans une poche hydrophobe proche de la sérine du site actif. Cette poche hydrophobe est formée par les résidus suivants:

- Tyr662 et Tyr666 qui prennent le cycle pyrrolidine en sandwich. Tyr662 est orienté parallèlement au cycle alors que Tyr666 est positionnée orthogonalement.
- Trp659 vient pour sa part bloquer de façon perpendiculaire le fond de cette poche hydrophobe.

Ces indications permettent de mieux comprendre la spécificité de la DPP-IV pour les résidus de petite taille tels que Pro ou Ala situés en position P1 du substrat.

□ La chaîne latérale de la Valine pointe pour sa part dans la large cavité et n'exerce pas de contacts spécifiques avec l'enzyme, ce qui peut expliquer pourquoi l'enzyme n'est pas spécifique vis-à-vis de l'acide aminé en position P2 de la chaîne *N*-terminale du substrat. Ceci explique également la faible affinité de Val-Pyr.

□ L'atome d'oxygène de la fonction amide de Val-Pyr forme des liaisons hydrogènes avec les résidus Asn710 et Arg125.

Cette analyse des résidus intervenant dans la liaison du substrat au site catalytique est schématisée et annotée à la figure 10.

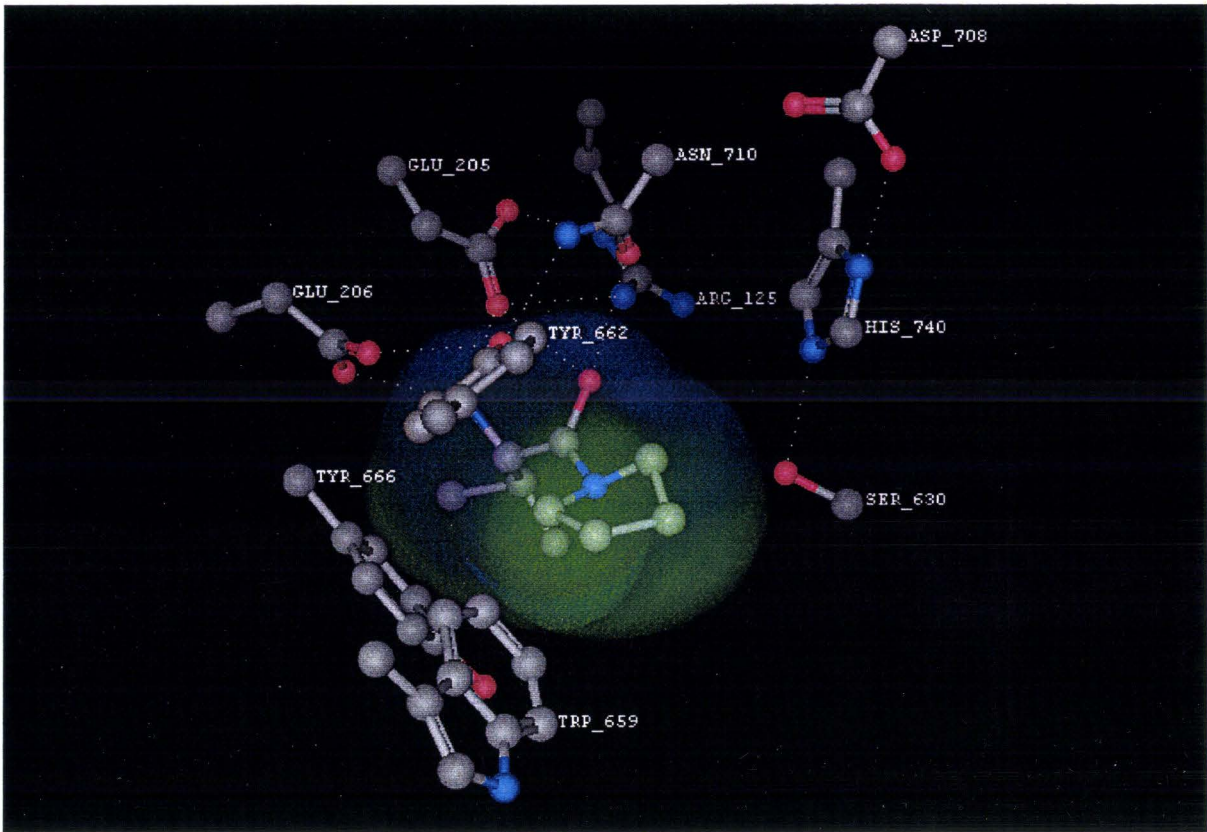


Figure 10. Site catalytique de DPP-IV.

□ Accès au site actif.

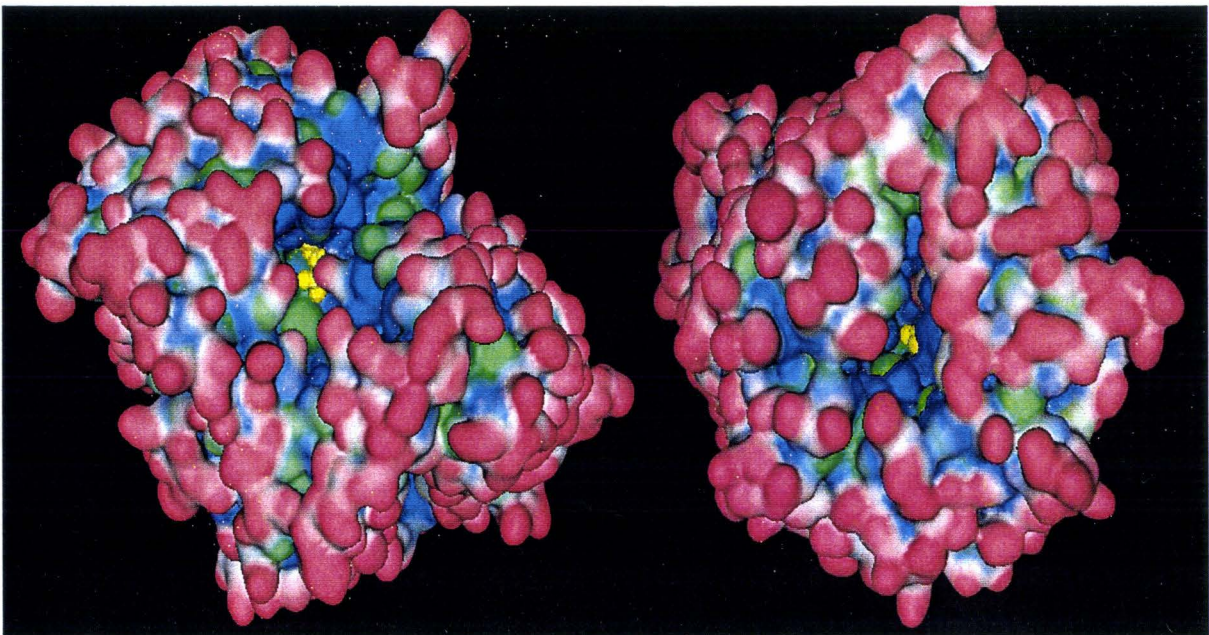


Figure 11. Ouvertures présentes à l'interface des domaines α/β -hydrolase et β -propeller (à gauche) et au centre du domaine β -propeller. Le substrat Val-Pyr est représenté en jaune.

Deux ouvertures permettent le passage du substrat. Une première ouverture, large, est située à l'interface des deux domaines α/β -hydrolase et β -propeller. Une seconde, qui est constituée par un tunnel d'une longueur de 28 Å et d'un diamètre de 24 Å à l'ouverture, est située au centre du domaine β -propeller. Ces deux ouvertures ne permettent que le passage de substrats de taille modérée ou de chaînes peptidiques allongées. Ce résultat explique la spécificité de la DPP-IV pour des fragments peptidiques de petite taille et linéaires. Ces deux ouvertures sont représentées à la figure 11.

2.4. Les inhibiteurs de la DPP-IV.

A part quelques exceptions tels que des composés non peptidiques comportant un noyau *N*-phénylphthalimide ou *N*-phénylhomophthalimide (figure 12), la conception des inhibiteurs de la DPP-IV s'est faite sur une base rationnelle prenant en compte à la fois la connaissance du mécanisme d'action et celle de la structure des substrats endogènes de l'enzyme.

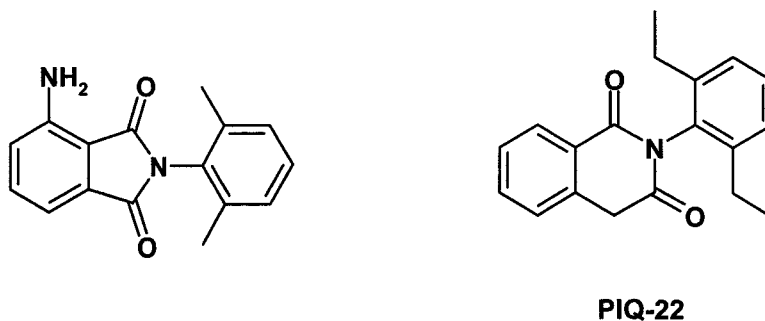


Figure 12. Structures de type phthalimide ou homophthalimide.

2.4.1. Mimes de substrat inhibiteurs compétitifs.

Les premiers inhibiteurs de la DPP-IV ont été construits à partir du squelette dipeptidique P2-P1 : Xaa-Pro. Ce dipeptide correspond à la structure générique de la partie *N*-terminale du substrat qui est libéré lors de l'action de l'enzyme. Considérant qu'il présentait des éléments de reconnaissance spécifique par l'enzyme, il a servi de base à la conception d'inhibiteurs purement compétitifs comportant une amine primaire ou secondaire protonable, correspondant au site de reconnaissance de la partie *N*-terminale du peptide substrat, associée à des systèmes cycliques saturés mimant la chaîne latérale de la proline. Les inhibiteurs les plus simples dans cette famille sont les aminoacylpyrrolidine et aminoacylthiazolidine (X=O, S, figure 13). Il s'agit d'inhibiteurs compétitifs et réversibles de l'enzyme possédant des IC₅₀ comprises entre 2 et 6 μ M, ce qui ne permet pas d'en envisager une utilisation comme médicaments.

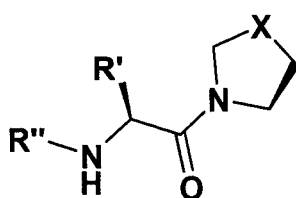


Figure 13. Structure des inhibiteurs de la famille des aminoacylpyrrolidine et aminoacylthiazolidine.

Parmi les tentatives qui ont été faites pour améliorer leur activité, le remplacement du cycle à 5 sommets par un cycle plus grands (6 ou 7 chaînons) s'est montré décevant, se traduisant par une perte d'activité⁵.

2.4.2. Inhibiteurs covalents.

Devant l'échec des tentatives pour améliorer l'activité des composés décrits précédemment, il a été décidé d'incorporer un groupement électrophile (E) en position P2 sur la proline, dans la position qu'occupe la liaison amide dans un substrat. Le but est de permettre la formation d'une liaison covalente entre ce groupement et le résidu sérine du site actif de l'enzyme, produisant ainsi des inhibiteurs irréversibles.

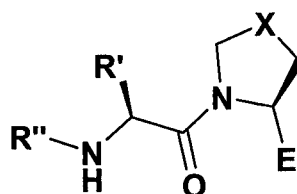


Figure 14. Structure des inhibiteurs irréversibles.

Parmi les composés les plus actifs ainsi obtenus, on citera les cas des phosphonates où $E = P(O)(OPh)_2$ et des carbamates où $E = CO-NH-O-COR'$ qui forment des liaisons covalentes permanentes donnant lieu à une inhibition de type suicide. On citera également celui des acides boroniques ($E = B(OH)_2$) ou des nitriles ($E = CN$, figure 14) qui forment des composés covalents instables et donnent lieu à des inhibitions lentement réversibles.

La synthèse d'analogues dans ces différentes séries a permis d'établir des relations structure-activité précises :

- la stéréochimie du résidu intermédiaire P1 qui mime la proline du substrat est très importante. Seuls les résidus de configuration L sont reconnus par la DPP-IV. Une perte totale de l'inhibition est ainsi observée lorsque l'on remplace la L-proline par son isomère de la série D.

⁵ Augustyns K. J. L., Lambeir A. M., Borloo M., De Meester I., Vedernikova I., Vanhoof G., Hendriks D., Scharpé S., Haemers A.; Pyrrolidines : synthesis and structure-activity relationship as inhibitors of dipeptidyl peptidase IV; *Eur. J. Med. Chem.*, **1997**, 32, pp 301-309.

- la liaison amide reliant les résidus P1 et P2 est également un élément essentiel pour l'inhibition, puisque la molécule comportant une liaison réduite perd toute activité.
- il est essentiel de garder une amine primaire ou secondaire protonable au niveau du sous-type P2.

C'est sur la base de ces observations qu'ont été conçus les inhibiteurs les plus avancés en développement clinique.

2.4.3. Candidats médicaments.

Parmi les différents inhibiteurs, trois stratégies ont connu de réels développements pharmaceutiques. L'une d'elles ayant été arrêtée (l'inhibiteur non covalent de la société Probiodrug), nous nous limiterons aux deux stratégies encore en cours de développement qui toutes deux concernent des dérivés de cyanoproline (figure 15). Ces composés se sont en effet révélés plus stables en solution aqueuse à pH neutre que les dérivés boroniques qui présentent une demi-vie courte due à une cyclisation rapide entre la fonction aminée de l'acide aminé en position P2 et l'acide boronique.

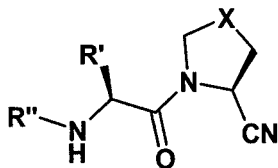


Figure 15. Structure des inhibiteurs de la série des cyanoprolines.

2.4.3.1. Stratégie « Ferring Research ».

Parmi les différents inhibiteurs synthétisés, la stratégie publiée par Ferring a consisté à maintenir systématiquement une fonction amine primaire en position *N*-terminale. La chaîne latérale du résidu P2 a fait l'objet d'une pharmacomodulation très complète qui a abouti à retenir des résidus hydrophobes de petite taille. Les dérivés aminoacylpyrrolidine-2-nitrile (figure 16) ainsi obtenus se sont montrés des inhibiteurs lentement réversibles très puissants de DPP-IV avec des activités de l'ordre du nanomolaire, parfaitement compatibles avec une utilisation comme médicaments. Parmi les modulations des composés les plus intéressants, on retiendra le dérivé de la proline possédant une isoleucine en position P2 : $R' = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$ et $R'' = \text{H}$ avec un K_i de 2.2 nM et une demi-vie à un pH de 7.4 de 48 heures⁶. On notera également les dérivés de la cyclohexylalanine avec un K_i de 1.1 nM pour

⁶ Ashworth D. M., Atrash B., Baker G. R., Baxter A. J., Jenkins P. D., Jones D. M. and Szelke M.; 4-Cyanothiazolidides as very potent, stable inhibitors of dipeptidyl peptidase IV; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, pp 2745-2748.

l'analogue proline alors que le remplacement de celle-ci par une thiazolidine (X=S) conduit à un dérivé encore plus affiné avec un K_i de 0.41 nM.^{7, 8}

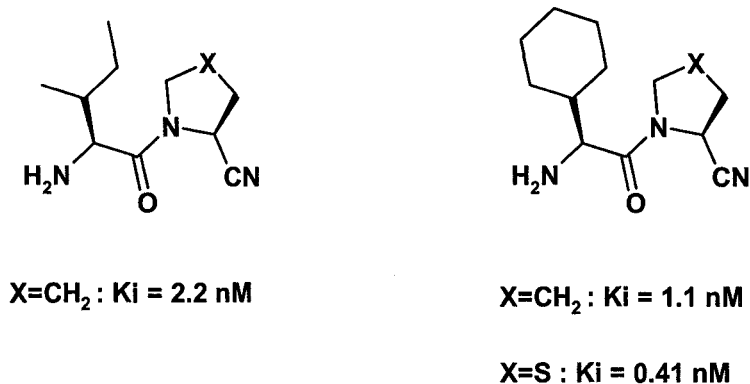


Figure 16. Inhibiteurs de DPP-IV en stratégie Ferring.

2.4.3.2. Stratégie « Novartis ».

Partant du constat que la *N*-méthylglycine en position P2 était reconnue par l'enzyme, les chercheurs de Novartis ont fait l'hypothèse qu'une amine primaire n'était pas indispensable en position *N*-terminale. Villhauer et al. ont ainsi étudié les effets de l'introduction de substituants au niveau de la fonction amine de la structure *N*-Gly-Pro-CN sur l'activité enzymatique de la DPP-IV. De ce travail sont apparus des composés actifs de structure originale possédant des valeurs d' IC_{50} comprises entre 4 et 7 nM.

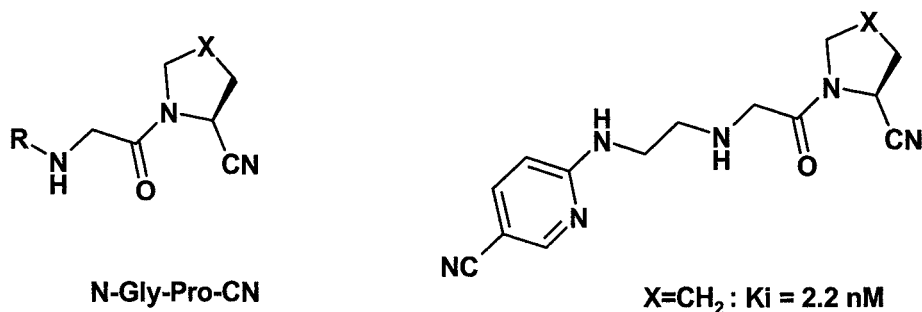


Figure 17. Inhibiteurs de DPP-IV en stratégie Novartis.

Parmi ceux-ci, le composé NVP-DPP-728 (figure 17) inhibe à la fois l'enzyme humaine, l'enzyme de rat et l'enzyme de surface des cellules épithéliales humaines avec des IC_{50} respectives de 7, 6 et 22 nM. Ce composé est également sélectif de DPP-IV par rapport à DPP-II. Il fait actuellement l'objet d'essais cliniques en phase II et représente à l'heure actuelle un composé de référence dans le domaine de l'inhibition de la DPP-IV.

⁷ Ashworth D. M., Atrash B., Baker G. R., Baxter A. J., Jenkins P. D., Jones D. M. and Szelke M.; 2-cyanopyrrolidides as potent, stable inhibitors of dipeptidyl peptidase IV, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **1996**, *6*, pp 1163-1166.

⁸ Ashworth D. M., Atrash B., Baker G. R., Baxter A. J., Jenkins P. D., Jones D. M. and Szelke M.; 4-Cyanothiazolidides as very potent, stable inhibitors of dipeptidyl peptidase IV; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, pp 2745-2748.

3. PHARMACOMODULATION EN SERIE « AMINE SECONDAIRE ».

Dans un premier temps, nous avons cherché à explorer certaines pistes qui n'avaient pas été abordées par le groupe de Novartis dans le cadre des substitutions possibles au niveau de l'extrémité *N*-terminale, position qui avait été très peu étudiée par les chercheurs de Ferring.

3.1. Synthèse en phase homogène de NVP-DPP-728.

La première étape de mon projet a été de synthétiser ce composé afin de l'utiliser en tant que référence pour le comparer aux nouvelles molécules. L'enjeu était important puisque le schéma de cette synthèse (publiée en 1998 sous forme d'un brevet)⁹ ne permettait d'obtenir ce produit qu'avec de faibles rendements dus essentiellement à la formation de sous-produits indésirables. Le but de ce travail a donc été de trouver dans un premier temps une protection adéquate à la fois en phase homogène mais aussi en phase solide des fonctions aminées réactives afin de proposer deux voies de synthèses :

- l'une étant réservée à la production à l'échelle du gramme de ce composé
- l'autre, plus rapide, permettant d'obtenir des quantités de l'ordre du milligramme de NVP-DPP-728 et d'analogues structuraux.

3.1.1. Synthèse de NVP-DPP-728 décrite par Novartis.

La synthèse décrite en 1998 est présentée en figure 18 :

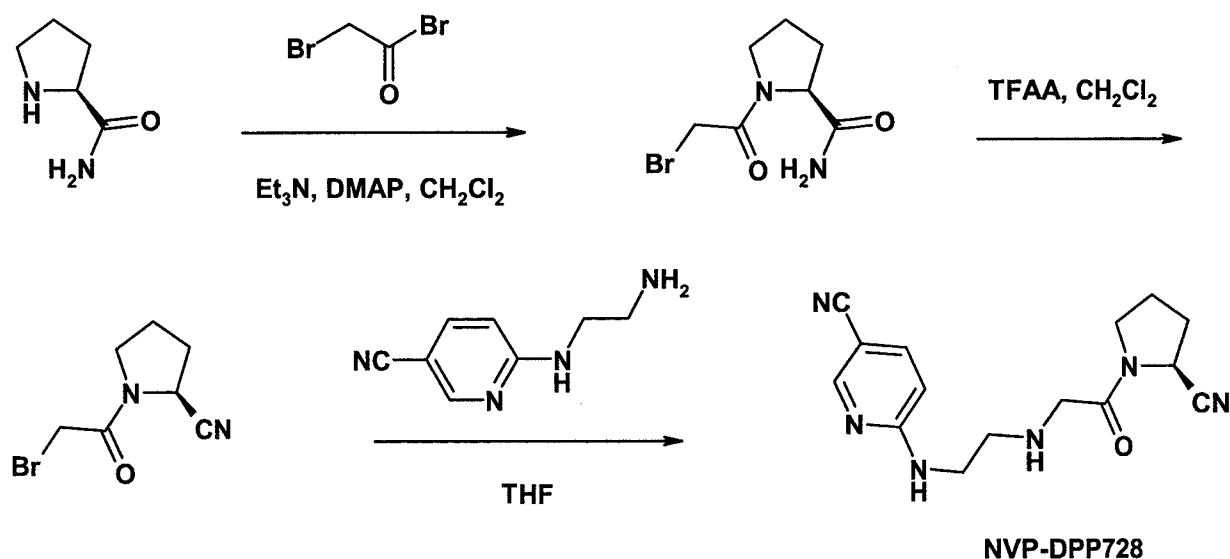


Figure 18: Synthèse en solution de NVP-DPP-728 décrite dans le brevet WO 98/1998⁹.

⁹ Villhauer E. B.; International Patent Application Number PCT/EP97/061255, published as WO98/19998 1998.

La préparation de NVP-DPP-728 a été réalisée en partant du L-Pro-NH₂, qui après couplage avec le bromure de bromoacétyle, donne l'intermédiaire 1-bromoacétyl-2-(S)-pyrrolidinecarboxamide. Ce composé est alors déshydraté en présence d'anhydride trifluoroacétique pour conduire au dérivé cyano, qui est ensuite couplé selon une réaction de substitution nucléophile avec la 2-[(5-cyanopyridin-2-yl)amino]-éthylamine pour conduire au NVP-DPP-728 sous forme base.

En reproduisant ce mode opératoire, il ne nous a pas été possible d'obtenir des quantités satisfaisantes du produit final, la dernière étape de substitution étant particulièrement délicate. Ceci peut s'expliquer par la présence, à la fois dans le composé de départ éthylènediamine et dans le produit de la réaction, de fonctions amines primaires et secondaires de réactivité proche, favorisant la formation de produits secondaires indésirables.

Nous avons donc entrepris la mise au point de méthodes de protections applicables à cette synthèse afin d'obtenir uniquement le composé souhaité.

3.1.2. Nouvelle voie de synthèse de NVP-DPP-728.

3.1.2.1. Choix d'une stratégie de protection.

Afin de trouver une protection adéquate du bras espaceur éthylènediamine il fallait prendre en compte plusieurs paramètres :

- Le système de protection retenu devait à la fois protéger :
 - la fonction amine secondaire branchée sur le noyau pyridinique.
 - La fonction amine primaire afin d'éviter une double alkylation.
- La déprotection devait pouvoir s'opérer en milieu acide afin d'éviter toute cyclisation du composé final en dicétopipérazine par attaque nucléophile de l'azote de la glycine sur le carbone électrophile de la fonction nitrile.
- Les étapes de protection et de déprotection doivent être limitées afin d'optimiser le rendement.

Sur la base de toutes ces données, nous nous sommes intéressés à une stratégie employée précédemment pour la protection de la spermidine. Comme on le voit schématisée en figure 19^{10,11}, la chaîne diamine de la spermidine est condensée avec le formaldéhyde formant ainsi un cycle imidazolidine à cinq chaînons. En fin de synthèse, la déprotection est réalisée en présence d'acide malonique et de pyridine en milieu méthanolique.

¹⁰ Almeida M. L. S., Grehn L., Ragnarsson U.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1988**, pp 1905-1911.

¹¹ Dutasta J. P., Gellon G., Leuchter C. and Pierre J. L.; A New Strategy for the Synthesis of Polyazamacrocyclic Compounds : Use of a Removable Protecting and Rigid Group; *J. Org. Chem.*, **1987**, *53*, pp 1817-1819.

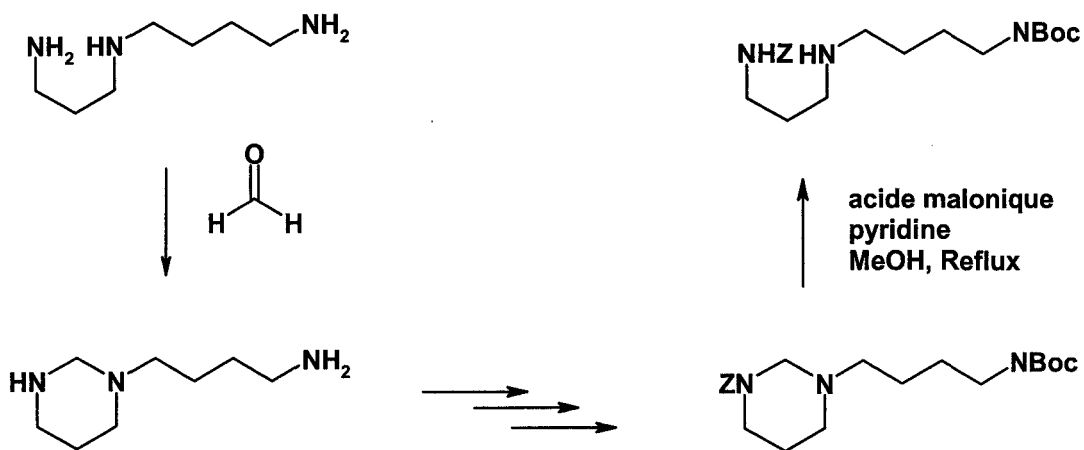


Figure 19. Protection d'une chaîne spermidine par réaction avec le formaldéhyde.

L'adaptation de cette stratégie à la préparation de NVP-DPP-728 est présentée à la figure 20.

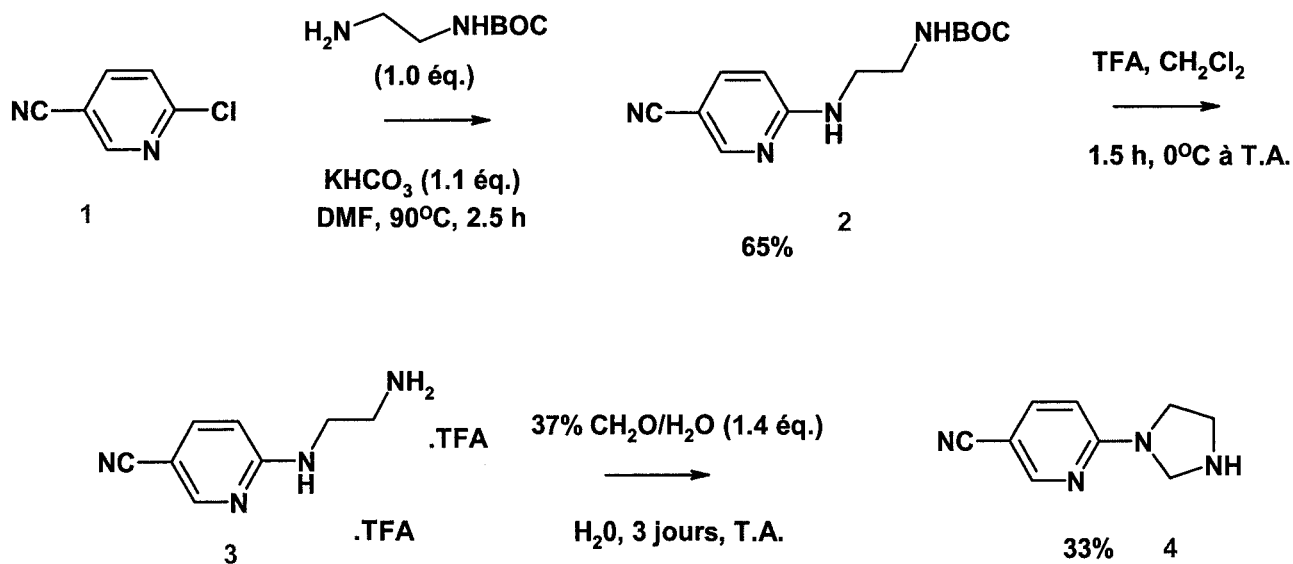


Figure 20. Stratégie de protection au moyen du formaldéhyde.

La préparation du composé **3** a été réalisée suivant le schéma classique qui consiste à réaliser une substitution nucléophile aromatique en milieu basique, à chaud, en présence de Boc-éthylènediamine et du 6-chloronicotinonitrile **1** pour donner l'intermédiaire **2** qui est ensuite déprotégé et protoné en milieu acide.

A l'étape suivante, la condensation du formaldéhyde avec ce sel, en milieu aqueux, permet d'obtenir l'intermédiaire **4** sous la forme d'une imidazolidine arylé sur un des deux azotes par la cyanopyridine. Ce produit a pu être isolé par cristallisation.

La structure de cet intermédiaire ne présente cette fois qu'une seule fonction aminée secondaire susceptible de réagir dans l'étape de substitution nucléophile.

La suite de la synthèse, présentée en figure 21, consiste en la condensation de l'imidazolidine et de la 1-bromoacétyl-2-(*S*)-cyano-pyrrolidine **8**. Celui-ci est obtenu à partir de la Boc-Pro-OH, qui est transformé en carboxamide primaire selon la procédure décrite par Pozdnev.¹² Ce carboxamide est déprotégé en milieu acide et couplé au bromure de bromoacétyle pour donner l'intermédiaire **7**. Cet intermédiaire est alors déshydraté en présence d'anhydride trifluoroacétique pour donner le composé désiré **8**. La dernière étape met en jeu la réaction du composé **8** avec le composé **4**, conduisant quantitativement au dérivé **9**. Aucun sous-produit n'est alors observé lors de cette réaction de substitution.

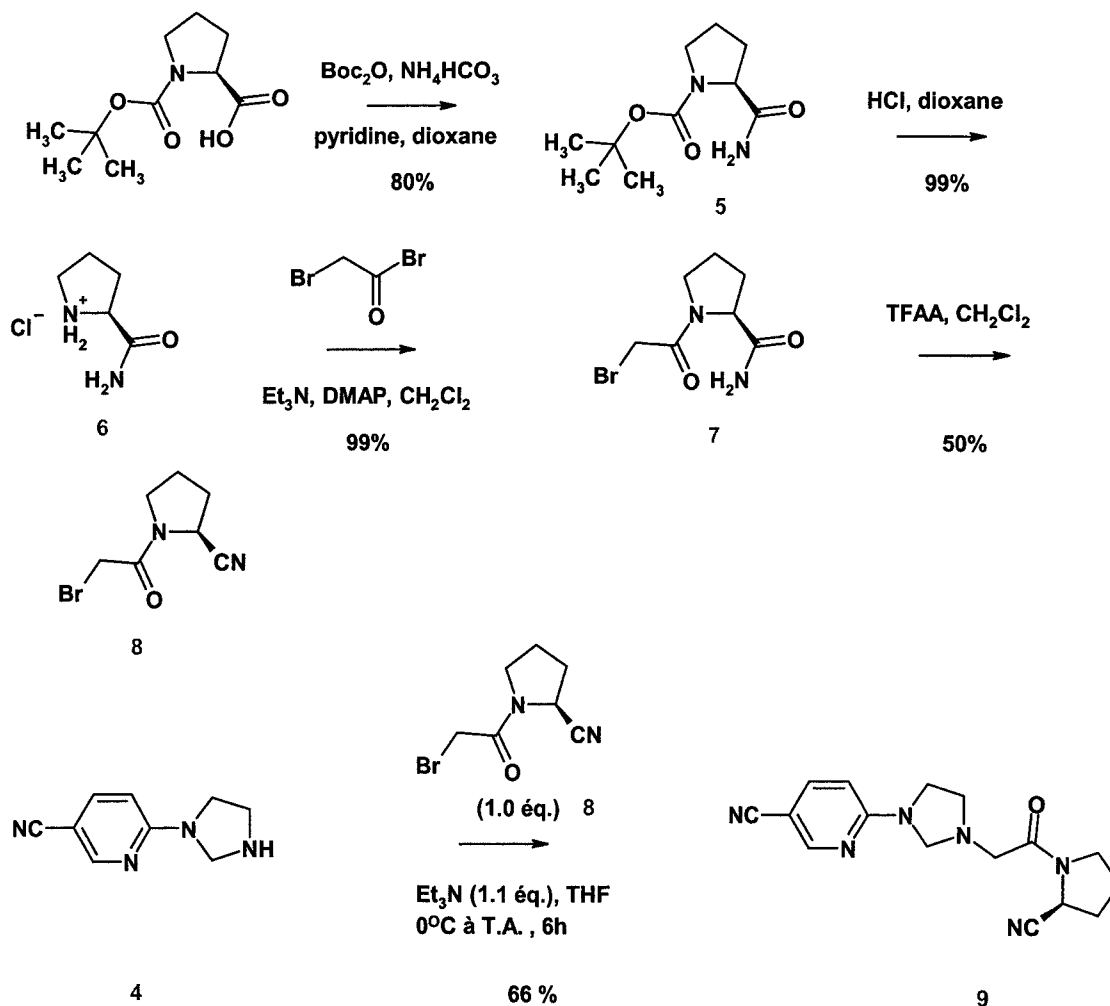


Figure 21. Condensation en série imidazolidine.

En résumé, cette stratégie nous a permis d'obtenir l'intermédiaire **9** avec un rendement de 26% en évitant la formation de produits secondaires, de structure proche, donc difficiles à éliminer.

¹² Pozdnev V. F.; Activation of carboxylic acids by pyrocarbonates. Application of Di-tert-Butyl pyrocarbonate as condensing reagent in the synthesis of amides of protected amino acids and peptides; *Tet. Lett.*, **1995**, 36, pp 7115-7118.

3.1.2.2. Choix d'une stratégie de déprotection.

A ce stade de la synthèse, il ne restait plus qu'à réaliser la déprotection, ce qui paraît souvent être une étape triviale. Le procédé utilisé par Almeida et al. qui consistait à libérer la diamine en présence d'acide malonique et de pyridine (figure 19), présente l'inconvénient de générer le NVP-DPP-728 sous forme de base et donc susceptible de se cycliser dans le milieu.

Deux conditions de déprotection furent alors étudiées (figure 22):

- Le premier choix a été de travailler en milieu acide en présence de TFA (10% en solution aqueuse) dilué.

Pour cela, le dérivé **9** (0.04 M) est traité au moyen d'une solution à 10% de TFA dans l'eau. Un retraitement basique du milieu après 24 h d'agitation, suivi d'une purification sur gel de silice, conduit au composé attendu avec un rendement de 50%. Par contre, la réaction n'est pas complète, le produit de départ étant récupéré à 47%.

Différentes tentatives ne nous ont pas permis d'améliorer cette réaction.

- Une seconde approche fut donc d'utiliser une résine afin de piéger le formaldéhyde au cours de sa production, afin de déplacer l'équilibre en faveur du produit déprotégé.

Plusieurs types de polymères comportant une fonction nucléophile greffée ont été mis au point afin de piéger les fonctions électrophiles en solution. Trois exemples de résines nucléophiles et leurs applications sont présentés à la figure 23.

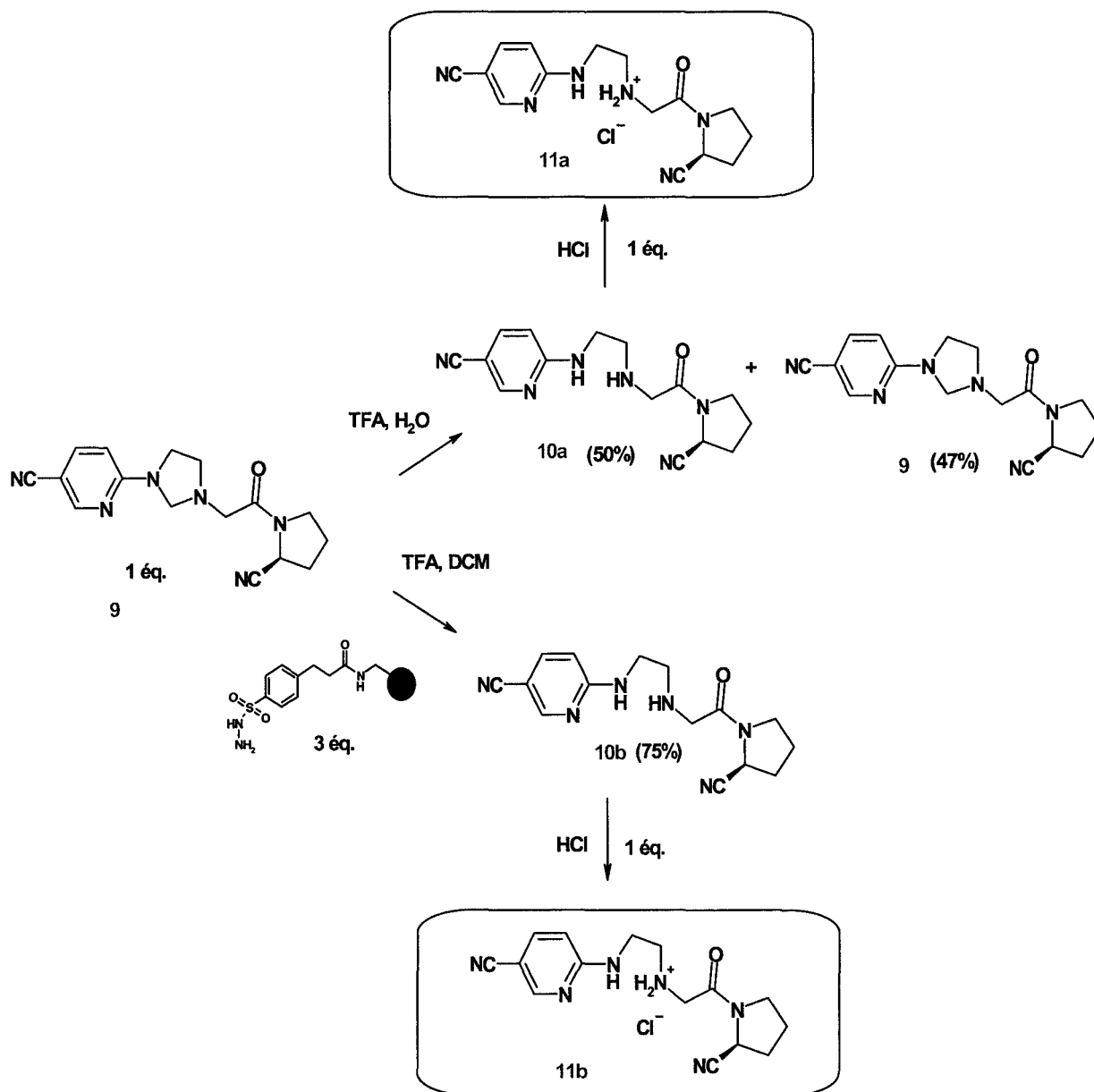


Figure 22. Présentation des deux voies de déprotection du composé 9 utilisées.

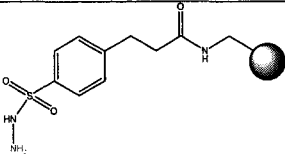
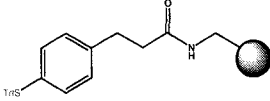
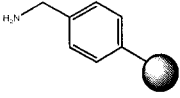
Résine	Electrophile piégé	Type de polymère	Conditions
 <p>3-(4-(hydrazinosulfonyl)phényl)propionyl AM résine</p>	<input type="checkbox"/> Aldéhyde <input type="checkbox"/> Cétone	Copolymère (styrène-2% divinylbenzène)	3 éq./électrophile 1-4 h à T.A.
 <p>3-(4-(tritylmercapto)phényl)propionyl AM résine</p>	<input type="checkbox"/> Halogénures d'alkyle <input type="checkbox"/> Cétones Bromométhylées <input type="checkbox"/> Mésylates <input type="checkbox"/> Tosylates <input type="checkbox"/> Composés carbonylés α,β insaturés	Copolymère (styrène-1% divinylbenzène)	1- TFA/DCM 5 min., neutralisation 2- 2 éq./électrophile, éthanol (3 mL/g résine) 18 h à T.A.
 <p>aminométhylated polystyrene EHL</p>	<input type="checkbox"/> Chlorure d'acyle <input type="checkbox"/> Chlorure de sulfonyle <input type="checkbox"/> Isocyanate, Acylisothiocyanate <input type="checkbox"/> Acide	Copolymère (styrène-2% divinylbenzène)	1.5 éq.-6 éq./électrophile 1-4 h à 20°C

Figure 23. Présentation des résines permettant de piéger des espèces électrophiles¹³.

La résine communément employée pour piéger les aldéhydes en solution est la résine 3-(4-(hydrazinosulfonyl)phényl)propionyl AM. En présence d'une solution contenant un dérivé carbonyle de type aldéhyde ou cétone, l'hydrazine forme une hydrazone (favorisée par la présence d'acide en solution). Ceci permet de fixer les électrophiles sur la résine, tout en les rendant inertes vis-à-vis d'autres nucléophiles. Enfin, l'utilisation de ce type de résine de piégeage permet également de travailler en excès sans avoir à se soucier d'une éventuelle purification.

La procédure appliquée, lors de l'étape de déprotection, a été conduite en utilisant un excès de résine 3-(4-(hydrazinosulfonyl)phényl)propionyl AM (3 équivalents pour 1 équivalent de formaldéhyde) en suspension dans une solution de TFA dans le DCM (10%) et de NVP-DPP-728 protégé.

Après une heure d'agitation à température ambiante, la conversion était totale. Après filtration, lavage de la résine, évaporation et purification du composé sur gel de silice par chromatographie, le rendement final est de 75%.

Après traitement du composé obtenu avec un équivalent d'acide chlorhydrique en solution dans le dioxane et recristallisation, le monochlorhydrate du NVP-DPP-728 est obtenu. Les analyses RMN (^1H , ^{13}C) et le point de fusion se sont avérés correspondre

¹³ Novabiochem.

exactement aux caractéristiques publiées dans le brevet déposé par Novartis. L'activité de ce composé sur l'enzyme humaine a également été vérifiée et confirme l'activité publiée.

3.2. Synthèse sur support solide de NVP-DPP-728 et de certains analogues.

3.2.1. Stratégie de synthèse.

Dans une approche complémentaire de la précédente, nous avons mis au point une synthèse sur support solide du NVP-DPP-728.

La stratégie illustrée par le diagramme rétrosynthétique de la figure 24 a été de construire sur une résine de type rink amide le squelette de NVP-DPP-728, à partir du premier fragment proline ancré par sa fonction acide. En fin de synthèse, le dérivé comportant un carboxamide primaire à la place du nitrile est clivé du support par coupure acidolytique. L'étape finale, réalisée en solution consiste à déshydrater cette fonction carboxamide afin d'obtenir le composé nitrile désiré.

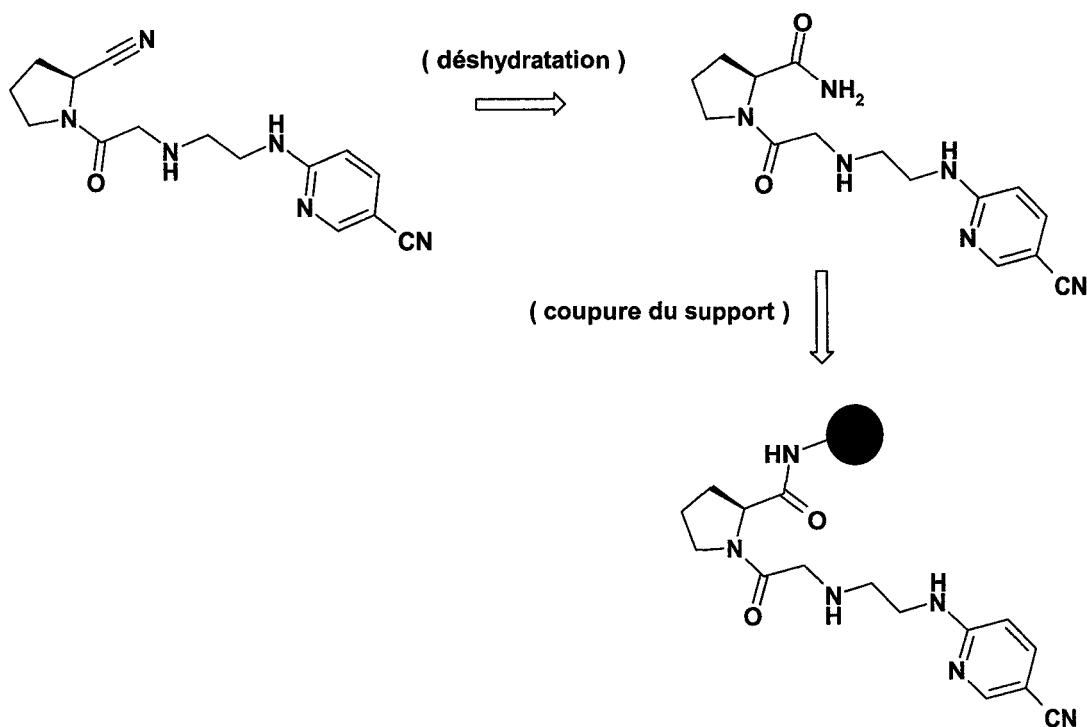


Figure 24. Schéma rétrosynthétique de la synthèse de NVP-DPP-728 sur support solide.

3.2.2. Choix du bras de fonctionnalisation du polymère.

Dans le schéma réactionnel envisagé, la construction de NVP-DPP-728 et le clivage du support solide doivent libérer le dérivé carboxamide primaire. Cela implique l'utilisation d'une liaison acido-labile entre molécule et polymère.

Un autre élément pris en compte, est l'encombrement stérique. Un bras de liaison possédant un encombrement stérique conséquent autour de la liaison molécule-polymère, permettra de minimiser la formation de dicétopipérazines, lors des différentes étapes de greffage et lors du clivage.

Nous avons donc jugé que le bras de fonctionnalisation rink (figure 25) était le mieux adapté à nos besoins. Un autre avantage est la commercialisation de résines fonctionnalisées avec ce bras.

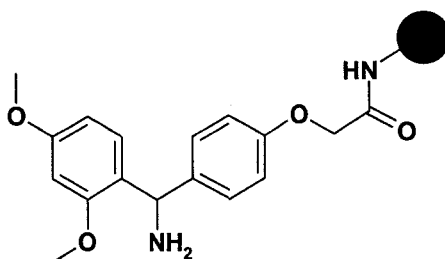


Figure 25. Résine fonctionnalisée avec le bras rink.

De manière usuelle, la molécule à ancrer possédant une fonction acide carboxylique est attachée au polymère au moyen d'une liaison amide, facile à créer en utilisant un excès d'acide activé. Le clivage de la molécule du polymère est par ailleurs relativement facile, se faisant en présence de faibles concentrations d'acide trifluoroacétique (TFA) dans le dichlorométhane, pendant quelques heures à température ambiante. Ce clivage libère une fonction carboxamide primaire.

3.2.3. Choix du support solide.

Les polymères les plus utilisés pour la synthèse en phase solide sont les copolymères de styrène et de divinylbenzène, développés au départ par Merrifield pour la synthèse des peptides. Ces polymères présentent une très bonne stabilité chimique et mécanique, ce qui est extrêmement important pour les synthèses multi-étapes. Leur principal inconvénient est de ne gonfler correctement que dans les solvants aprotiques comme le dichlorométhane, le chloroforme ou le DMF, ce qui ne constituait pas une difficulté dans notre cas. C'est pourquoi nous avons choisi ce type de polymère.

3.2.4. Choix de la stratégie de synthèse.

Le schéma rétrosynthétique présentant la stratégie de synthèse est illustré en figure 26. Ce schéma comporte quatre étapes : trois d'entre elles, des acylations, ont déjà été décrites sur support solide et ont fait l'objet de publications, notamment pour la préparation de peptoides.¹⁴

¹⁴ Zuckermann R. N., Kerr J. M., Kent S. B. R., Moos W. H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, pp 10646-10647.

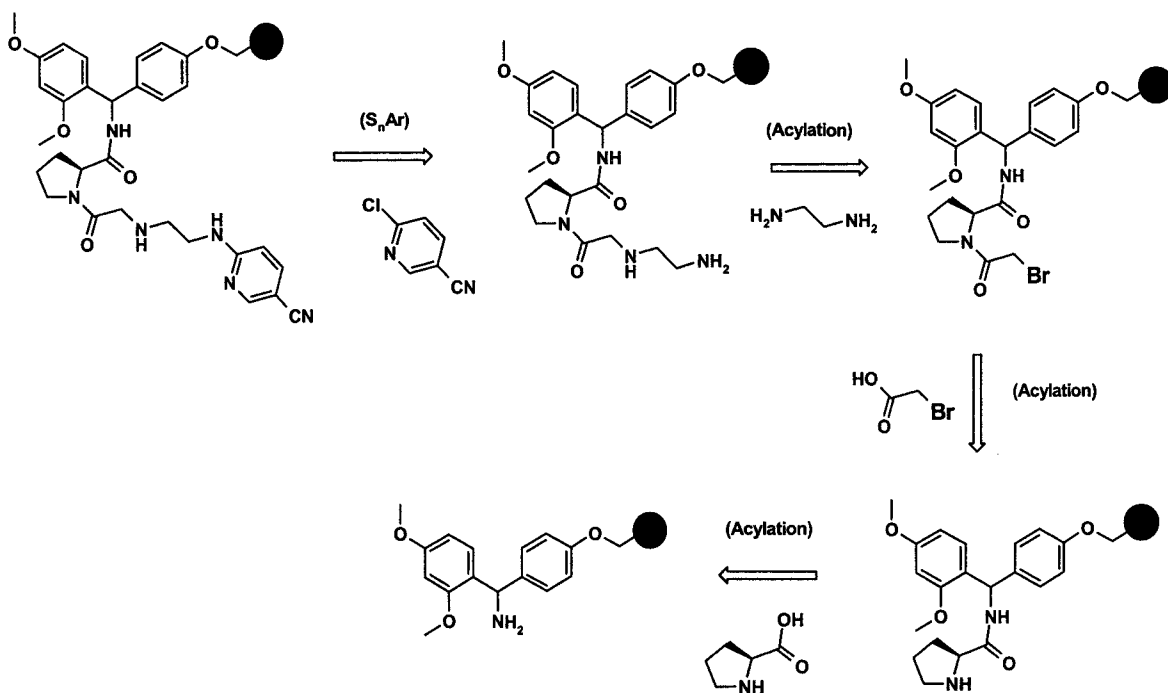


Figure 26. Schéma rétrosynthétique des réactions sur le polymère.

La dernière étape est une réaction de substitution nucléophile aromatique sur le 6-chloronicotinonitrile. Dans ce cas, quoique des réactions S_NAr sur support solide aient déjà fait l'objet de publications, un travail d'optimisation était nécessaire. Un exemple d'une telle réaction est la substitution d'un fluor par une pipéridine sur des dérivés de l'acide 4-fluoro-3-nitro-benzoïque et de l'acide 2-fluoro-5-nitro-benzoïque liés à un support solide (figure 27).¹⁵

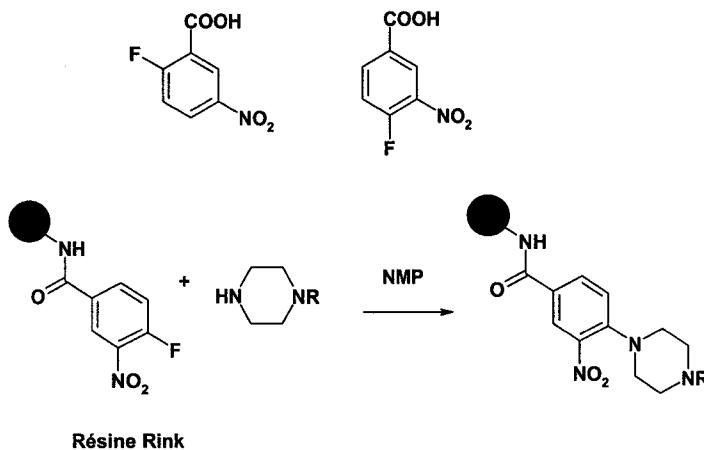


Figure 27. Exemple de S_NAr sur support solide.

Une revue de la littérature nous a montré que ces réactions requièrent en général soit des solvants polaires à haut point d'ébullition comme la NMP et le DMSO, et des

¹⁵ Dankwardt S. M., Newmann S. R., Krstenansky J. L.; Solid Phase Synthesis of Aryl and Benzylpiperazines and their Application in Combinatorial Chemistry; *Tet. Lett.*, **1995**, 36, pp 4923-4926.

températures de réaction proches de 110 °C, soit des catalyseurs palladiés, toujours à haute température.¹⁶

3.2.5. Mise au point de la synthèse.

L'assemblage du précurseur amide sur la résine a été réalisé selon le schéma de la figure 28.

3.2.5.1. Réactions d'acylation sur support solide.

La Fmoc-L-Pro-OH a été couplée à la résine rink amide, préalablement déprotégée, au moyen de TBTU, d' HOBt et de DIEA dans le DMF pour donner l'intermédiaire **13**. Après déprotection du groupement Fmoc, par lavages avec une solution de pipéridine dans le DMF (20%), la fixation du bras glycine a été accomplie par addition d'acide bromoacétique, activé par une carbodiimide pour donner l'intermédiaire **15**. La substitution du brome a été réalisée en utilisant un excès d'éthylènediamine dans le DMSO, pour donner la résine **16**. Ces trois étapes ont été contrôlées au moyen de tests colorimétriques appropriés (Kaiser, Christensen, Isatin). Après chaque étape de la synthèse, des aliquotes ont été clivées par coupure au TFA dans le dichlorométhane, les solutions obtenues ont été analysées par LC-MS.

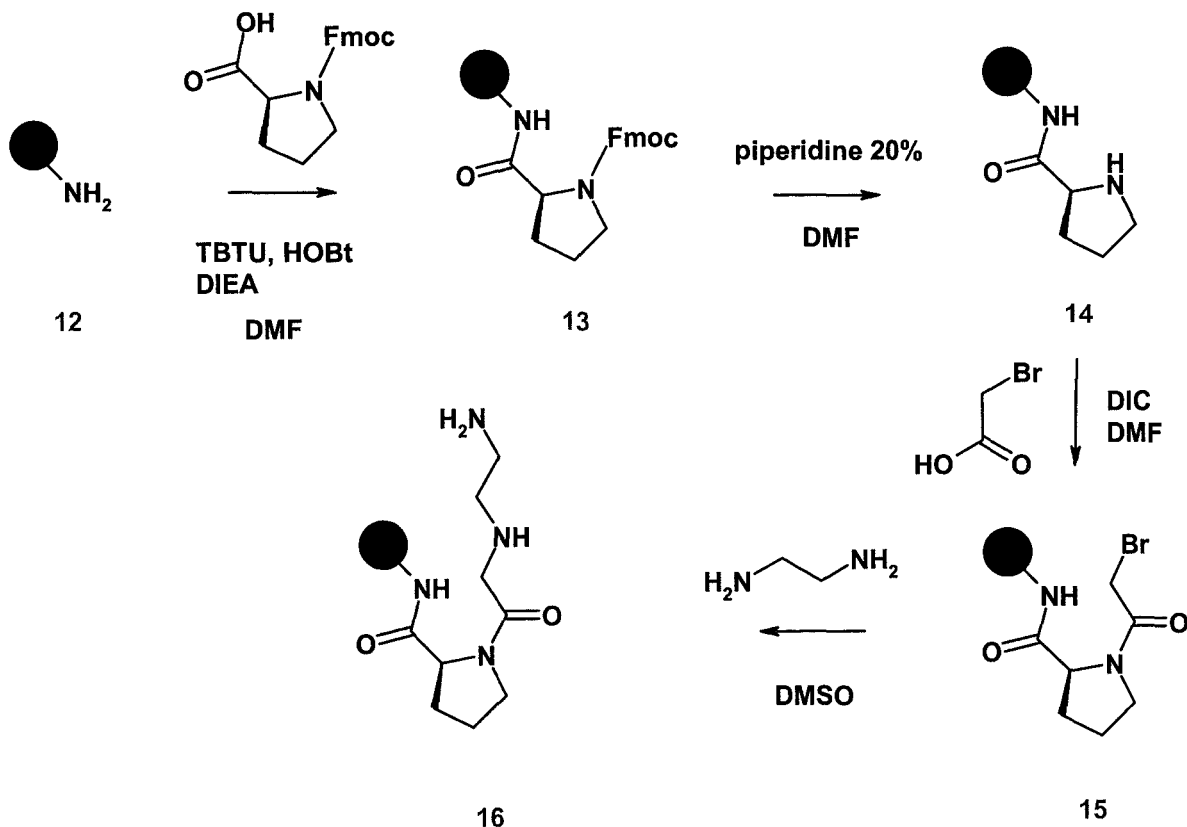


Figure 28. Construction de l'intermédiaire réactionnel **16** sur la résine de type rink amide.

¹⁶ Willoughby C. A., Chapman K. T.; Solid Phase Synthesis of Aryl Amines; *Tet. Lett.*, **1996**, *37*, pp 7181-7184.

3.2.5.2. Mise au point de la réaction de substitution nucléophile aromatique sur support solide.

Pour la mise au point de la réaction de substitution nucléophile aromatique il nous était possible de jouer sur quatre paramètres :

- Le temps de réaction
- La température (en tenant compte de la dégradation de la résine à partir de 110°C).
- Le solvant (dans ce type de réaction, un solvant polaire est requis).
- Le catalyseur (une base)

L'un des principaux avantages des réactions sur support solide est la possibilité d'utiliser des excès du réactif amené en solution (5 équivalents dans notre cas). Ceci permet d'accélérer considérablement la cinétique tout en garantissant une élimination facile de ces excès en fin de réaction.

Des essais sur de petites quantités de résine ont été réalisés en faisant varier les paramètres vus précédemment. Les réactions de substitution ont été considérées quantitatives d'après les résultats du test colorimétrique de Kaiser. Ces essais ont été réalisés sur la résine en présence de 5 équivalents de 6-chloronicotinonitrile et de 5 équivalents de base dans les conditions décrites dans le tableau 1 :

Entrée	Température	Solvant	Catalyseur	Temps de réaction	Résultats*
1	50°C	THF	DIEA	>96 heures	N.Q.
2	50°C	NMP	DIEA	>96 heures	N.Q.
3	80°C	DMF	K ₂ CO ₃	>96 heures	N.Q.
4	80°C	NMP	DIEA	20 heures	Q.

*: N.Q.: non quantitatif, Q : quantitatif

Tableau 1. S_nAr sur support solide en présence de 5 éq. de 6-chloronicotinonitrile et de 5 éq. de base.

A l'issue de ces essais, nous avons retenu les conditions suivantes :

- Temps de réaction : 20 h
- Température : 80°C
- Solvant : NMP
- Catalyseur : DIEA

Ce protocole expérimental a alors été appliqué à une quantité plus importante de résine. La résine est gonflée dans la NMP, 5 équivalents de 6-chloronicotinic nitrile sont ajoutés dans le réacteur chemisé, suivis de 5 équivalents de DIEA. Le milieu est alors agité mécaniquement à 80°C. La résine est ensuite abondamment lavée par la NMP, le dichlorométhane et séchée sous vide. Une portion a été coupée par le TFA dans le dichlorométhane. Le contrôle LC-MS de la solution obtenue a montré la disparition du produit aminé de départ ancré sur résine, il a montré également outre la présence du produit attendu, la présence d'un second produit, résultant d'une double acylation ainsi que d'autres produits secondaires minoritaires (figure 29).

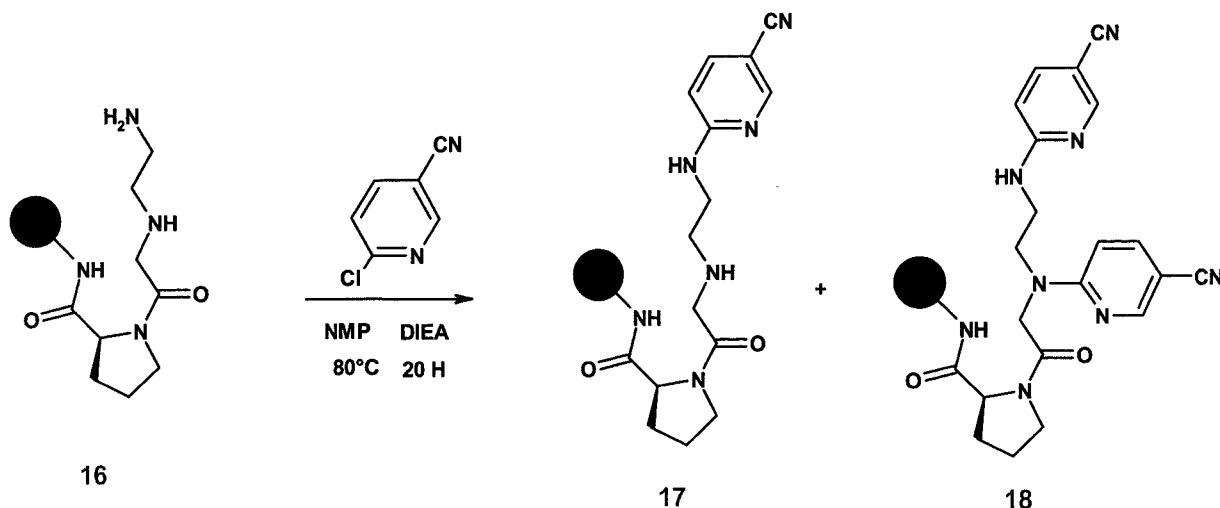


Figure 29. Résultats des essais de S_NAr sur support solide.

3.2.5.3. Résultats intermédiaires.

Les étapes d'acylation n'ont posé aucun problème particulier. Le composé diaminé **16**, ancré sur résine, a été obtenu quantitativement, aucun composé secondaire majoritaire n'a été détecté. Seule la réaction de substitution nucléophile aromatique s'est avérée problématique.

Après application du protocole opératoire optimisé décrit précédemment, le milieu réactionnel obtenu, après décrochage du support, s'est avéré assez complexe de part la présence de produits secondaires acylés non désirés.

Il était donc nécessaire à ce stade de la synthèse, et comme lors de la synthèse en phase homogène de ce composé, de recourir à l'utilisation d'une protection adéquate des fonctions aminées parasites.

3.2.6. Protection des fonctions aminées.

3.2.6.1. Utilisation de la protection avec le formaldéhyde.

Le protocole utilisé lors de la protection de la chaîne éthylènediamine en phase homogène par le formaldéhyde aqueux, ne peut pas être reproduit dans la synthèse sur copolymère de styrène et de divinylbenzène. En effet, cette matrice, composée de chaînes hydrophobes uniquement, ne gonfle pas convenablement dans les solvants polaires comme l'eau. Les fonctions greffées se retrouvent donc inaccessibles pour les réactifs.

La réaction de protection par le formaldéhyde a donc été testée en partant d'une solution de paraformaldéhyde dans le DMF.

Une solution de formaldéhyde dans le DMF a été préparée en chauffant 10 équivalents de paraformaldéhyde dans le DMF à 110°C, et ce pendant 20 minutes. La résine, préalablement gonflée dans un minimum de DMF est placée dans un réacteur auquel on ajoute la solution de formaldéhyde. L'ensemble est mis sous agitation mécanique. L'avancement de la réaction est suivi par tests colorimétriques au Chloranil et de Kaiser. Elle est arrêtée après 20 heures.

Une réaction de substitution nucléophile aromatique du 6-chloronicotinonitrile dans les conditions mises au point précédemment est alors entreprise. La résine protégée par un groupement méthylène, sous forme d'imidazolidine, est mise en présence de 6-chloronicotinonitrile en excès et de DIEA dans la NMP. Le réacteur chemisé est alors chauffé à 80°C, pendant 20 heures.

La réaction est alors analysée par LC-MS, après coupure au TFA dans le dichlorométhane.

Les analyses, obtenues après décrochage de la résine, révèlent la présence de deux produits majoritaires de masses 317 et 329, correspondant respectivement au dérivé carboxamide désiré, ainsi qu'au dérivé carboxamide protégé sous la forme d'imidazolidine. D'autres produits secondaires minoritaires sont également présents en solution.

Une purification par chromatographie préparative sur une colonne C₁₈ a permis d'isoler une fraction minime du composé attendu.

3.2.6.2. Résultats et conclusion.

- Le produit carboxamide primaire attendu est obtenu après protection au formaldéhyde, substitution nucléophile aromatique et clivage.
- Le rendement obtenu est faible.
- Le milieu est impur et de nombreux produits secondaires sont présents en solution.
- Comme pour la déprotection réalisée en phase homogène, 40% de produit non déprotégé sont encore présents après la coupure au TFA.

La protection par le formaldéhyde sur support solide, dans les conditions non optimisées, présente plusieurs inconvénients. La déprotection par le TFA ne permet pas d'obtenir quantitativement le carboxamide désiré. La présence de produit protégé en solution s'explique par la recapture du formaldéhyde libéré, en milieu acide, par les fonctions aminées de la chaîne éthylénique. La déprotection nécessiterait de nouveau la présence d'une résine piègeuse de nucléophiles de type hydrazine.

D'autre part, la présence en quantité non négligeable d'autres composés secondaires indique que la réaction de protection ne semble pas avoir été réalisée quantitativement, malgré le suivi par colorimétrie.

Nous avons décidé d'abandonner cette stratégie de protection en une seule étape de l'amine secondaire et de l'amine primaire et nous nous sommes orientés vers l'utilisation d'un double système de protection orthogonal décrit ci-dessous.

3.2.6.3. Application d'une protection orthogonale.

Le problème auquel nous nous trouvons confrontés était de protéger sélectivement la fonction amine secondaire en présence d'une fonction amine primaire réactive.

Le groupement protecteur Dde (2-acétyldimedone ou 5,5-diméthyl-cyclohexane-1,3-dione) a été mis au point par Bycroft et al.¹⁷ afin de protéger sélectivement les fonctions amines primaires des acides aminés, sur la chaîne latérale ou sur la chaîne principale.

D'après les conditions utilisées en littérature dans l'utilisation de ces protections, nous avons envisagé une séquence de trois étapes :

¹⁷ Bycroft B. W. and Chan W. C.; A Novel Lysine-protecting Procedure for continuous flow Solid Phase Synthesis of Branched Peptides; *J. Chem. Soc.*, **1993**, pp 778-779.

- Protection de la fonction amine primaire sélectivement par addition de Dde.
- Protection de la fonction amine secondaire par ajout de Boc_2O .
- Déprotection sélective de la fonction amine primaire.

Le schéma synthétique de cette séquence est représenté en figure 30.

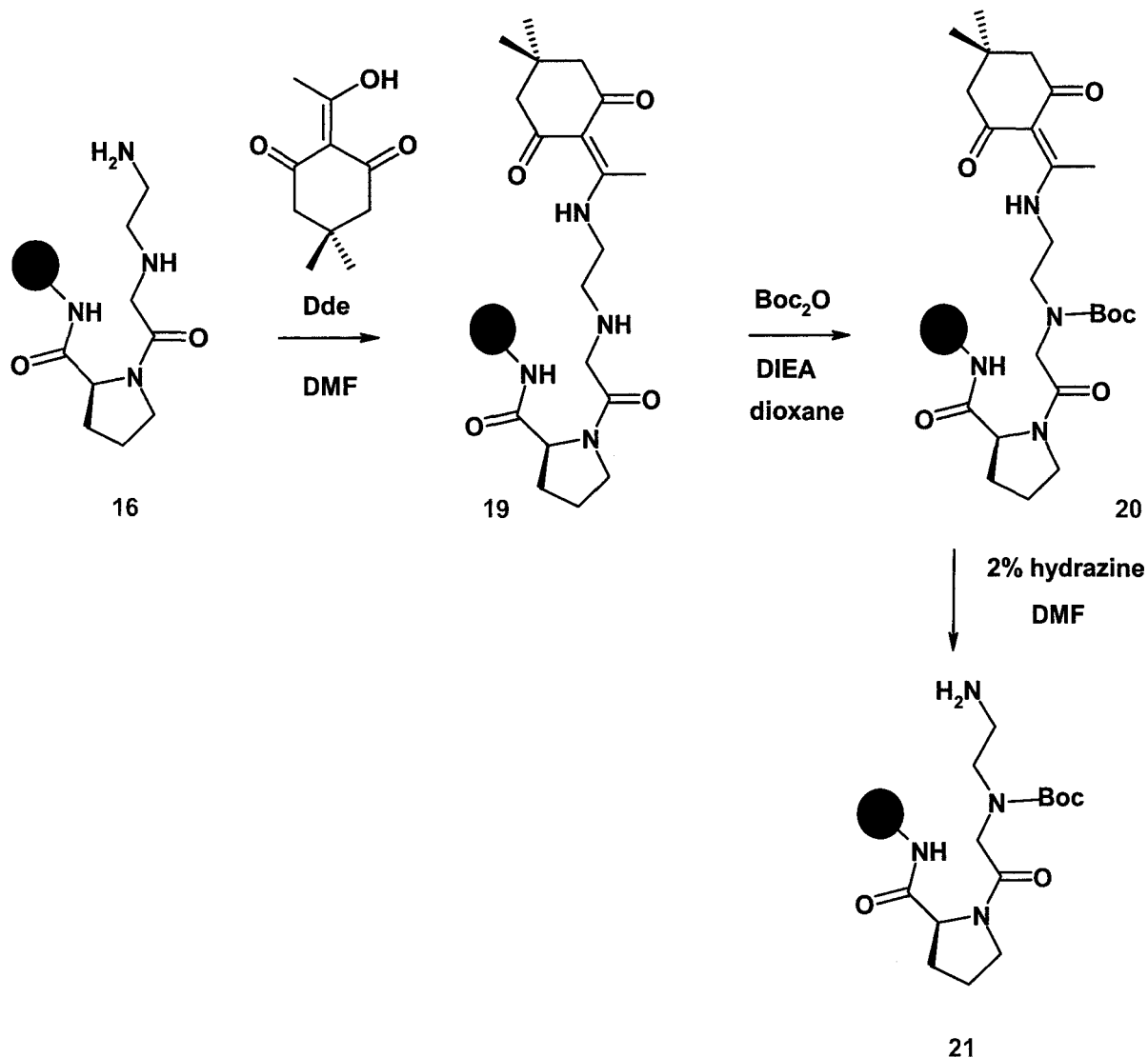


Figure 30. Présentation des trois étapes de protection et déprotection de la chaîne éthylènediamine sur support solide.

L'addition de 2-acétyldimédone (Dde) dans le DMF à la résine **16** conduit à la protection quantitative et sélective de la fonction amine primaire. La réaction a été suivie par tests colorimétriques et un aliquote de résine a été clivé par le TFA pour effectuer des analyses HPLC/LC-MS et RMN.

Le produit attendu est présent en solution. Il est caractérisé par spectrométrie de masse et par RMN. Sa pureté, analysée par RMN, est estimée à 90%.

Les spectres LC-MS (TIC, AP⁻ et AP⁺) du composé **19'** libéré de la résine sont présentés en figure 31.

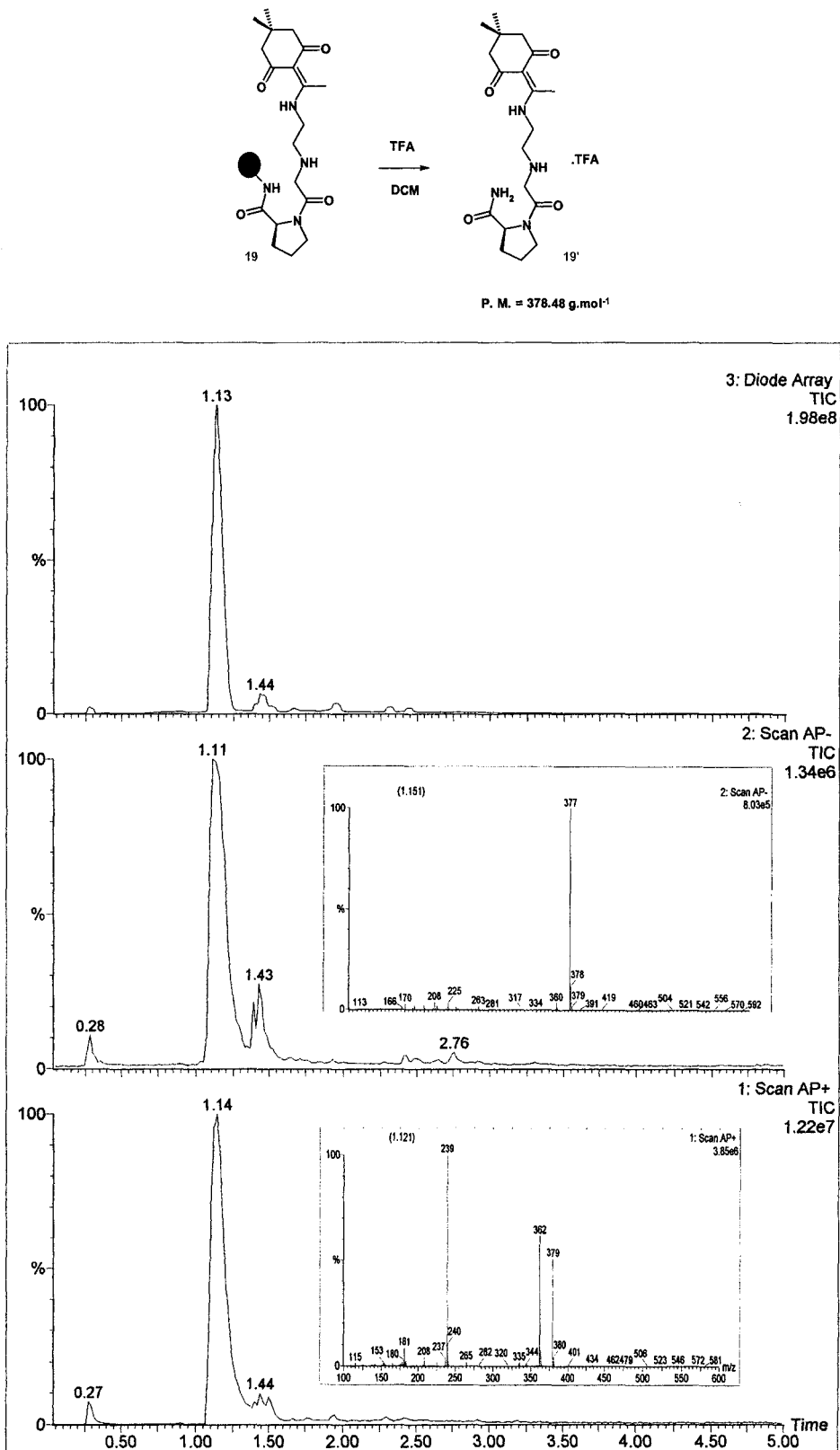


Figure 31. Analyse LC-MS de l'intermédiaire **19'** après décrochage de la résine.

L'amine secondaire est alors bloquée par addition de Boc_2O et de DIEA en solution dans le dioxane.

Enfin, l'amine primaire est libérée par traitement de la résine au moyen d'une solution d'hydrazine dans le DMF (2%). Le suivi de cette déprotection est réalisé en mesurant l'absorbance à 300 nm du sous-produit formé : le 3,6,6-triméthyl-4-oxo-4,5,6,7-tétrahydro-1H-indazole.

La résine est alors lavée avec un excès de DMF et de dichlorométhane, puis séchée sous vide.

3.2.6.3.1. Réaction de substitution nucléophile aromatique.

A la résine protégée **21**, gonflée dans la NMP, on ajoute une solution de 6-chloronicotinonitrile (10 éq.) et de DIEA dans la NMP. La suspension est alors chauffée à 80°C sous agitation mécanique, dans un réacteur chemisé, pendant 48 heures.

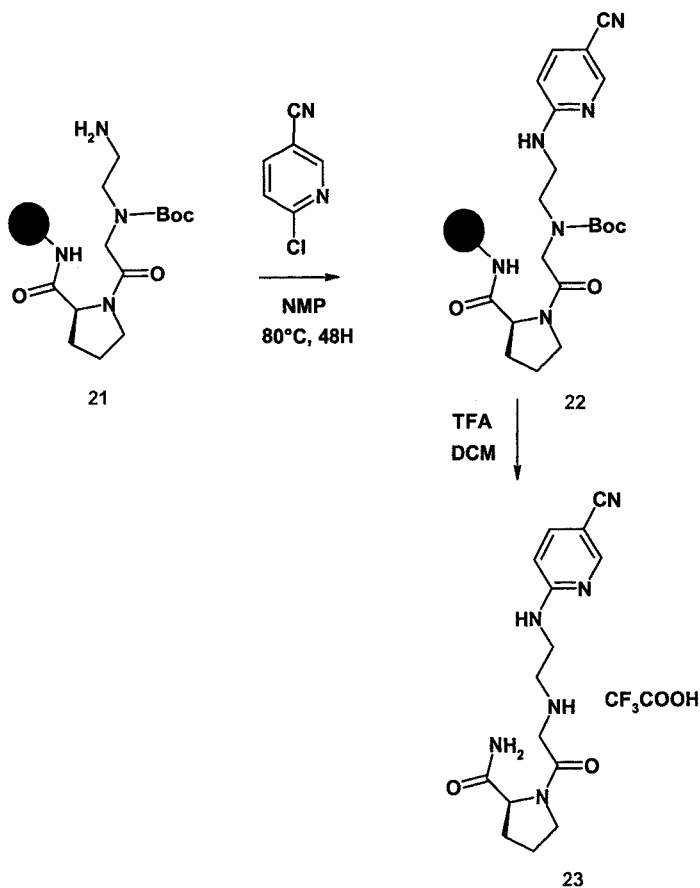


Figure 32. Réaction de substitution nucléophile aromatique sur billes de résine, suivie du décrochage par acidolyse.

Le composé carboxamide est décroché de la résine par traitement au moyen d'une solution de TFA (50%) dans le dichlorométhane (figure 32).

Le filtrat est alors évaporé, et le produit est précipité dans l'éther diéthylique froid pour donner une poudre beige avec un rendement de 90%.

La caractérisation du dérivé carboxamide primaire est réalisée par HPLC/LC-MS (figure 33), RMN ^1H et ^{13}C . Le produit obtenu est pur à 90%.

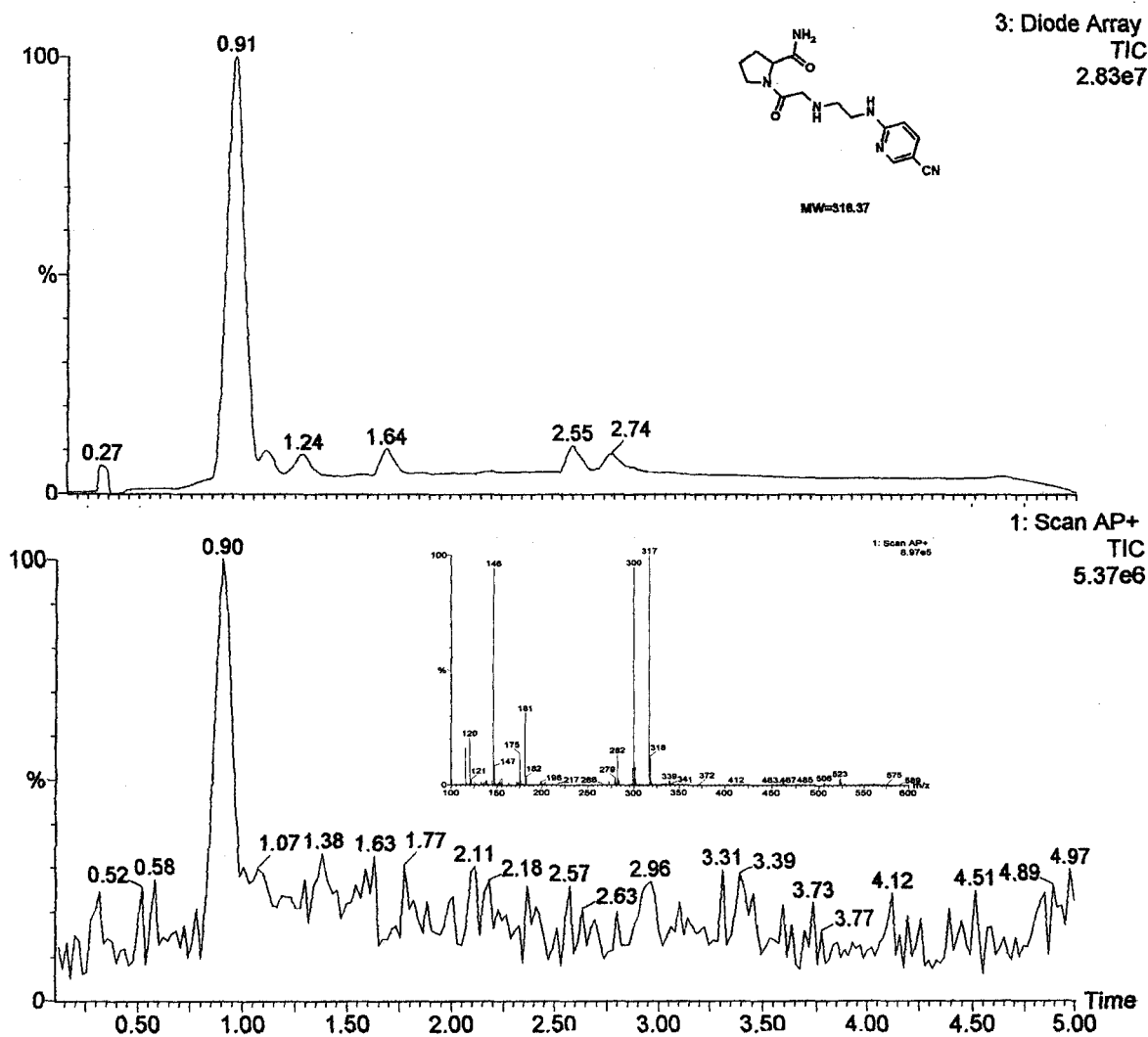


Figure 33. Caractérisation du produit libéré de la résine par LC-MS.

3.2.6.3.2. Résultats.

La mise en œuvre d'une protection orthogonale Dde/Boc nous a permis de préparer le précurseur carboxamide primaire avec un rendement de 90% et une pureté finale de 90%. Contrairement à la protection par le formaldéhyde, la molécule libérée de la résine ne présente plus de protection résiduelle sur les fonctions aminées. En effet, un second avantage de cette séquence de protection est que l'on libère la fonction aminée secondaire sous la forme d'un sel de TFA en concomitance avec la libération du carboxamide primaire pendant l'étape de clivage.

Le produit ainsi obtenu, ne nécessite pas d'étape de purification et peut être utilisé directement dans la dernière étape de déshydratation, transformant la fonction carboxamide en nitrile.

Parmi les produits secondaires minoritaires, formés lors du clivage, nous avons pu mettre en évidence une dicétopipérazine **24** formée avec un rendement d'environ 5%. Elle résulte de l'attaque nucléophile de l'amine secondaire de la glycine sur le carbone de la fonction amide polymère/résine. L'intermédiaire tétraédrique conduit alors après tautomérie au décrochage de la dicétopipérazine du support solide. (figure 34)

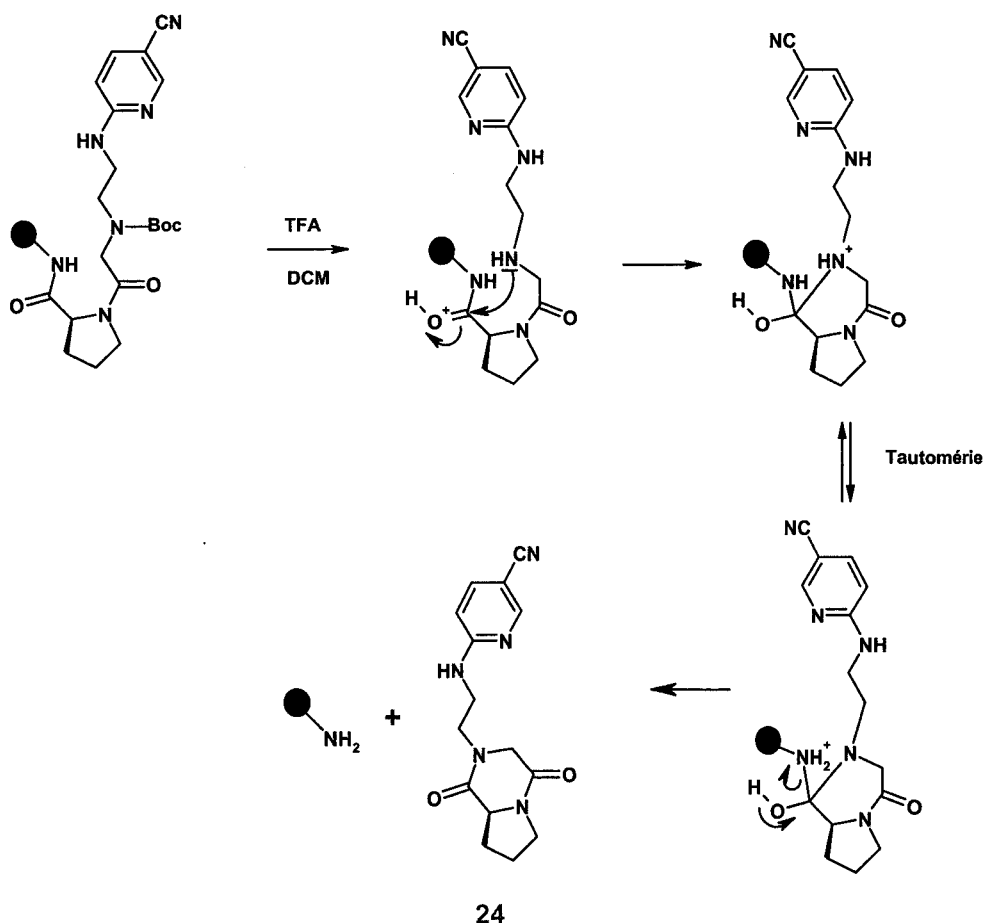


Figure 34. Mécanisme de formation du dérivé dicétopipérazine par clivage au TFA.

3.3. Déshydratation en phase homogène.

3.3.1. Protocoles de déshydratation.

L'étape ultime dans l'obtention du composé de référence consiste en une étape de déshydratation de la fonction carboxamide en fonction nitrile, en phase homogène.

Pour se faire, trois voies de déshydratation ont été appliquées:

- POCl₃, imidazole dans la pyridine.¹⁸
- TFAA dans le DCM.¹⁹
- nBu₂SnO dans le toluène à reflux²⁰.

Aucune de ces trois voies de synthèse n'a permis d'obtenir le composé désiré. Les deux premières méthodes ont effectivement permis la déshydratation du carboxamide primaire en nitrile, mais tout en favorisant la formation des dérivés *N*-trifluoroacétamides **23a** et **23b** (figure 36), en fonction du nombre d'équivalents d'agent déshydratant utilisé.

Récemment, les oxydes d'étain ont été utilisés en tant que catalyseurs de réactions de déshydratation de dérivés carboxamides dans des conditions neutres.

L'application de ce protocole à notre synthèse n'a favorisée que la formation quantitative de la dicétopipérazine **24**, par réaction intramoléculaire de la fonction amine secondaire sur le carbone électrophile activé (figure 35).

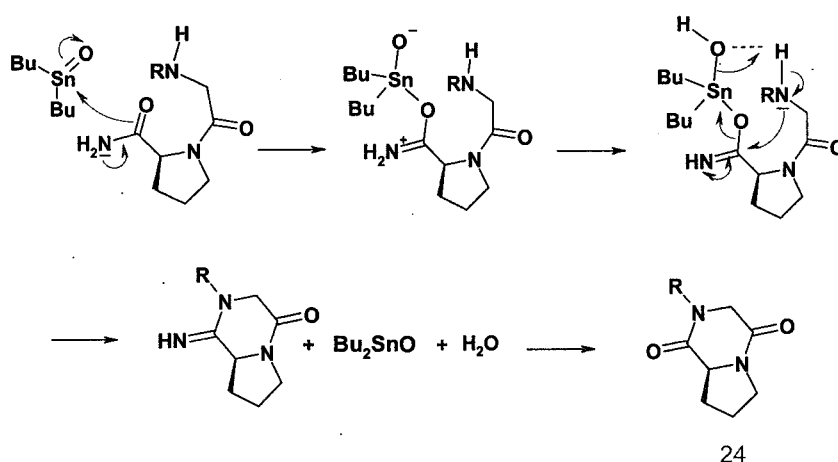


Figure 35. Mécanisme de la formation du dérivé dicétopipérazine en présence d'oxyde de dibutylétain.

¹⁸ Ashworth D. M., Atrash B., Baker G. R., Baxter A. J., Jenkins P. D., Jones D. M. and Szelke M.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, pp 1163-1166.

¹⁹ Almquist et al., *J. Med. Chem.*, **1985**, *28*, pp 1067-1071.

²⁰ Bose D. S., Jayalakshmi B., Goud P.R.; Dialkyltin Oxide-Catalysed Synthesis of Nitriles from Primary Amides under Neutral Conditions; *Synthesis*, **1999**, *10*, pp 1724-1726.

3.3.2. Libération des fonctions amines.

L'étape de passage de la fonction carboxamide en fonction nitrile étant optimisée, la dernière étape à étudier est la libération des fonctions amines présentes sous la forme de *N*-trifluoroacétamide.

La déprotection de ce type de liaison peut s'obtenir en utilisant des conditions basiques comme par exemple :

- Carbonate de sodium aqueux dans le méthanol
- Hydroxyde de sodium dans le méthanol.

L'inconvénient majeur de ces protocoles est qu'ils favorisent la formation de la dicétopipérazine **24** (tableau 2).

L'utilisation de borohydrure de sodium en solution dans l'éthanol a permis l'obtention quantitative du composé **24**, à partir des composés mono (**23a**) et bis (**23b**) trifluoroacétylés (tableau 2).

Le protocole utilisant une solution d'ammoniaque méthanolique a également permis la déprotection quantitative du composé **23a**.

Ces dernières conditions ont été retenues pour la libération des fonctions amines du composé **23a**, puisqu'elles permettent d'obtenir le NVP-DPP-728 de manière quantitative et avec une pureté appréciable.

L'ensemble de ces informations est illustré à la figure 36 et au tableau 2.

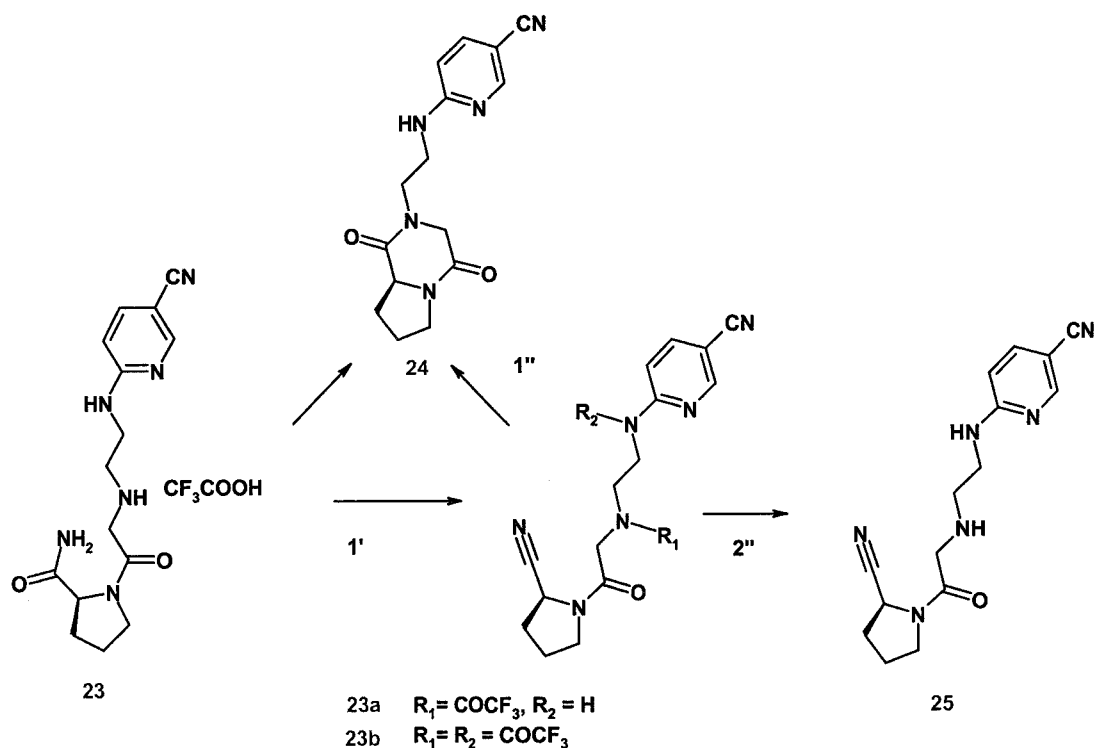


Figure 36. Schéma récapitulatif des différentes étapes entreprises pour obtenir le produit 25, provenant de la déshydratation de 23.

Entrée	Réactif	Conditions	Produits	%
1'	23 (1 éq.)	POCl ₃ (4 éq.), imidazole pyridine anhydre, -20°C, 2h	23 a	80
1'	23 (1 éq.)	TFAA (1 éq.), THF anhydre, 0°C, 2h	23 a	30
1'	23 (1 éq.)	TFAA (2 éq.), THF anhydre, 0°C, 2h	23 a	80
1'	23 (1 éq.)	TFAA (5 éq.), THF anhydre, 0°C, 2h	23 b	85
2'	23 (1 éq.)	nBu ₂ SnO (0.1 éq.), THF, 50°C, 3h	24	90
1''	23 a (1 éq.)	K ₂ CO ₃ (1 éq.), 6% H ₂ O/MeOH, 3h	24	80
2''	23 a (1 éq.)	NaBH ₄ (2 éq.), EtOH, 2h	25	90
2''	23 b (1 éq.)	NaBH ₄ (2 éq.), EtOH, 2h	25	90
2''	23 a (1 éq.)	NH ₃ aq., MeOH, 2h	25	90

Tableau 2: Présentation des différentes étapes mises en jeu lors de la réaction de déshydratation.

3.4. Résultats.

La synthèse sur support solide de l'intermédiaire carboxamide **23**, par la mise en œuvre d'une protection orthogonale Dde/Boc, nous a permis d'obtenir un composé d'une pureté finale de 90%, avec un rendement de 90% à la suite de 10 étapes.

Sa déshydratation en phase homogène, en présence d'anhydride trifluoroacétique, a fourni quantitativement le dérivé nitrile *N*-trifluoroacétylé **23a**. Celui-ci a été déprotégé quantitativement en présence d'une solution d'ammoniaque éthanolique. Le rendement total de ces deux étapes a été de 80%. Le rendement global des étapes en phase solide et en phase homogène s'élève donc à 72 %.

Après traitement du composé obtenu avec un équivalent d'acide chlorhydrique en solution dans le dioxane et recristallisation, le monochlorhydrate du NVP-DPP-728 est obtenu. Les analyses RMN (¹H, ¹³C) et le point de fusion se sont avérés correspondre exactement aux caractéristiques publiées dans le brevet déposé par Novartis.

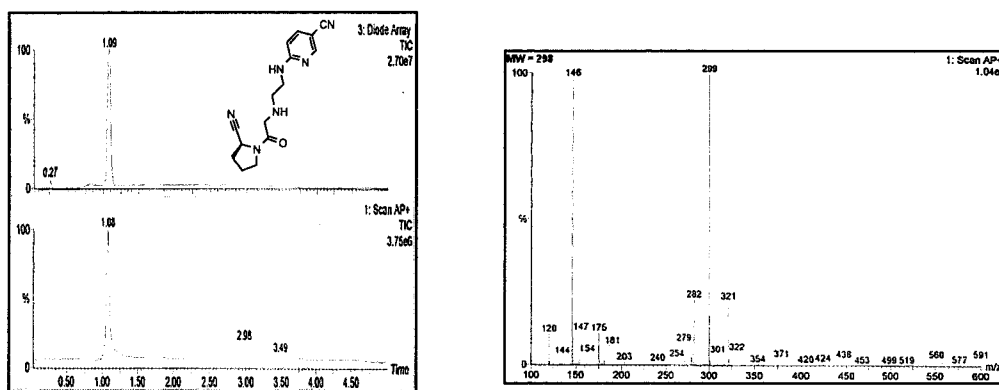


Figure 37. Caractérisation par LC-MS du composé 25, déhydraté et déprotégé.

4. CONCLUSION.

NVP-DPP-728 demeure encore la molécule de référence dans l'inhibition de la Dipeptidyl Peptidase IV, cible nouvelle dans le traitement du diabète de type 2. En janvier 2003, cette molécule a été désignée "molécule du mois" sur le site de la société Prous Science²¹, spécialisée dans la communication d'information et de données pour les sociétés pharmaceutiques.

Dans une première partie, nous avons présenté deux nouvelles voies de synthèse de ce composé, permettant soit son obtention à l'échelle du gramme, en phase homogène, avec un rendement total supérieur (17% ou 12%, avec ou sans recours à une résine piègeuse de formaldéhyde) au rendement de la synthèse présentée par Novartis (5%), soit sa formation rapide et quantitative à l'échelle du mg à partir d'un protocole développé sur billes de résine.

Outre l'avantage de faciliter l'accès à NVP-DPP-728, cette seconde voie permet d'obtenir un intermédiaire **21**, qui ouvre la possibilité à la synthèse de nouvelles séries de composés. Un exemple de diversification envisageable, dans le but de recruter de nouvelles interactions avec une seconde poche hydrophobe, proche du site catalytique, est schématisé en figure 38. La fonction amine primaire de l'intermédiaire **21** est substitué par un dérivé triazine, le 4,6-dichloro-*N*-(4-méthoxyphényl)-1,3,5-triazin-2-amine **26**, très réactif à température ambiante en présence d'un nucléophile.

²¹ <http://www.prous.com/mom/mom.asp>.

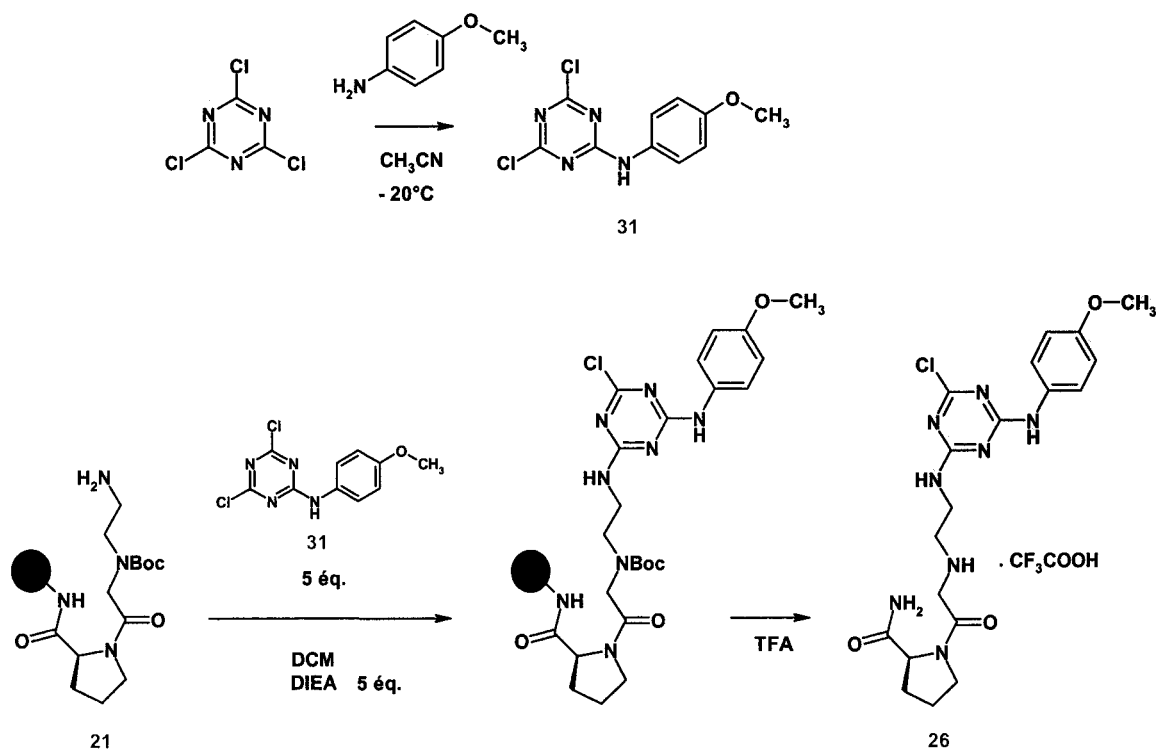


Figure 38. Illustration de l'introduction de diversité sur le bras aminé de l'intermédiaire 21, sur support solide.

Cette approche synthétique offre l'accès à une diversité complémentaire à celle publiée par Villhauer et al.²², un an après la réalisation de ce travail, et qui se base sur la substitution de l'intermédiaire **15**, par différents monomères aminés.

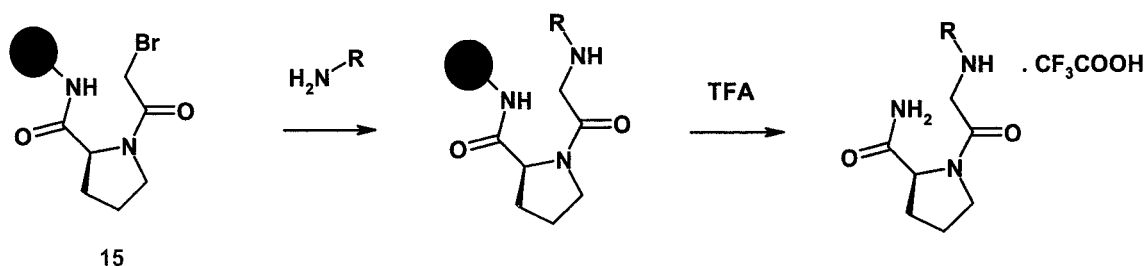


Figure 39. Illustration de l'introduction de diversité sur support solide, pour l'obtention d'inhibiteurs de la DPP-IV.²³

La synthèse d'un inhibiteur de référence de DPP-IV réalisée, nous nous sommes intéressés à la conception de nouveaux inhibiteurs.

²² Villhauer E. B., Brinkman J. A., Naderi G. B., Dunning B. E., Mangold B. L., Mone M. D., Russell M. E., Weldon S. C., Hughes T. E.; 1-[2-[(5-cyanopyridin-2-yl)amino]ethylamino]acetyl-2-(S)-pyrrolidinecarbonitrile: A Potent, Selective, and Orally Bioavailable Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor with Antihyperglycemic Properties; *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, pp 2362-2365.

5. SYNTHÈSE PARALLÈLE DE NOUVEAUX INHIBITEURS.

5.1. Conception de nouveaux inhibiteurs de DPP-IV.

5.1.1. Approche « Analogues du Substrat ».

En l'absence de données cristallographiques à cette époque sur l'enzyme et sur son site catalytique, nous avons envisagé de travailler à partir de la structure d'un dipeptide connu sous le nom de TSL-225 afin de concevoir de nouveaux inhibiteurs de la DPP-IV.

Ce dipeptide H-Trp-Pro-OH, dont l'origine sera discutée dans les paragraphes suivants, présente une IC_{50} égale à 5,7 μ M sur l'enzyme de rat.

5.1.2. Conception d'analogues d'un inhibiteur de DPP-IV : présentation de TSL-255.

5.1.2.1. Origines de TSL-225.

En 1997, un tripeptide, nommé TMC-2A, isolé de *Aspergillus Oryzae* A374 a été identifié comme étant un nouvel inhibiteur de la DPP-IV de rat²³. Cet inhibiteur, dont la structure est présentée en figure 40, est sélectif de l'enzyme mais présente une IC_{50} modeste, égale à 7.7 μ M.

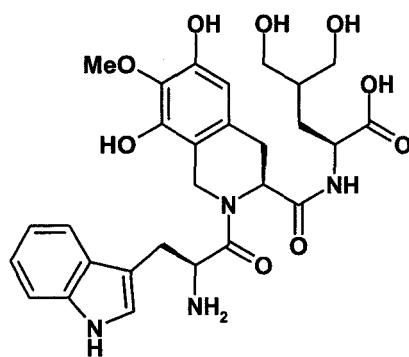


Figure 40. Structure de TMC-2A, inhibiteur de DPP-IV.

Le TMC-2A, comme de nombreux métabolites secondaires, possède une structure exotique, composée d'un acide aminé naturel et de deux acides aminés non conventionnels. Il a fait l'objet en 1998 d'une première optimisation²⁴ qui a permis d'identifier dans la structure du tripeptide les éléments essentiels à l'inhibition. Il en est résulté un dipeptide « minimum », le TSL-225 dont l'activité n'est que légèrement augmentée.

²³ Asai Y., Nonaka N., Nishio M., Okamura K., Date T., Sugita T., Ohnuki T., Komatsubara S.; TMC-2A, -2B and -2C, new Dipeptidyl Peptidase IV inhibitors produced by *Aspergillus oryzae* A 374. Isolation and structure determination; *J Antibiot.*, **1997**, *50*, pp 653-658.

²⁴ Yamada M., Okagaki C., Higashijima T., Tanaka S., Ohnuki T. and Sugita T.; A Potent Dipeptide Inhibitor of Dipeptidyl Peptidase IV; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, pp 1537-1540.

5.1.2.2. Description de la structure de TSL-225 obtenue à partir de l'étude structurale de TMC-2A.

La structure de TMC-2A se compose de trois parties reliées entre elles par deux fonctions amides. La partie *N*-terminale, partie A sur la figure 41, se compose d'un *L*-tryptophane, la partie intermédiaire (partie B) et la partie *C*-terminale (Partie C) sont constituées respectivement de l'acide (3*S*)-6,8-dihydroxy-7-méthoxy-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoléine-3-carboxylique et de la *L*-dihydroxyleucine qui sont deux acides aminés non protéinogènes.

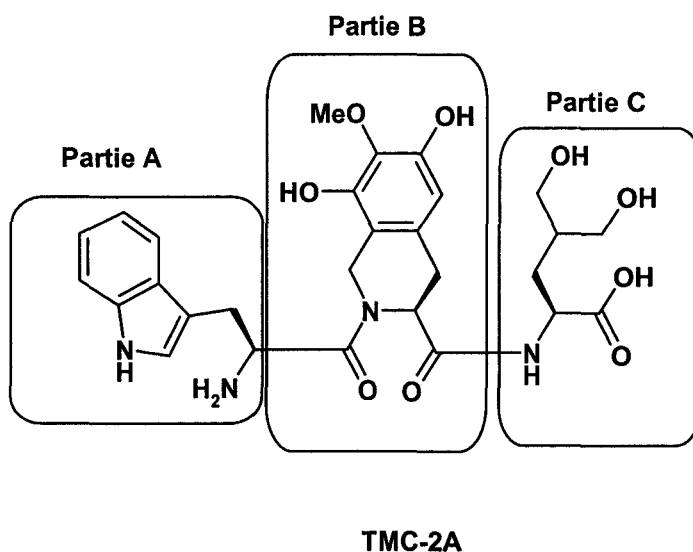


Figure 41. Description de TMC-2A.

5.1.2.2.1. Etude structurale.

Une optimisation de cet inhibiteur a été entreprise par Yamada et al. par synthèse sur support solide en modulant chaque partie de ce tripeptide. Le résidu médian choisi (Partie B) pour l'optimisation de l'activité de TMC-2A est l'acide *L*-tétrahydroisoquinoléique. Cette structure hydrophobe est dépourvue des éléments hydrophiles de TMC-2A, que sont les deux fonctions hydroxyles en position 6 et 8 du noyau isoquinoléine et le groupement méthoxy en position 7, ce qui facilite la synthèse.

Les modulations des parties A et C du tripeptide ont été apportées par couplage peptidique, en utilisant 20 acides aminés naturels, présentés à la figure 42.

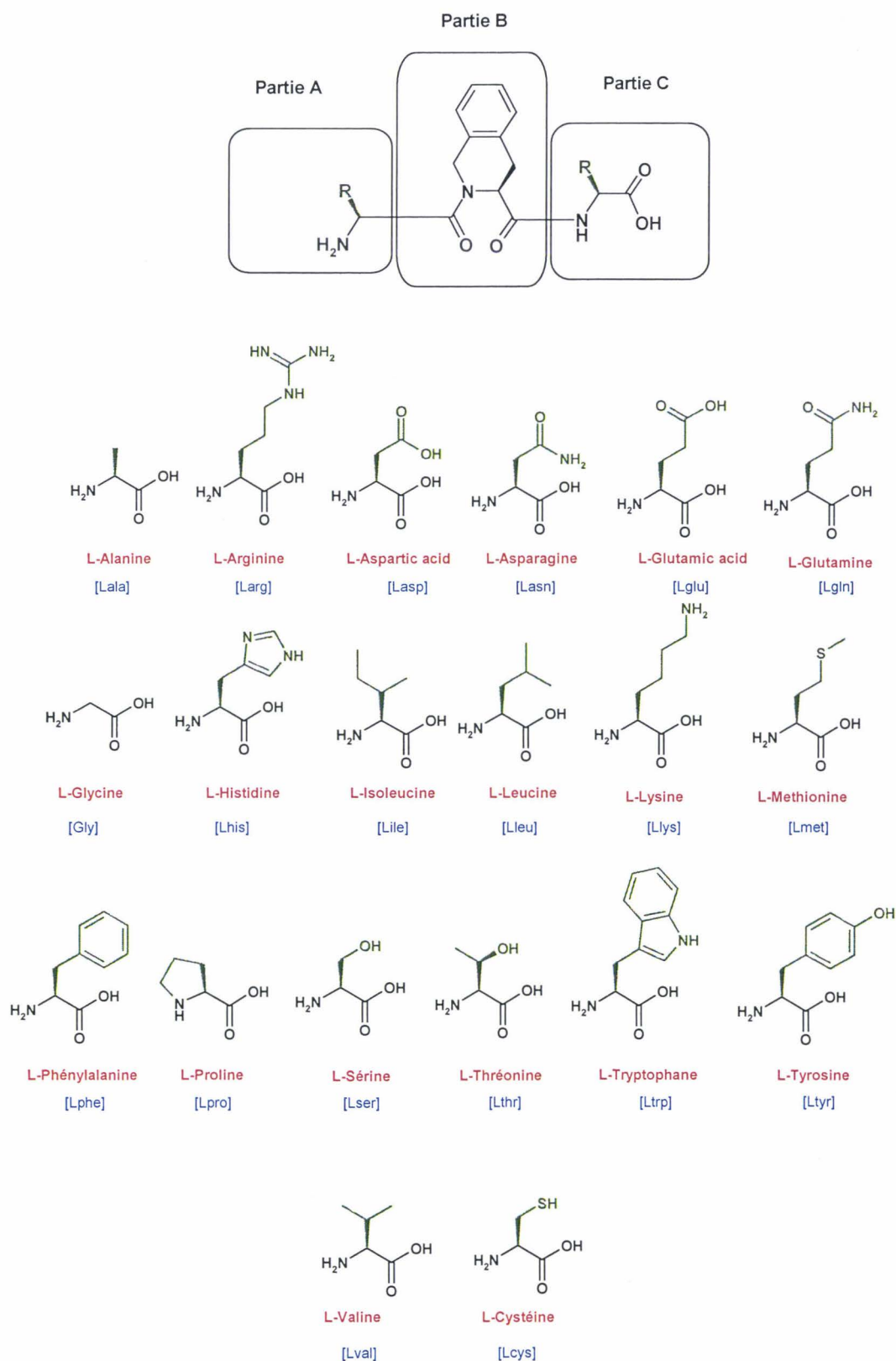


Figure 42. Présentation des 20 Acides aminés utilisés pour l'optimisation de TMC-2A.

Les résultats du criblage de ces composés, à une concentration de 10 μM , sur l'enzyme ont permis d'identifier trois structures, d'activité du même ordre de grandeur que TMC-2A.

Ces trois structures sont :

- H-Trp-Tic-Glu-OH
- H-Trp-Tic-Ser-OH
- H-Trp-Tic-OH

Les IC_{50} de ces trois composés sont respectivement : 7.9, 7 et 5.7 μM .

Il apparaît, après analyse de ces résultats, que le tryptophane en position *N*-terminale joue un rôle capital dans l'activité des inhibiteurs. Par contre, la présence d'un acide aminé en position *C*-terminale du tripeptide, n'apparaît pas essentiel pour l'activité. Le dipeptide TSL-225, dépourvu d'acide aminé en partie C, présente une plus forte activité inhibitrice que tous les tripeptides synthétisés.

Le remplacement du noyau tétrahydroisoquinoléine par un noyau pyrrolidine entraîne une baisse d'activité sensible. En effet, H-Trp-Pro-OH ne réduit que de 15% l'activité enzymatique de DPP-IV à une concentration de 10 μM contre 59% dans le cas du composé TSL-225. Les structures de ces composés sont représentées en figure 43.

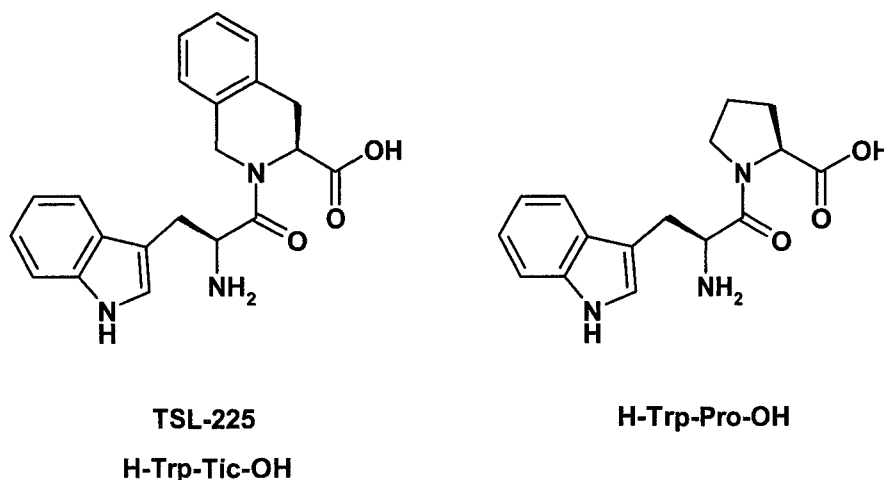


Figure 43. Structures de TSL-225 et de H-Trp-Tic-OH.

5.1.2.2.2. Conclusions.

La structure critique de TMC-2A responsable de l'inhibition de l'activité enzymatique de DPP-IV a été identifiée comme étant H-Trp-Tic-OH (TSL-225). L'activité de ce dipeptide est du même ordre de grandeur que TMC-2A: $\text{IC}_{50} = 5\mu\text{M}$.

5.1.3. Stratégie de synthèse.

Des éléments importants pour l'inhibition de DPP-IV ont pu être tirés du travail réalisé par Yamada et al.

- Une partie C-terminale hydrophobe contenant un acide aminé cyclique annelé à un noyau aromatique.
- Une liaison amide séparant les deux résidus.
- Une partie N-terminale possédant une fonction aminée protonable et une chaîne latérale aromatique, comportant une fonction aminée substituée.

Nous avons entrepris la recherche de nouveaux inhibiteurs en nous inspirant de la structure de TSL-225. Notre stratégie a été guidée par les impératifs suivants :

- L'amélioration du pouvoir inhibiteur compétitif réversible et de la sélectivité vis-à-vis de DPP-IV.
- Le développement d'inhibiteurs comportant un groupe cyano afin de favoriser l'affinité à l'enzyme par interaction du centre électrophile du dérivé nitrile avec la fonction sérine du site catalytique.
- L'étude de la relation structure-activité de ces composés au niveau du site catalytique de l'enzyme.

Cette optimisation a été réalisée en préparant une chimiothèque combinatoire comportant 576 composés. Cette chimiothèque a été synthétisée en parallèle (1 produit par puits) de manière robotisée, à l'occasion d'un stage effectué dans les laboratoires de la société Ferring située à Southampton.

5.1.3.1. Choix du sous-type P1.

Pour tenter d'améliorer l'activité d'inhibiteurs de DPP-IV en accord avec les informations recueillies dans l'étude structurale de TSL-225, nous avons choisi de travailler à partir de la structure Tic-CN et également à partir d'un autre cyanoamino acide que nous nommerons Xxx, dont pour des raisons de propriété industrielle, il ne nous est pas possible de révéler la structure (figure 44).

Nous avons cependant fait figurer ce résidu dans l'exposé qui va suivre car il permet de comprendre la stratégie que nous avons employée pour combiner les éléments de diversité.

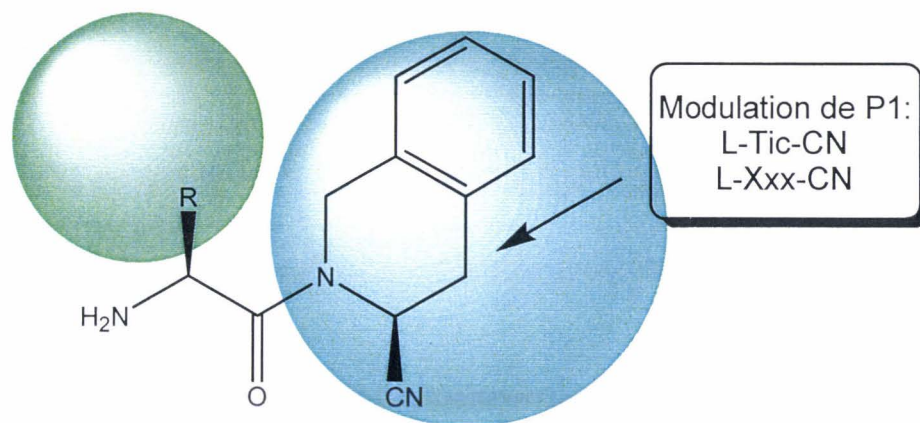


Figure 44. Modulation du sous-type P1.

5.1.3.2. Variations apportées au sous-type P2.

Le second élément de diversité de la chimiothèque a été introduit au niveau de P2. A cet effet, les résidus Tic-CN et Xxx-CN ont chacun été couplés à la lysine et l'ornithine au moyen d'une liaison amide.

La fonction amine présente dans la chaîne latérale des quatre cyanodipeptides ainsi obtenus permet d'opérer un troisième niveau de diversification, beaucoup plus large par réaction avec des chlorures d'acyle, des chlorures de sulfonyle, des thiocyanates, des acylisothiocyanates et des dérivés 4,6-dichloro-[1,3,5]triazine. La sélection de ces réactifs s'est faite de manière à positionner un groupement aromatique hydrophobe à une distance comparable à celle du noyau benzénique du tryptophane de TSL-225. Le but poursuivi étant de trouver une interaction avec une seconde poche hydrophobe située hors du site catalytique (figure 45).

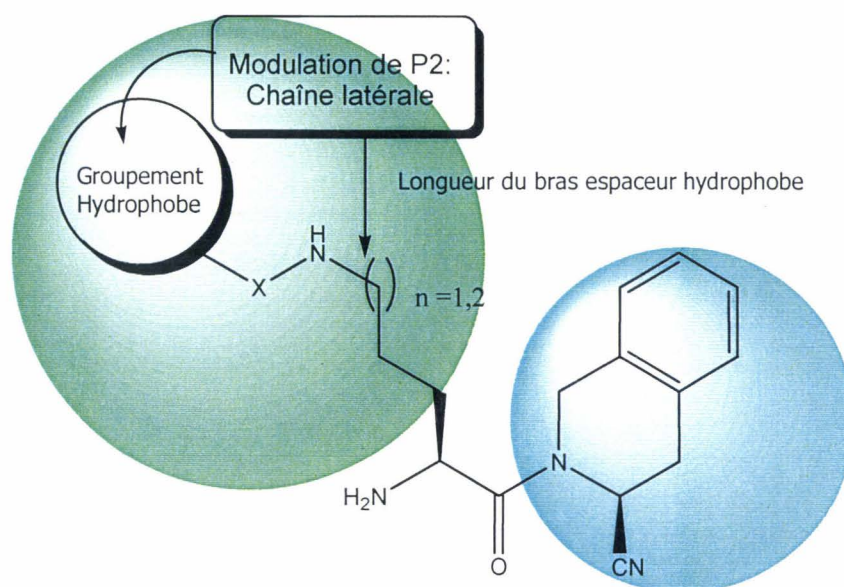


Figure 45. Modulations au niveau du sous-type P2.

5.1.3.3. Conception de la chimiothèque.

L'architecture choisie pour la synthèse de cette chimiothèque a été une architecture 4x24, adaptée au format des plaques de microtitration qui comportent 96 puits organisés en 12 lignes et 8 colonnes. Cette architecture permet de faire varier les quatre cyanodipeptides de base sur lesquels sont incorporées 24 variations différentes.

La voie de synthèse envisagée pour la construction de la chimiothèque comporte deux étapes :

□ Synthèse en phase homogène de quatre cyanodipeptides possédant soit un fragment Tic-CN soit un fragment Xxx-CN en position P1 et une unité Boc-Orn ou Boc-Lys en position P2, correspondant à des chaînes latérales longues de trois ou quatre atomes de carbone. Ces quatre monomères, préparés individuellement en quantité de l'ordre de quelques grammes, sont alors répartis mécaniquement par un robot dans trois colonnes de chaque plaque pour subir l'étape suivante de synthèse.

□ Synthèse automatisée en plaque 96 puits par couplage de l'amine primaire de la chaîne latérale de la lysine ou de l'ornithine avec 24 électrophiles répartis dans les 24 puits de chaque sous-unité de trois colonnes.

L'architecture de chaque plaque est schématisée à la figure 46.

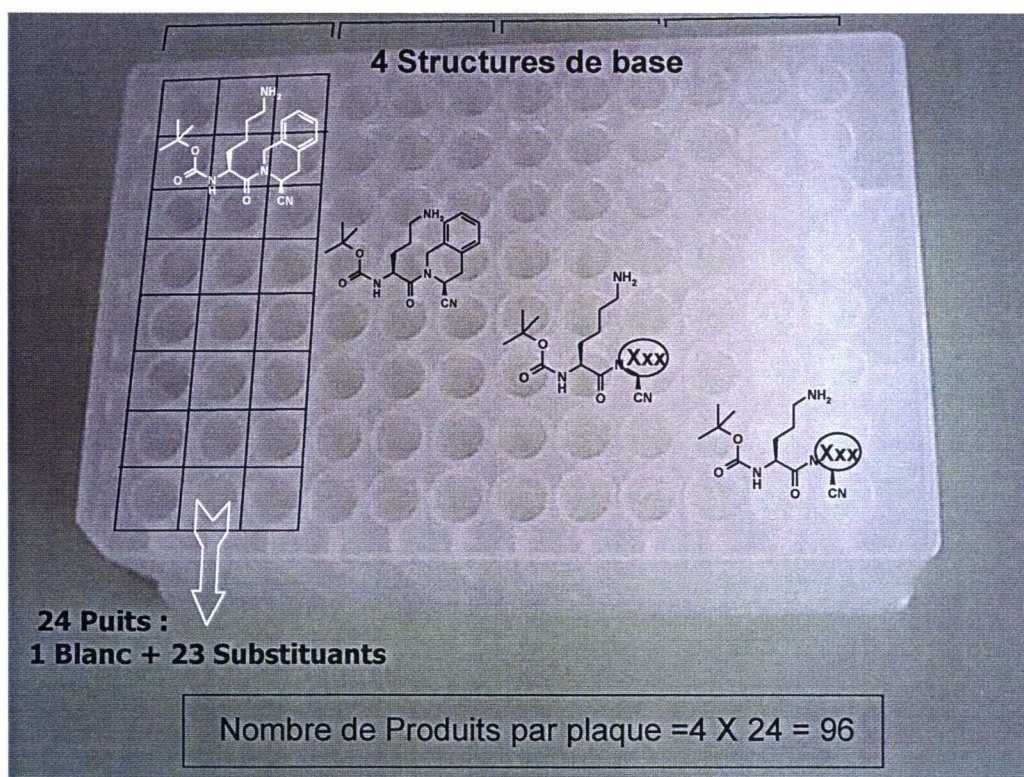


Figure 46. Architecture d'une plaque.

5.1.3.3.1. Choix des électrophiles.

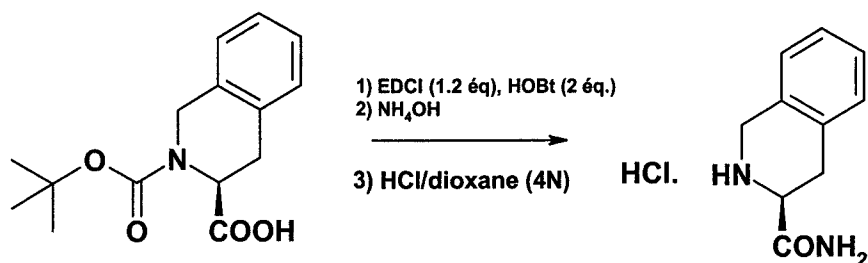
Les électrophiles utilisés pour l'incorporation de la diversité sur la chaîne latérale aliphatique aminée de chaque monomère ont été choisis pour leur réactivité vis-à-vis de la fonction amine : des sulfochlorures, des isocyanates et des acylisothiocyanates. Ces groupements possèdent en commun un noyau aromatique dont l'hydrophobie est plus ou moins modérée par la nature des substituants greffés en périphérie.

5.1.3.4. Chimie en phase homogène.

5.1.3.4.1. Synthèse des intermédiaires carboxamides.

La préparation en phase homogène de chaque monomère a été réalisée en suivant les schémas réactionnels suivants (figure 47):

- Les produits de départ commerciaux choisis ont été la Boc-*L*-Tic-OH et Boc-Xxx-OH.
- La fonction acide carboxylique a été transformée en fonction carboxamide par addition d'ammoniaque en solution aqueuse sur l'ester activé, obtenu par addition de carbodiimide soluble sur l'acide carboxylique en solution dans le dichlorométhane.
- La fonction aminée protégée par un groupement Boc est libérée en milieu acide.



27

Figure 47. Synthèse des intermédiaires carboxamide.

5.1.3.4.2. Réactions de couplage et déshydratation de la fonction carboxamide en nitrile.

La fonction amine, ainsi libérée, est alors couplée soit à la Boc-*L*-Lys(Fmoc)-OH, soit à la Boc-*L*-Orn(Fmoc)-OH en présence de PyBrop (figure 48).

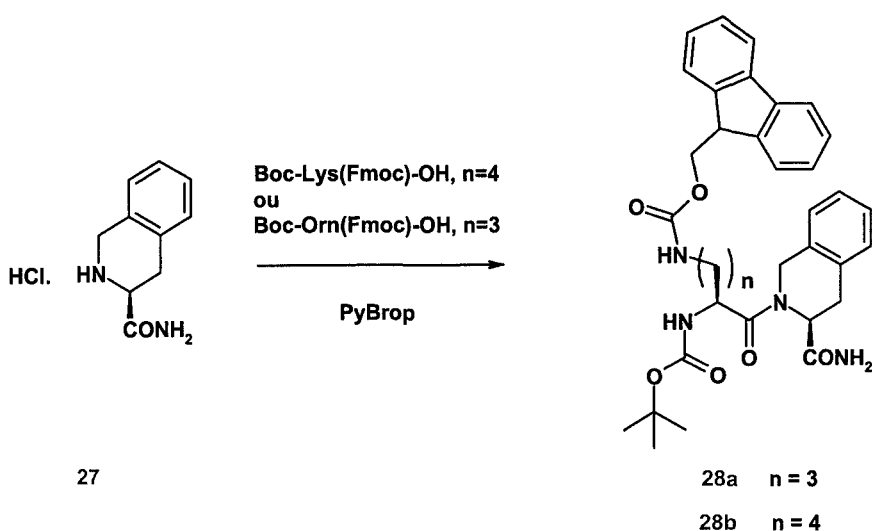


Figure 48. Réaction de couplage.

Finalement, la fonction carboxamide primaire est déshydratée en présence d'anhydride trifluoroacétique, selon le même schéma réactionnel que celui utilisé dans la partie 2.3.8. La fonction aminée de la chaîne latérale, protégée par un groupement Fmoc est alors libérée par utilisation de diéthylamine (figure 49).

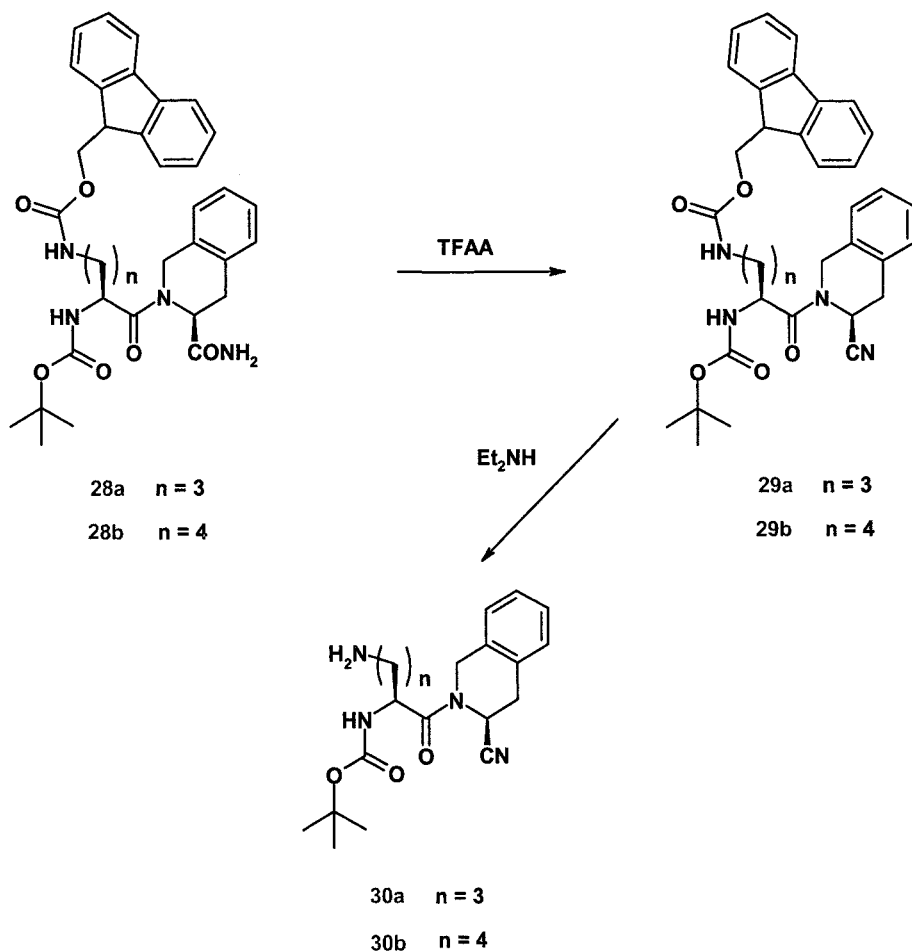


Figure 49. Réactions de déshydratation et de déprotection.

Ce schéma réactionnel a été également appliqué en partant du composé Boc-Xxx-OH commercial.

Chaque dérivé ainsi obtenu a été lyophilisé afin de préparer les solutions utilisables pour la synthèse en plaque 96 puits.

5.1.3.5. Chimie en plaque 96 puits.

La synthèse de la chimiothèque a été réalisée dans des plaques 96 puits de 2 mL (deepwell).

- Chaque plaque contient les quatre monomères présentés dans le chapitre précédent. Chaque monomère est présent dans chaque série de trois colonnes de la plaque.
- Le couplage de l'amine primaire de la chaîne latérale des résidus *L*-ornithine et *L*-lysine avec 23 dérivés : 23 sulfochlorures, et 23 isocyanates/acylisothonocyanates est ensuite réalisé dans les trois plaques respectives.
- Ce couplage est suivi d'une déprotection du groupement Boc porté par l'amine primaire *N*-terminale de la lysine ou de l'ornithine en présence d'acide trifluoroacétique en solution dans le dichlorométhane.

Deux plaques filles, dont la concentration en produit pour chaque puits est égale à 10 mM, sont réalisées et ont servies à réaliser les tests enzymatiques.

5.1.3.6. Résultats des synthèses.

5.1.3.6.1. Contrôle-qualité.

Le contrôle des synthèses a été effectué par LC-MS. Les solutions contenues dans chaque puit ont été analysées. Ce contrôle montre que les produits attendus sont systématiquement présents dans les milieux réactionnels, avec des niveaux de pureté supérieurs à 75%.

A titre d'exemple, le contrôle qualité d'un puits est présenté à la figure 50. On observe majoritairement le composé attendu aux temps de rétention 0.32 min. et 3.57 min.

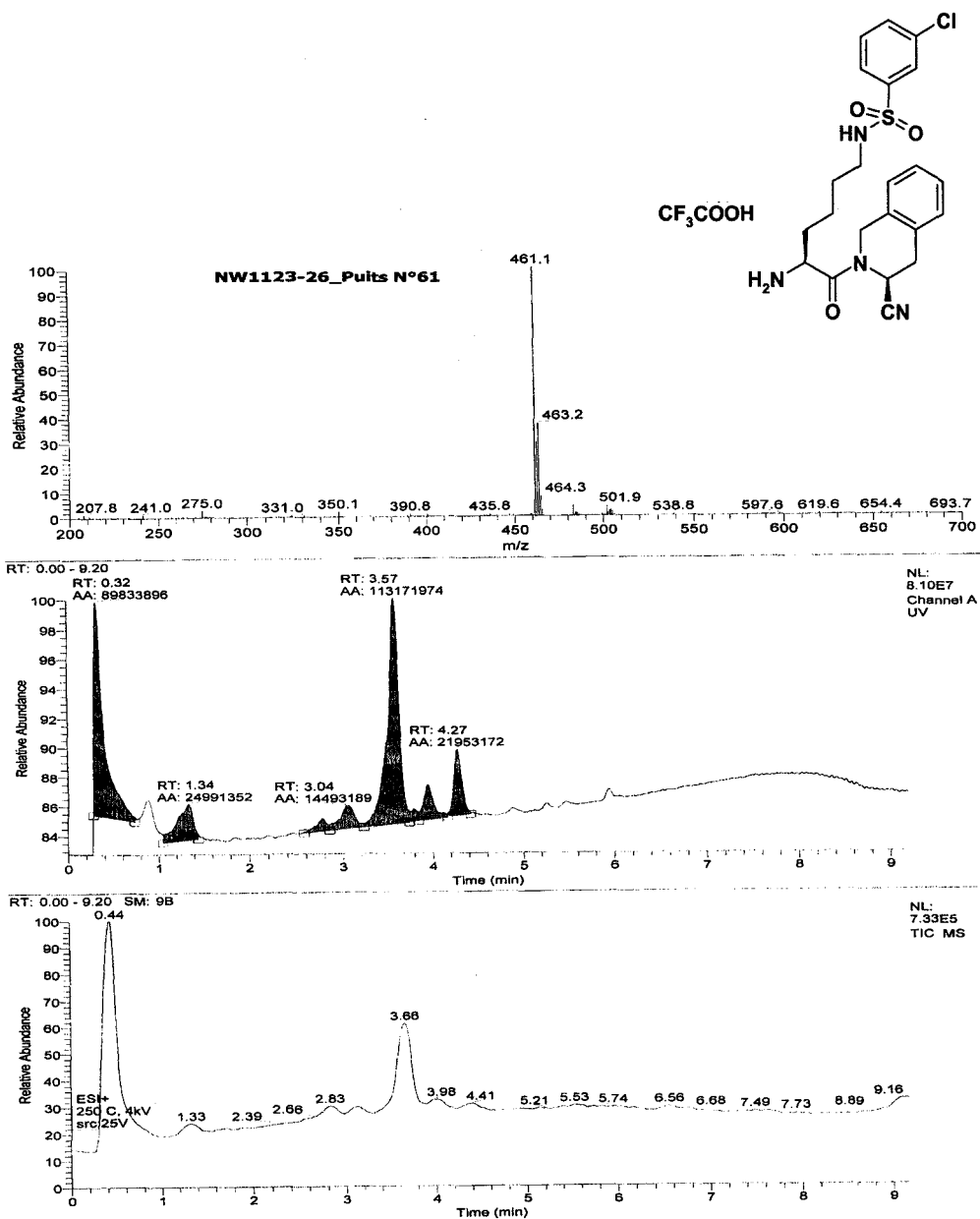


Figure 50. Contrôle LC-MS d'un puits d'une plaque.

5.1.3.7. Criblage de la chimiothèque sur DPP-IV.

La chimiothèque de 384 composés a été criblée sur DPP-IV à une concentration finale de 1 μ M.

5.1.4. Autre stratégie dans la variation du substituant de la chaîne latérale : insertion d'un noyau de type triazine sur la chaîne latérale lysine ou ornithine.

Les résultats obtenus précédemment ont permis de confirmer la présence d'une poche hydrophobe éloignée du site catalytique et son accessibilité par le bras d'une chaîne latérale d'un résidu comme la lysine.

De manière à évaluer la capacité d'occupation de cette poche, un noyau triazine substitué par différentes amines, a été fixé sur l'amine de la chaîne latérale du dipeptide pour donner des composés dont le squelette est représenté à la figure 51.

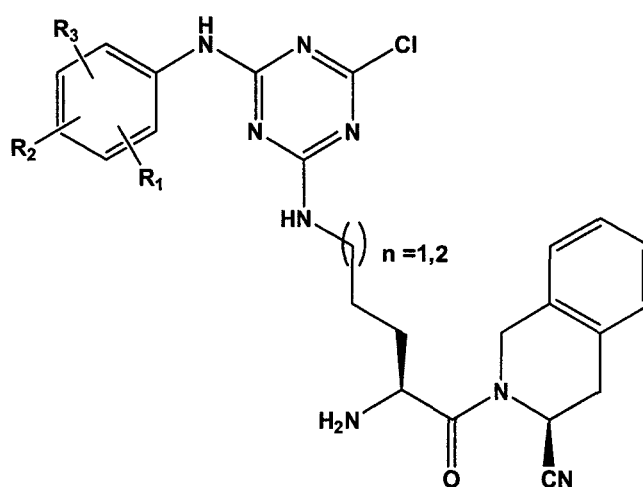


Figure 51. Structure générique des inhibiteurs substitués par un noyau triazine.

La molécule de 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine est un réactif peu onéreux, qui présente l'avantage d'offrir un large choix dans les possibilités de diversification par substitution nucléophile aromatique.²⁵ Par un contrôle du temps de réaction, de la température et du solvant, il est possible d'introduire une diversité par substitution successive des trois atomes de chlore, ce qui est illustré en figure 52. Les composés de type aniline, se sont montrés être des amines adéquates pour la première substitution, puisque suffisamment nucléophiles pour réagir, et pour ne pas favoriser des produits de disubstitution dans les conditions opératoires, de part la forte réactivité de la trichloro-triazine. La seconde substitution se déroule à température ambiante et il est possible à ce stade d'introduire différentes amines (primaires, secondaires). Enfin, la troisième substitution nécessite des conditions plus dures

²⁵ Gustafson G. R.; Incorporation of Carbohydrates and Peptides into Large Triazine-Based Screening Libraries Using Automated Parallel Synthesis; *Tetrahedron*, **1998**, *54*, pp 4051-4065.

ainsi que des nucléophiles riches en électrons. Dans ces conditions, seules les amines secondaires permettent une substitution complète.

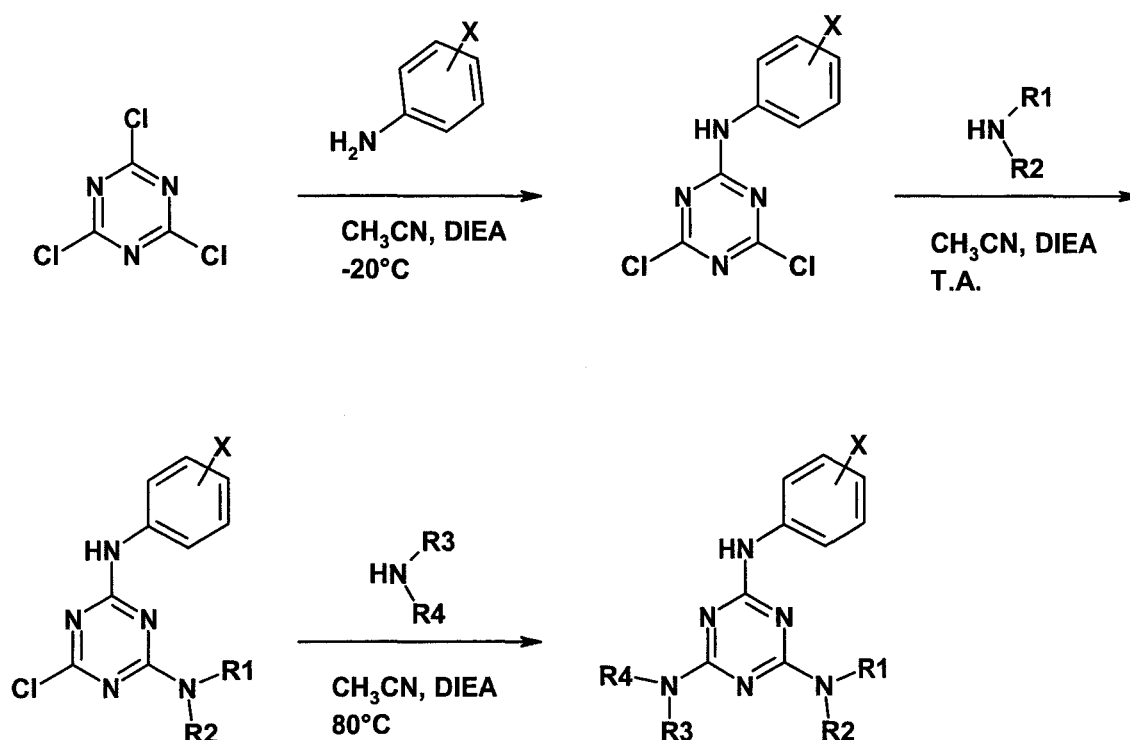


Figure 52. Illustration des conditions opératoires requises dans la substitution des trois atomes dechlorés de la 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine.

5.1.4.1. Choix des substituants utilisés.

Le choix des amines utilisées dans la préparation des dérivés de type triazine a été opéré selon trois critères :

- La nature du nucléophile : une aniline pour des critères de réactivité, discutés dans la partie précédente.
- Leur diversité structurale.
- Leur faible poids moléculaire.

Afin d'obtenir un maximum de liaisons de type Van der Waals avec la poche hydrophobe présente dans la région proche du site catalytique de l'enzyme, nous nous sommes tournés vers une structure commune à toutes les amines utilisées : une aniline mono, disubstituée ou trisubstituée.

5.1.4.2. Stratégie synthétique.

Pour réaliser la synthèse rapide de 23 dérivés triazine, de structure générique présentée en figure 51, il a été nécessaire de concevoir un protocole opératoire unique, utilisable pour la majorité des anilines mises en jeu.

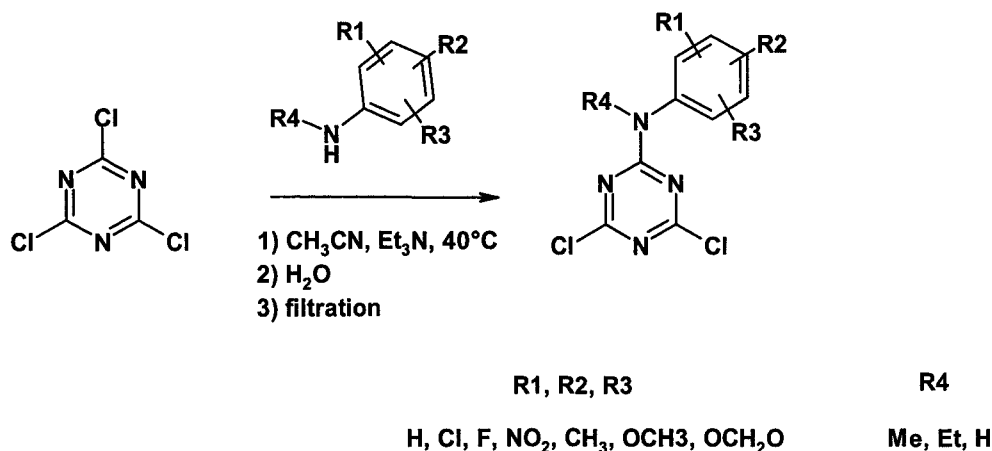


Figure 53. Structure générique des dérivés 4,6-dichloro-*N*-phényl-1,3,5-triazin-2-amine.

Le protocole opératoire, présenté en figure 53, a été mis au point à partir des conditions publiées par Gary et al.^{26, 27} à savoir:

la 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine en solution dans l'acétonitrile est placée sous agitation, à -20°C. Une solution équimolaire d'aniline et de DIEA y est alors ajoutée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est ensuite placé sous agitation pendant 1 heure.

La différence apportée aux protocoles déjà utilisés a été de cristalliser le produit par ajout d'eau distillée dans le milieu réactionnel, pour ensuite le filtrer.

Ce protocole a permis la synthèse de 30 dérivés, de structure présentée à la figure 53, dans les tubes d'un carousel de type Radleys, avec des puretés supérieures à 95% et des rendements compris entre 68 et 90%.

Trois exemples des structures obtenues sont présentés à la figure 54.

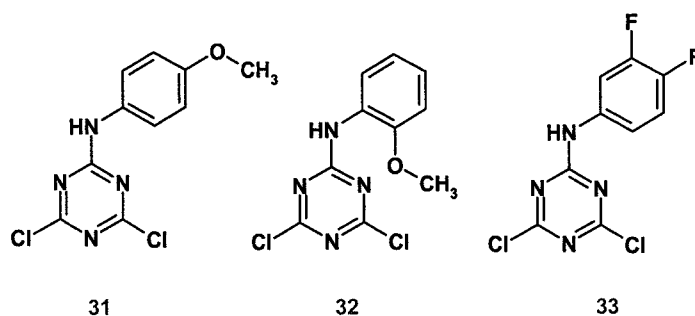


Figure 54. Présentation de 3 dérivés 4,6-dichloro-*N*-phényl-1,3,5-triazin-2-amine synthétisés.

²⁶ Gustafson G. R.; Incorporation of Carbohydrates and Peptides into Large Triazine-Based Screening Libraries Using Automated Parallel Synthesis; *Tetrahedron*, **1998**, *54*, pp 4051-4065.

²⁷ Stankova M., Lebl M.; *Molecular Diversity*, **1996**, *2*, pp 75-80.

La synthèse en plaque 96 puits de 96 dérivés de structure présentée en figure 51, a été réalisée toujours selon une architecture 4x24 (figure 46) en suivant le protocole décrit ci-dessous :

- mise en solution dans le dichlorométhane de 23 dérivés triazine (plus un tube sans réactif).
- mise en solution des 4 monomères Boc-Lys-Tic-CN **30b**, Boc-Orn-Tic-CN **30a**, Boc-Lys-Xxx-CN et Boc-Orn-Xxx-CN dans le dichlorométhane en présence d'un équivalent de triéthylamine.
- couplage par substitution nucléophile aromatique à température ambiante.
- évaporation.
- déprotection de l'amine en α des acides aminés en position P2, par ajout d'une solution d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane.
- évaporation.
- préparation des plaques filles.

5.2. Résultats enzymatiques et conclusion.

Les résultats enzymatiques ont permis de constater que l'insertion d'une chaîne aliphatique possédant un noyau hydrophobe de type 6-chloro-*N*-phényl-1,3,5-triazine-2,4-diamine permettait dans les deux cas (dipeptide Tic et dipeptide Xxx) d'accroître l'activité des inhibiteurs. Les inhibiteurs comportant un fragment Tic possèdent des IC₅₀ de l'ordre de 1 μ M. Cela nous avait conduit à émettre deux hypothèses, qui ont été vérifiées au moyen de la structure radiocristallographique de l'enzyme:

- La poche du site S2 semble tolérer des noyaux lipophiles volumineux.
- Le site catalytique de l'enzyme ne permet pas un positionnement optimal du noyau Tic en P1 et la présentation du carbone électrophile de la liaison CN à une distance optimale de la sérine 630.

Cette dernière observation peut s'expliquer par modélisation moléculaire:

- Dans un premier temps nous avons remplacé le noyau pyrrolidine du dipeptide Val-Pyr (cocristallisé avec l'enzyme) par un noyau tétrahydroquinoléine, puis nous l'avons replacé dans le site catalytique (figure 55) sans réaliser de minimisation énergétique de l'ensemble.

Nous pouvons constater que le noyau aromatique de la tétrahydroisoquinoléine ne peut se positionner dans ces conditions sans occasionner une répulsion des noyaux aromatiques hydrophobes des résidus Trp 659, Tyr 662 et Tyr 666, provoquant un changement de conformation de la cavité du site actif de l'enzyme (figure 55).

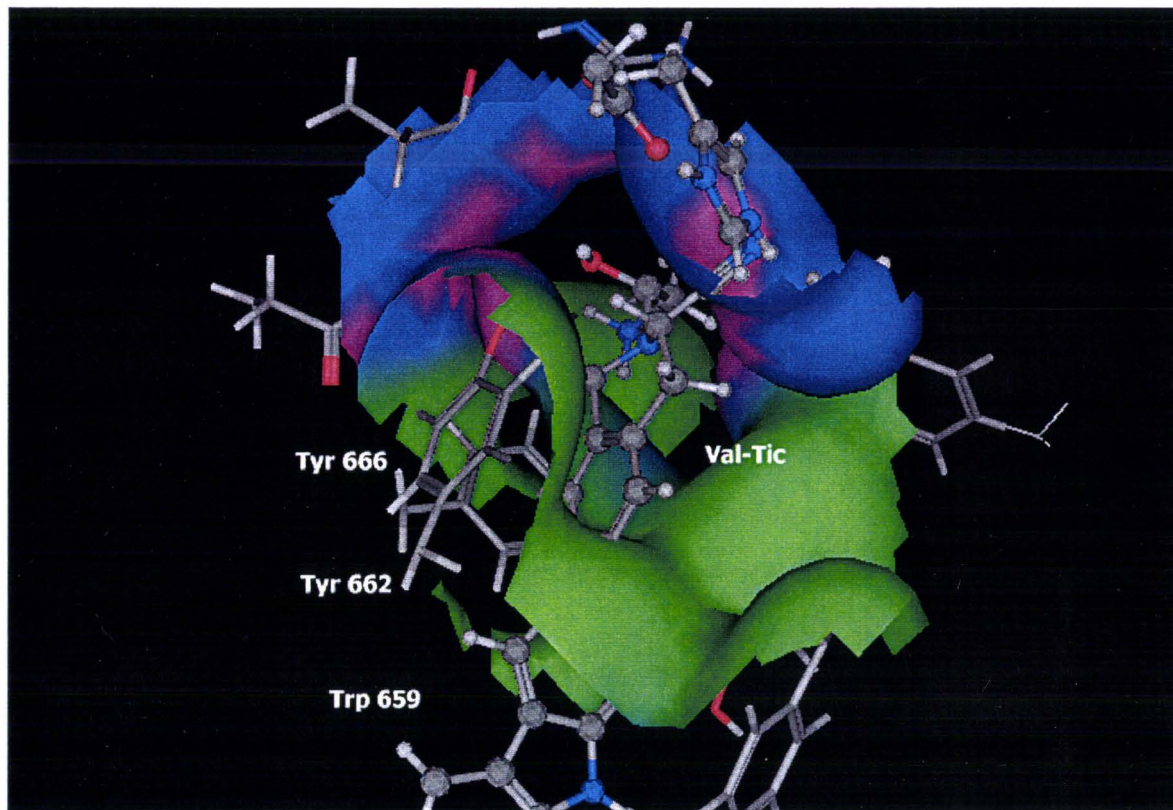


Figure 55. Représentation du dipeptide Val-Tic dans le site actif de l'enzyme. La surface représentée en vert est la surface hydrophobe de la poche, et en bleu est représentée la surface hydrophile.

- Dans un second temps, la minimisation du dipeptide Val-Tic-CN au sein du site actif de l'enzyme montre que le carbone électrophile de la fonction nitrile se retrouve éloigné de la sérine 630 d'une distance voisine de 3 Å, distance qui diminue la probabilité de la formation d'un complexe covalent enzyme substrat (figure 56).

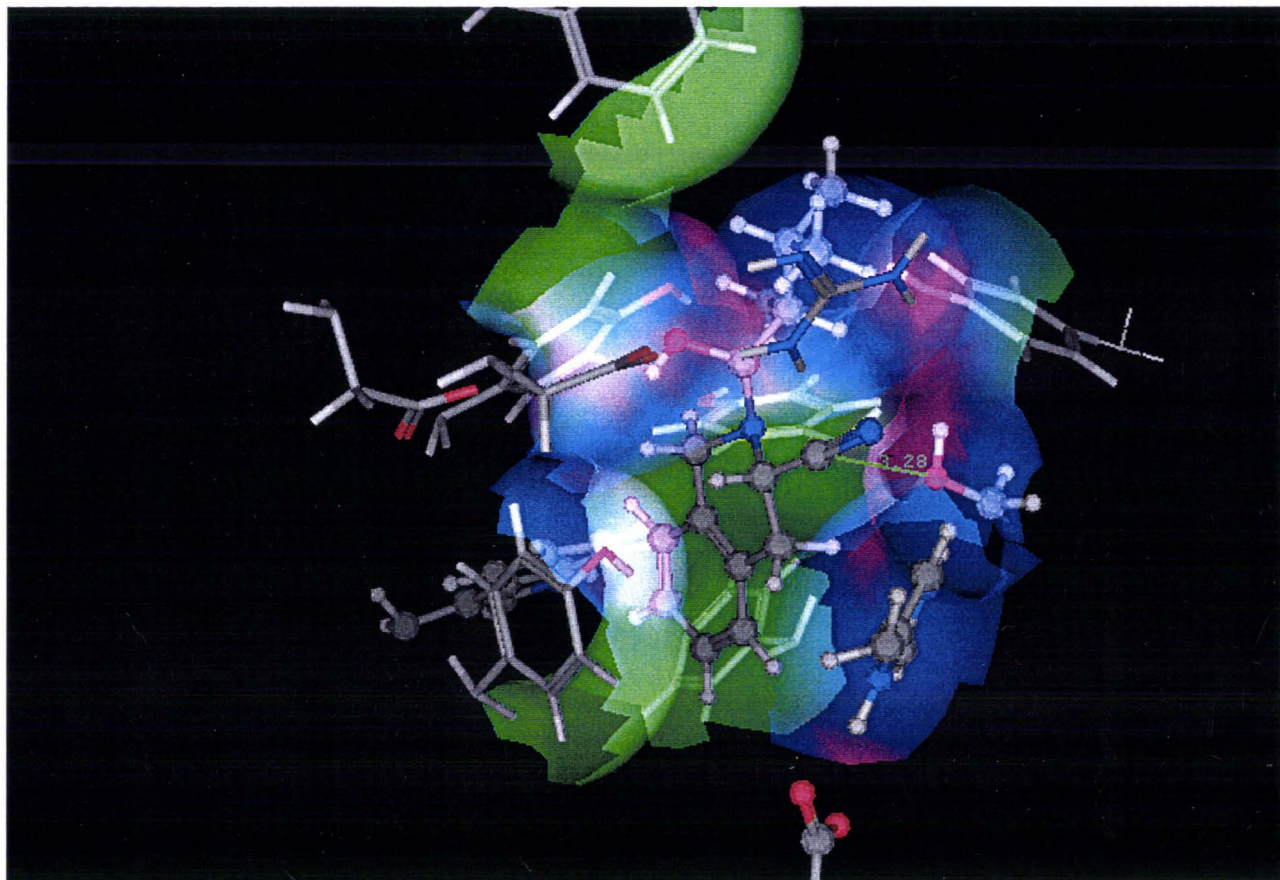


Figure 56. Représentation du dipeptide Val-Tic-CN dans le site actif de l'enzyme.

De toutes ces observations, il ressort que l'incorporation d'un noyau Tic en position P1 ne permet pas d'augmenter notablement l'activité de tels inhibiteurs et ce malgré l'incorporation, sur la chaîne latérale du résidu en position P2, de fragments lipophiles.

Ces résultats mettent en évidence l'intérêt des expériences de cocrystallisation enzyme-substrat lors des phases d'optimisation. En effet, si nous avions disposé de ces informations au début du projet, nous n'aurions probablement pas tenté l'incorporation du noyau Tic en position P1.



Pergamon

Tetrahedron 58 (2002) 5741–5746

TETRAHEDRON

Solid and solution phase syntheses of the 2-cyanopyrrolidide DPP-IV inhibitor NVP-DPP728

Nicolas Willand,^a Jurgen Joossens,^a Jean-Claude Gesquière,^a André L. Tartar,^a D. Michael Evans^b
and Michael B. Roe^{b,*}

^aLaboratoire de chimie organique, UMR 8525, Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, 3 rue du Pr. Laguesse, F-59006 Lille Cedex, France

^bFerring Research Limited, Chilworth Research Centre, Southampton SO16 7NP, UK

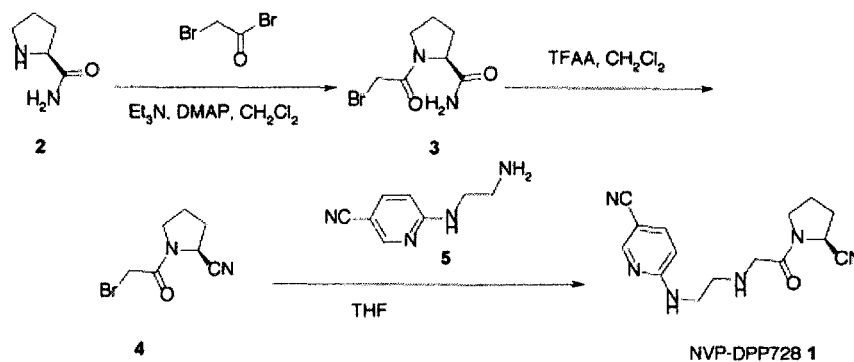
Received 22 January 2002; revised 22 April 2002; accepted 10 May 2002

Abstract—DPP-IV inhibitors have been suggested as potential new treatments for type-II diabetes and 2-cyanopyrrolidides have been reported as potent DPP-IV inhibitors. Alternative synthetic approaches to one such compound, NVP-DPP728, are investigated here. One strategy is based in solution phase and is amenable to scale-up. The other is based on solid phase and is appropriate for the rapid analoging of the structural series. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV, CD26, EC.3.4.14.5) is a membrane-bound and circulating serine protease. It catalyses the hydrolysis of peptides after a penultimate N-terminal proline or alanine residue.¹ One such peptide is glucagon-like peptide-1 (GLP-1). Hence, inhibition of DPP-IV has been suggested as a novel treatment for type-II diabetes.² A series of 2-cyanopyrrolidides has been reported by Ferring Research Limited as very potent inhibitors of DPP-IV.³ More recently one 2-cyanopyrrolidide, NVP-DPP728 **1**, has been reported to increase plasma GLP-1 (7-36 amide) concentrations and improve oral glucose tolerance in obese Zucker rats.⁴ This compound is

in phase II clinical trials as a potential new drug therapy for type-II diabetes.

The preparation of NVP-DPP728 **1** is described in Scheme 1.⁵ In our hands, this procedure gave a very poor yield. This is mainly due to the number of reactive amine functional groups present in both the starting substrate **5** and in the product **1**. Therefore, we investigated alternative routes that would avoid formation of by-products and/or allow easier preparation of analogues. We have developed two different strategies to the synthesis of NVP-DPP728 **1**. One makes use of an original protection and deprotection



Scheme 1. The solution phase synthesis of NVP-DPP728 as reported in patent application WO 98/19998.⁵

Keywords: NVP-DPP728; DPP-IV inhibitor; cyanopyrrolidide.

* Corresponding author. Tel.: +44-23-8076-3400; fax: +44-23-8076-6253; e-mail: michael.roe@fering-research.co.uk

0040-4020/02/\$ - see front matter © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.
PII: S0040-4020(02)00536-7

strategy. This is a solution phase synthesis and is suitable for scale-up. The other, performed on solid phase, is amenable to the fast preparation of structural analogues.⁶

1. Solution phase strategy

The major drawback of the existing synthesis is the presence of several nucleophilic groups during the alkylation step. In selecting an appropriate protection of the reactive amine functionalities, an important consideration is the susceptibility for cyclisation under strongly basic conditions. Nucleophilic attack by the secondary amine onto the nitrile in **1** affords a six-membered cyclic amidine that can hydrolyse to a diketopiperazine. Under non-basic conditions, the secondary amine is less prone to cyclisation. Depending on the example or the conditions employed, amino acid 2-cyanopyrrolidides demonstrate half-lives greater than 24 h.^{3,7} Therefore, we were prompted to investigate protecting groups that may be removed under neutral or acidic conditions.

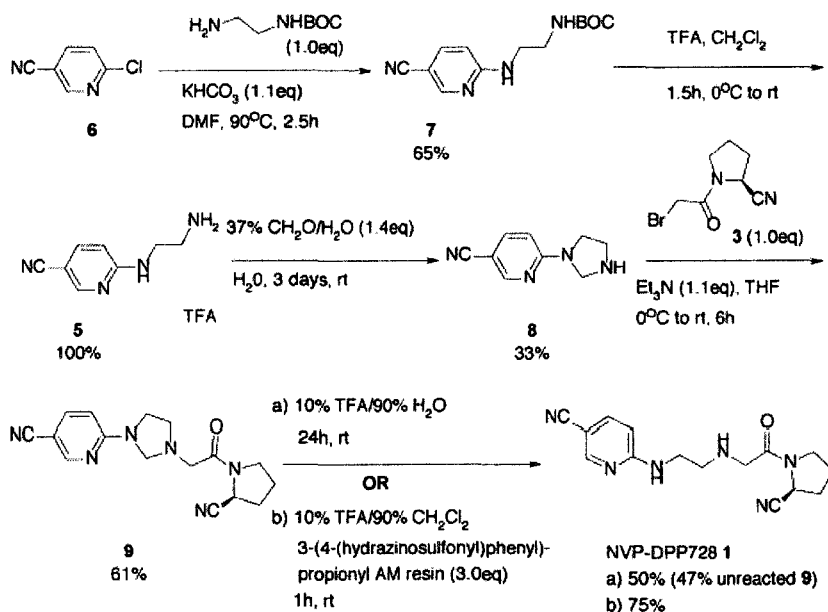
We were attracted by a strategy used for the selective protection of spermidine derivatives.⁸ This involved the condensation of spermidine with formaldehyde yielding a cyclic product. In this way, the primary amino group is converted to a secondary amine, while the secondary amine is converted to a tertiary amine. Subsequent removal of the methylene group was carried out with malonic acid and pyridine in methanol. Scheme 2 shows the synthetic route to NVP-DPP728 **1** using a strategy similar to this. The amine·TFA salt **5** was prepared according to Scheme 2 and condensed with aqueous formaldehyde solution. This proceeded smoothly to yield the cyclic formaldehyde adduct **8**·TFA salt which was isolated by crystallisation from a 1:1 mixture of diethyl ether and ethanol. Although the yield of

the crystallisation remains to be optimised, the chemistry is convenient to carry out and is amenable to scale-up. The free base of **8** was liberated and coupled to bromide **3** to give **9** in 61% yield. It was necessary to remove the formaldehyde group. The literature precedent was unsuitable because the high polarity of the product made isolation from malonic acid and pyridine difficult.⁸ Instead, because of the reversibility of the formaldehyde condensation under aqueous conditions, it was hypothesised that simple acid catalysed hydrolysis under dilute conditions would be sufficient. Therefore, the formaldehyde adduct **9** was dissolved in a 10% TFA (aq.) solution and stirred for 24 h. Basic work-up and flash chromatography afforded the title compound **1** in a 50% yield. The remaining material was identified as unreacted **9**. There was no evidence of intramolecular cyclisation. Under these conditions, the final deprotection step is reversible and an equilibrium mixture is obtained. In order to drive the reaction to completion, high dilution conditions were considered. However, such conditions are not amenable to scale-up. Therefore, we decided to use a supported scavenging reagent. Excess 3-(4-(hydrazinosulfonyl)phenyl)propionyl AM resin was suspended in a solution of intermediate **9** in a mixture of 10% TFA/90% CH₂Cl₂ and stirred for an hour at room temperature.

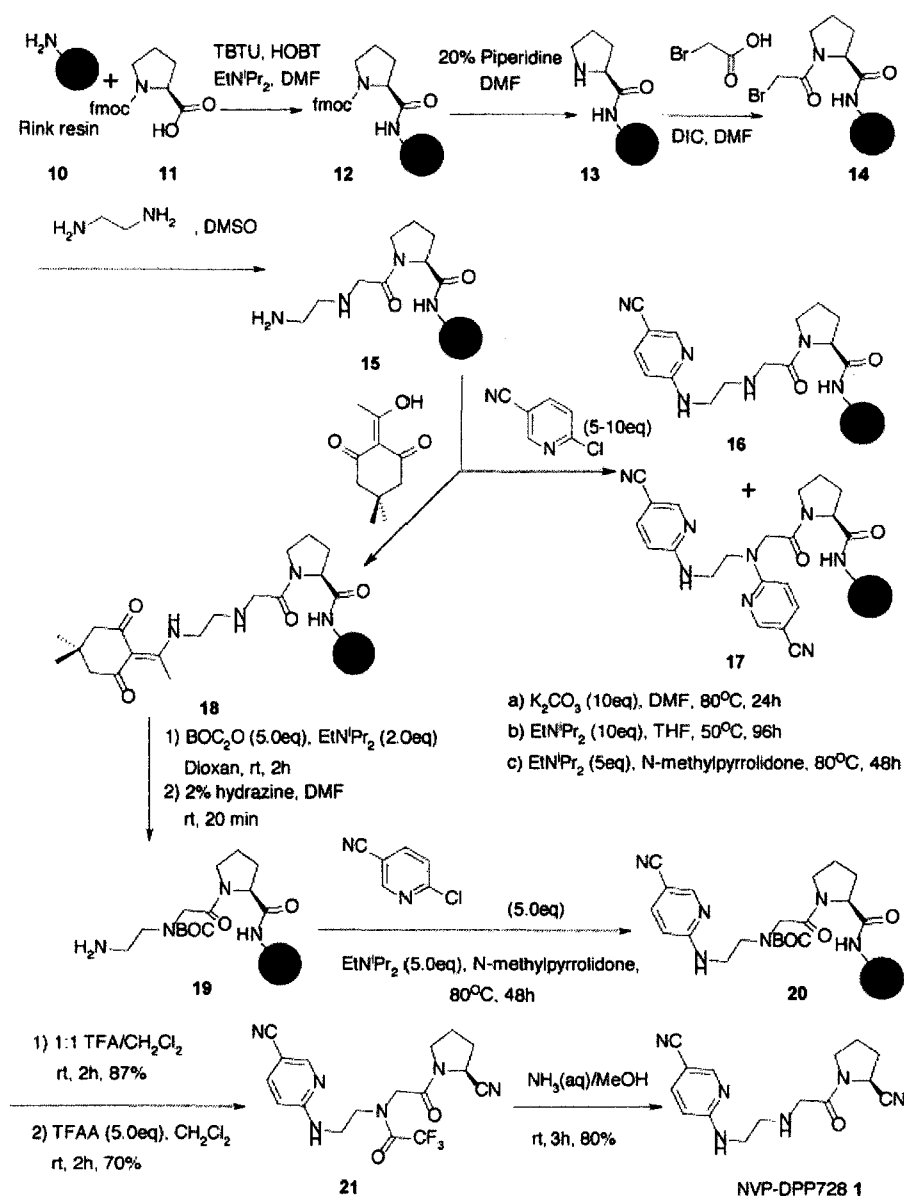
After work-up and chromatography the free base of NVP-DPP728 **1** was obtained in 75% yield. Thus the hydrazone scavenging reagent was successful at improving the yield of the final deprotection step, reducing the reaction time dramatically and eliminating the need for high-dilution conditions.

2. Solid phase strategy

First of all we prepared the Rink resin bound key



Scheme 2. The solution phase preparation of NVP-DPP728 **1** using a formaldehyde derived protecting group.



Scheme 3. The synthesis of NVP-DPP728 1 using a solid phase approach via the key BOC protected intermediate 8.

intermediate 15 in high yield using similar chemistry to that already reported (Scheme 3).⁶ This would allow rapid derivatisation of the primary amino group. Our initial attempts to exemplify this with the preparation of NVP-DPP728 were not successful. Scheme 3 illustrates three different sets of experimental conditions, all employing a large excess of 6-chloronicotinonitrile 6 (10 equiv.). Using potassium carbonate as base gave no reaction products. Using diisopropylethylamine in either THF or *N*-methylpyrrolidone yielded mixtures of the required product 16 and the double addition product 17 as well as other unidentified products. This led us to investigate a protecting

group strategy that would allow specific addition of 6-chloronicotinonitrile 6 and other electrophiles to the terminal nitrogen under forcing conditions. Initial attempts to use formaldehyde, as in the solution phase synthesis, proved unsuccessful. Complex mixtures were obtained after cleavage from the resin. Accordingly, 2-acetyl-dimedone was added in DMF to the resin 15 to afford the Dde protected primary amine.⁹ Addition of BOC anhydride followed by deprotection of the Dde group with hydrazine in DMF afforded the BOC protected compound 19. 6-Chloronicotinonitrile 6 was added to the terminal amine under forcing conditions (48 h at 80°C). After cleavage

from the resin and concomitant removal of the BOC group, the carboxamide was dehydrated under standard conditions. All steps in the solid phase synthesis proceeded cleanly such that ^1H NMR showed the crude material obtained upon cleavage from the resin and dehydration to be predominantly the required trifluoroacetamide **21**. After chromatography, treatment with methanolic ammonia afforded the free base of NVP-DPP728 **1**. This procedure illustrates an orthogonal protecting group strategy that affords the BOC protected resin bound intermediate **19**. This is a common intermediate that may be utilized for the rapid analoging of the terminal N-substituent using large sets of acylating and alkylating agents.

3. Summary

We have presented two new chemistries for the preparation of NVP-DPP728 **1**. The solid phase approach utilises an orthogonal protecting group strategy to afford a BOC protected intermediate. This may be used to prepare the title compound or may be used as a common intermediate for the rapid synthesis of a series of compounds for SAR analysis. Complementary to this, the solution phase approach utilises a new and efficient protecting group strategy that is amenable to scale-up. Considering the perceived importance of DPP-IV inhibitors in the field of diabetes these chemistries will be of benefit to any groups active in the field.

4. Experimental

4.1. Data for compounds

4.1.1. *tert*-Butyl (2-(5-cyano-2-pyridylamino)ethyl)carbamate (7). A solution of 6-chloronicotinonitrile (**6**) (21.7 g, 160 mmol), potassium hydrogen carbonate (17.6 g, 176 mmol) and *tert*-butyl (2-aminoethyl)carbamate (25.8 g, 160 mmol) in DMF (80 ml) was heated to 90°C under N_2 for 2.5 h. The mixture was cooled, added to saturated NaHCO_3 solution and extracted with EtOAc. The organic phase was dried over Na_2SO_4 and concentrated in vacuo until the product started to precipitate. Further product was precipitated by adding petroleum ether. The combined precipitates were collected and washed with cold EtOAc to afford *tert*-butyl (2-(5-cyano-2-pyridylamino)ethyl)carbamate **7** (27.2 g, 65%) as a white solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): δ 1.41 (9H, s), 3.30–3.42 (2H, m), 3.44–3.56 (2H, m), 4.92 (1H, br s), 5.72 (1H, br s), 6.39 (1H, dd, $J=8.9$, 0.7 Hz), 7.51 (1H, dd, $J=8.9$, 2.2 Hz), 8.30–8.36 (1H, m) ppm.

4.1.2. 6-(2-Aminoethylamino)nicotinonitrile trifluoroacetate (5). Trifluoroacetic acid (125 ml) was added to an ice-cold stirred suspension of *tert*-butyl (2-(5-cyano-2-pyridylamino)ethyl)carbamate **7** (32.0 g, 120 mmol) in CH_2Cl_2 (125 ml) to give a clear solution. After gas evolution had ceased, the cooling bath was removed. After 1.5 h the mixture was concentrated in vacuo and azeotroped with toluene three times to afford 6-(2-aminoethylamino)nicotinonitrile trifluoroacetate **5**. The yield was assumed

to be quantitative and the material was used directly in the next step.

4.1.3. 6-Imidazolidin-1-yl-nicotinonitrile (8). 6-(2-Aminoethylamino)nicotinonitrile trifluoroacetate **5** (120 mmol) was dissolved in water (1300 ml). Aqueous 37% formaldehyde solution (15.5 g, 12.5 ml, 168 mmol) was added and the mixture was stirred for 3 days. The mixture was concentrated then azeotroped with toluene twice and with petroleum ether once. The residue was taken up in $\text{Et}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (50:50, 200 ml) and scratched to initiate crystallisation. The mixture was cooled in an ice/water bath for 4 h and filtered to afford 6-imidazolidin-1-yl-nicotinonitrile trifluoroacetate (11.4 g) as a pale yellow crystalline solid. ^1H NMR (d_6 -DMSO, 270 MHz): δ 3.58–3.78 (4H, m), 4.75 (2H, s), 6.78 (1H, d, $J=8.9$ Hz), 8.01 (1H, dd, $J=2.2$, 8.9 Hz), 8.58 (1H, d, $J=2.2$ Hz) ppm. This was dissolved in water and saturated NaHCO_3 solution was added until the solution was basic. The mixture was extracted with CH_2Cl_2 four times and the combined organic extracts were dried over Na_2SO_4 and concentrated in vacuo to afford 6-imidazolidin-1-yl-nicotinonitrile free base **8** (6.7 g, 33%) as a yellow oil. ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): δ 3.26–3.48 (4H, m), 4.46 (2H, s), 6.28 (1H, d, $J=8.7$ Hz), 7.57 (1H, dd, $J=2.2$, 8.7 Hz), 8.37 (1H, d, $J=2.2$ Hz) ppm.

4.1.4. 6-{3-[2-(2-*S*-Cyanopyrrolidin-1-yl)-2-oxo-ethyl]-imidazolidin-1-yl}-nicotinonitrile (9). A solution of (2*S*)-1-(bromoacetyl)pyrrolidine-2-carbonitrile **3**⁵ (3.94 g, 18.1 mmol) in THF (20 ml) was added to an ice-cold solution of 6-imidazolidin-1-yl-nicotinonitrile **8** (3.16 g, 18.1 mmol) and triethylamine (2.8 ml, 2.0 g, 20 mmol) in THF (20 ml) over 3 min. The resulting cloudy mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 6 h. The mixture was added to dilute NaHCO_3 solution and extracted with CH_2Cl_2 four times. The combined organic extracts were dried over Na_2SO_4 and concentrated in vacuo. Flash chromatography on silica gel (2.5% MeOH/97.5% CH_2Cl_2) afforded 6-{3-[2-(2-*S*-cyanopyrrolidin-1-yl)-2-oxo-ethyl]-imidazolidin-1-yl}-nicotinonitrile **9** (3.4 g, 61%) as a white foam. ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): δ 2.04–2.42 (4H, m), 3.18 (2H, t, $J=6.7$ Hz), 3.34–3.76 (6H, m) 4.26–4.42 (2H, m), 4.74–4.80 and 4.95–5.04 (total 1H in the ratio 3:1, each m), 6.30 (1H, d, $J=8.9$ Hz), 7.60 (1H, dd, $J=2.0$, 8.9 Hz), 8.38 (1H, d, $J=2.0$ Hz) ppm. MS (ESI) m/z 311.0 (MH^+).

4.1.5. (6-{2-[2-(2-*S*-Cyanopyrrolidin-1-yl)-2-oxo-ethylamino]-ethylamino}-nicotinonitrile (1), by removal of formaldehyde group using aqueous trifluoroacetic acid. A solution of 6-{3-[2-(2-*S*-cyanopyrrolidin-1-yl)-2-oxo-ethyl]-imidazolidin-1-yl}-nicotinonitrile **9** (3.15 g, 10.2 mmol) in 10% trifluoroacetic acid (250 ml) was stirred for 24 h. The mixture was cooled in an ice/water bath and potassium carbonate was added cautiously until saturated, then extracted with CH_2Cl_2 seven times. The combined extracts were dried over Na_2SO_4 and concentrated in vacuo. Flash chromatography on silica gel (10% MeOH/90% CH_2Cl_2) afforded (6-{2-[2-(2-*S*-cyanopyrrolidin-1-yl)-2-oxo-ethylamino]-ethylamino}-nicotinonitrile **1** (1.53 g, 50%) as a colourless gum. ^1H NMR at 25°C was consistent with the presence of two rotameric isomers in a ratio of ~85:15. ^1H NMR (d_6 -DMSO, 270 MHz): δ 1.84–2.30

(4H, m), 2.71 (2H, t, $J=6.2$ Hz), 3.22–3.48 (5H, m), 3.50–3.66 (1H, m), 4.73 and 5.13 (1H, ratio ~85:15, dd, $J=4.7$, 6.4 Hz and dd, $J=2.5$, 6.7 Hz), 6.56 (1H, d, $J=8.9$ Hz), 7.50–7.72 (2H, m), 8.36 (1H, d, $J=2.0$ Hz) ppm. At higher temperatures, the NMR signals of the two compounds appeared to coalesce as is typical of rotameric isomers. ^1H NMR (d_6 -DMSO, 270 MHz): δ 1.98–2.30 (4H, m), 2.77 (2H, t, $J=6.2$ Hz), 3.30–3.62 (6H, m), 4.62–4.88 (1H, m), 6.57 (1H, d, $J=8.9$ Hz), 7.26 (1H, br s), 7.61 (1H, dd, $J=2.2$, 8.9 Hz), 8.33 (1H, d, $J=2.2$ Hz) ppm.

4.1.6. (6-{2-[2-(2-*S*-Cyanopyrrolidin-1-yl)-2-oxo-ethylamino]-ethylamino}-nicotinonitrile (1), by removal of formaldehyde group using solid supported reagent. 6-{3-[2-(2-*S*-Cyanopyrrolidin-1-yl)-2-oxo-ethyl]-imidazolidin-1-yl}-nicotinonitrile **9** (223 mg, 0.72 mmol) and 3-(4-(hydrazinosulfonyl)phenyl) propionyl AM resin (1.3 g, 1.9 mmol) were dissolved in CH_2Cl_2 (20 ml). Trifluoroacetic acid (3 ml) was added and the reaction was stirred at room temperature for 1 h. The organic layer was filtered and the resin was washed with CH_2Cl_2 (100 ml) and EtOH (200 ml). The combined organic layers were evaporated in vacuo. The residue was dissolved in CH_2Cl_2 (100 ml) and washed with potassium carbonate solution (30 ml). The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 three times and the combined organic layers were evaporated in vacuo. Flash chromatography on silica gel (90% $\text{CH}_2\text{Cl}_2/10\%$ MeOH and 80% $\text{CH}_2\text{Cl}_2/20\%$ MeOH) afforded (6-{2-[2-(2-*S*-cyanopyrrolidin-1-yl)-2-oxo-ethylamino]-ethylamino}-nicotinonitrile **1** (162 mg, 75%) as a colourless gum. ^1H NMR data was identical to that obtained by the aqueous trifluoroacetic acid route above.

4.1.7. (6-{2-[2-(2-*S*-Cyanopyrrolidin-1-yl)-2-oxo-ethylamino]-ethylamino}-nicotinonitrile (1), hydrochloride salt. 4N HCl/dioxan (1.3 ml, 5.1 mmol) was added to a solution of (6-{2-[2-(2-*S*-cyanopyrrolidin-1-yl)-2-oxo-ethylamino]-ethylamino}-nicotinonitrile **1** (1.53 g, 5.13 mmol) to afford a white precipitate. The solid was filtered, washed and triturated with Et_2O and dried in vacuo over P_2O_5 to (6-{2-[2-(2-*S*-cyanopyrrolidin-1-yl)-2-oxo-ethylamino]-ethylamino}-nicotinonitrile **1** hydrochloride salt (1.40 g, 82%) as a white powder. ^1H NMR (d_6 -DMSO, 270 MHz): δ 1.88–2.30 (4H, m), 3.13 (2H, s), 3.32–3.50 (1H, m), 3.52–3.98 (4H, m), 4.00–4.22 (1H, m), 4.84 (1H, t, $J=5.6$ Hz), 6.64 (1H, d, $J=8.9$ Hz), 7.76 (1H, dd, $J=8.9$, 2.1 Hz), 8.00 (1H, br s), 8.43 (1H, d, $J=2.1$ Hz), 9.25 (2H, br s) ppm. ^{13}C NMR (D_2O , 68 MHz): δ 24.7, 29.6, 38.2, 46.3, 47.0, 47.1, 48.2, 97.3, 111.5, 117.9, 118.7, 141.6, 149.5, 156.8, 165.0 ppm. MS (ESI) m/z 299 (MH^+ , 100%). An analytical sample was recrystallised from MeOH, mp 158–163°C (reported mp from WO98/19998, example no. 3=155–157°C).⁴

4.1.8. L-Pro-resin (13). Rink amide resin **10** (5 g, 0.47 mmol/g, 2.4 mmol) was shaken at room temperature with a 20% piperidine solution in DMF (50 ml) for 5 min. The mixture was filtered and shaken with 20% piperidine in DMF (50 ml) for another 20 min. The resin was then washed sequentially with DMF, CH_2Cl_2 and DMF. TBTU (1.9 g, 5.9 mmol), HOBT (0.79 g, 5.9 mmol) and Et_3NPr_2 (3.0 ml, 17 mmol) were added to a solution of Fmoc-L-Proline (2.0 g, 5.9 mmol) in DMF (30 ml). The resulting

yellow solution was shaken at 0°C for 30 min then added to the resin. The reaction was shaken for 3 h at 20°C until a ninhydrin test was negative. Washing sequentially with DMF, CH_2Cl_2 and DMF afforded Fmoc-L-Pro-resin **12**. Resin **12** was then shaken at room temperature with a 20% piperidine solution in DMF (50 ml) for 5 min. The mixture was filtered and shaken with 20% piperidine in DMF (50 ml) for another 20 min. Washing sequentially with DMF, CH_2Cl_2 and DMF afforded L-Pro-resin **13** which was used directly in the next step. A few beads of the resin **13** were cleaved with trifluoroacetic acid to afford L-Pro- NH_2 . MS (ESI) m/z 115 (MH^+ , 100%).

4.1.9. N-Bromoacetyl-L-Pro-resin (14). A solution of bromoacetic acid (3.3 g, 24 mmol) in DMF (30 ml) was added to L-Pro-resin **13** (2.4 mmol) followed by a solution of DIC (4.8 ml, 3.9 g, 31 mmol) in DMF (5 ml) and the mixture was shaken at room temperature for 30 min. The resin was filtered and the procedure repeated once. Washing sequentially with DMF, CH_2Cl_2 and DMF afforded N-bromoacetyl-L-Pro-resin **14** which was used directly in the next step. A few beads of the resin **14** were cleaved with trifluoroacetic acid to afford N-bromoacetyl-L-Pro- NH_2 . MS (ESI) m/z 236 (MH^+ , 100%).

4.1.10. N-(2-Aminoethyl)-Gly-L-Pro-resin (15). A solution of ethylenediamine (2.3 ml, 2.1 g, 35 mmol) in DMSO (30 ml) was added to the resin **14** (2.4 mmol) and the mixture was shaken for 2 h. Washing sequentially with DMF, CH_2Cl_2 and DMF afforded N-(2-aminoethyl)-Gly-L-Pro-resin **15** which was used directly in the next step. A few beads of the resin **15** were cleaved with trifluoroacetic acid to afford N-(2-aminoethyl)-Gly-L-Pro- NH_2 . MS (ESI) m/z 215 (MH^+ , 100%).

4.1.11. N-(N-[1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-ethylamino]-2-aminoethyl)-Gly-L-Pro-resin (18). A solution of 2-acetyldimedone (0.69 g, 3.8 mmol) in DMF (10 ml) was added to a proportion of the resin **15** (5.1 g, 1.9 mmol) in DMF (20 ml). The mixture was shaken at room temperature for 3 h until a negative ninhydrin test. Washing sequentially with DMF, CH_2Cl_2 and DMF afforded N-(N-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-ethylamino]-2-aminoethyl)-Gly-L-Pro-resin **18** which was used directly in the next step. A few beads of the resin **18** were cleaved with trifluoroacetic acid to afford N-(N-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-ethylamino]-2-aminoethyl)-Gly-L-Pro- NH_2 trifluoroacetate salt. ^1H NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz): δ 0.99 (6H, s), 1.82–2.06 (4H, m), 2.29 (4H, s), 2.50 (3H, s), 3.15–3.23 (2H, m), 3.40–3.50 (2H, m), 3.73–3.81 (2H, m), 4.03 (2H, s), 4.26 (1H, m), 4.50 (2H, s), 9.00 (2H, s), 13.13–13.21 (1H, m) ppm. MS (ESI) m/z 379 (MH^+ , 100%).

4.1.12. N-(2-Aminoethyl)-Boc-Gly-L-Pro-resin (19). A solution of di-*tert*-butyl dicarbonate (2.0 g, 9.2 mmol) and Et_3NPr_2 (0.65 ml, 3.8 mmol) in dioxan (30 ml) was added to resin **18** (1.9 mmol) in dioxan (10 ml). The reaction was shaken for 2 h at room temperature. The resulting resin was washed sequentially with DMF, CH_2Cl_2 and DMF. The resin was treated with 2% hydrazine/DMF solution under continuous flow conditions (3 ml/min) for 20 min. Washing sequentially with DMF, CH_2Cl_2 and DMF

afforded *N*-(2-aminoethyl)-Boc-Gly-L-Pro-NH₂ resin **19** which was used directly in the next step.

4.1.13. *N*-(*N*-[5-Cyanopyridin-2-yl]-2-aminoethyl)-Boc-Gly-L-Pro-resin (20**).** 6-Chloronicotinonitrile (1.3 g, 9.5 mmol) and EtN⁺Pr₂⁻ (1.6 ml, 1.2 g, 9.5 mmol) were added to the resin **19** (1.9 mmol) in *N*-methylpyrrolidinone (30 ml). The mixture was heated at 80°C and shaken for 48 h. Washing sequentially with DMF, CH₂Cl₂ and DMF afforded *N*-(*N*-[5-cyanopyridin-2-yl]-2-aminoethyl)-Boc-Gly-L-Pro-resin **20** which was used directly in the next step.

4.1.14. *N*-[2-(5-Cyanopyridin-2-ylamino)-ethyl]-*N*-[2-(2-*S*-cyanopyrrolidin-1-yl)-2-oxo-ethyl]-acetamide (21**).** The resin **20** (1.9 mmol) was added to a mixture of trifluoroacetic acid and CH₂Cl₂ (1:1) solution and stirred for 2 h at room temperature. The supernatant was added to Et₂O to precipitate 1-[2-[2-(5-cyanopyridin-2-ylamino)-ethylamino]-acetyl]-pyrrolidine-2-*S*-carboxylic acid amide trifluoroacetate salt (0.70 g, 87%). ¹H NMR (d₆-DMSO, 300 MHz): δ 1.82–2.05 (4H, m), 3.08–3.16 (2H, m), 3.40–3.50 (2H, m), 3.59–3.67 (2H, m), 4.02 (2H, s), 4.22–4.30 (1H, m), 5.40 (2H, s), 6.60 (1H, d, *J*=8.8 Hz), 7.74 (1H, dd, *J*=8.8, 2.1 Hz), 7.81 (1H, s), 8.42 (1H, d, *J*=2.1 Hz), 9.00 (2H, s) ppm. MS (ESI) *m/z* 317 (MH⁺, 100%). This precipitate (0.54 g, 1.3 mmol) was dissolved in anhydrous THF (25 ml) at 0°C. Trifluoroacetic anhydride (0.88 ml, 6.3 mmol) was added. The reaction was stirred at 0°C for 2 h. The solvent was removed under vacuum. Flash chromatography on silica gel (2% MeOH/98% CH₂Cl₂ and 5% MeOH/95% CH₂Cl₂) afforded *N*-[2-(5-cyanopyridin-2-ylamino)-ethyl]-*N*-[2-(2-*S*-cyanopyrrolidin-1-yl)-2-oxo-ethyl]-acetamide **21** as a white solid (0.35 g, 70%). ¹H NMR (d₆-DMSO, 300 MHz) δ 1.82–2.05 (4H, m), 3.40–3.50 (2H, m), 3.59–3.67 (2H, m), 4.06–4.14 (2H, m), 4.29 (2H, s), 4.68–4.76 (1H, m), 6.60 (1H, d, *J*=8.8 Hz), 7.74 (1H, dd, *J*=8.8, 2.1 Hz), 7.81 (1H, s), 8.42 (1H, d, *J*=2.1 Hz) ppm. MS (ESI) *m/z* 395 (MH⁺, 100%).

4.1.15. (6-[2-[2-(2-*S*-Cyanopyrrolidin-1-yl)-2-oxo-ethylamino]-ethylamino]-nicotinonitrile (1**), by removal of trifluoroacetyl group.** Aqueous ammonia solution (33%, 0.50 ml) was added to a solution of *N*-[2-(5-cyanopyridin-2-ylamino)-ethyl]-*N*-[2-(2-*S*-cyanopyrrolidin-1-yl)-2-oxo-

ethyl]-acetamide **21** (20 mg, 0.05 mmol) in CH₂Cl₂ (2 ml). The reaction was stirred for 3 h. The solvent was removed under vacuum to give (6-[2-[2-(2-*S*-cyanopyrrolidin-1-yl)-2-oxo-ethylamino]-ethylamino]-nicotinonitrile **1** as a colourless gum (12 mg, 80%). Analytical data (¹H, ¹³C NMR and MS) for this free base and after conversion to the hydrochloride salt were identical to those obtained from the solution phase synthesis.

References

- Mentlein, R. *Regul. Pept.* **1999**, *85*, 9–24.
- Deacon, C. F.; Nauck, M. A.; Toft-Nielsen, M.-B.; Pridal, L.; Willms, B.; Holst, J. J. *Diabetes* **1995**, *44*, 1126–1131.
- Ashworth, D. M.; Atrash, B.; Baker, G. R.; Baxter, A. J.; Jenkins, P. D.; Jones, D. M.; Szekce, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1163–1166.
- Balkan, B.; Kwasnik, L.; Miserendino, R.; Holst, J. J.; Li, X. *Diabetologia* **1999**, *42*, 1324–1331.
- Villhauer, E. B. International Patent Application Number PCT/EP97/061255, published as WO98/19998 1998.
- While this work was in progress an oral communication was presented that described the synthesis of NVP-DPP728 on solid phase. It differs from the one reported here in the order that the steps were carried out and in the choice of protecting groups. The published work is amenable to analoging of the ethylene sidechain while the one reported here is more suitable for analoging of the terminal aromatic group. Villhauer, E. B.; Anderson, R. C.; Balkan, B.; Barilla, D.; Brinkman, J. A.; Dunn, E.; Dunning, B.; Graham, E. D.; Gu, H. H.; Gutierrez, C. M.; Hamilton, B. H.; Kwasnik, L. A.; Li, X.; Mangold, B. L.; Maniara, W. M.; Miserendino-Molteni, R.; Mone, M.; Naderi, G. B.; Ramos, K. L.; Russell, M. E.; Rothenberg, P. L.; Tullman, R. H.; Valentin, M.; Walter, R. E.; Weldon, S. C.; Hughes, T. E. *Abstracts of Papers*, #343, 221st National Meeting of the American Chemical Society, San Diego, CA, 2001.
- Hughes, T. E.; Mone, M. D.; Russell, M. E.; Weldon, S. C.; Villhauer, E. B. *Biochemistry* **1999**, *38*, 11597–11603.
- Almeida, M. L. S.; Grehn, L.; Ragnarsson, U. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1988**, 1905–1911.
- Nash, I.; Bycroft, B. W.; Chang, W. C. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2625–2628.

CHAPITRE 2 :

Conception et synthèse d'une chimiothèque focalisée sur la structure d'un antagoniste du récepteur d'une hormone peptidique.

1. INTRODUCTION.

Le GnRH: pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂, découvert en 1971, est un peptide de 10 acides aminés sécrété de manière pulsatile par l'hypothalamus. Il stimule l'anté-hypophyse entraînant la libération des hormones gonadotropes LH et FSH. Ces hormones étant elles-mêmes responsables de la production des hormones stéroïdiennes et de la gamétogénèse.

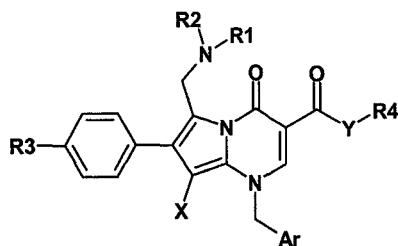
L'utilisation d'agonistes comme d'antagonistes peptidiques du récepteur du GnRH qui permettent d'induire une réduction du niveau des hormones sexuelles, pouvant aller jusqu'à leur suppression totale, a conduit des applications cliniques particulièrement prometteuses. On citera en particulier le cancer de la prostate où l'emploi des superagonistes (et bientôt d'antagonistes) du GnRH ont permis d'atteindre une suppression quasi-totale et prolongée de la production de testostérone, induisant un état de castration biochimique qui ralentit la progression de cette tumeur hormonodépendante.

La biodisponibilité orale de ses analogues peptidiques est très faible, ce qui oblige à recourir à des administrations parentérales.

La découverte d'antagonistes non-peptidiques, actifs par voie orale, est un but poursuivi par de nombreuses firmes pharmaceutiques avec, jusqu'à présent, des succès limités.

Il existe à l'heure actuelle plusieurs classes de composés, antagonistes GnRH, décrits dans la littérature, dont sont représentés ci-dessous quelques exemples représentatifs :

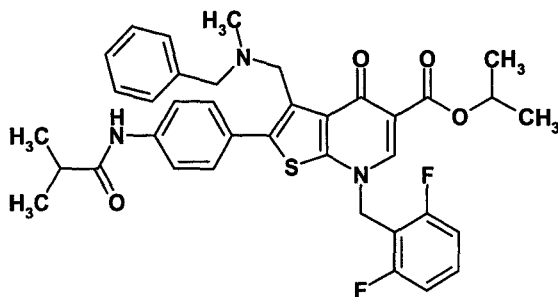
- Les 7-phénylpyrrolo[1,2-a]pyrimid-4-ones développées par Neurocrine Bioscience²⁸



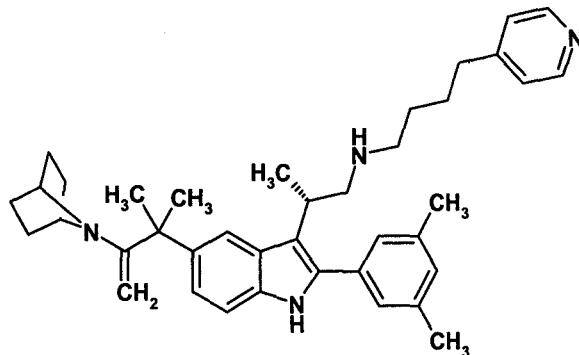
X=CN ou H
Y=NR5 ou O

²⁸ Zhu Y.-F., Struthers R. S., Connors P. J. Jr., Gao Y., Gross T. D., Saunders J., Wilcoxon K., Reinhart G. J., Ling N. and Chen C.; Initial Structure-Activity Relationship Studies of a Novel Series of Pyrrolo[1,2-a]pyrimidin-7-ones as GnRH Receptor Antagonists; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, pp 399-402.

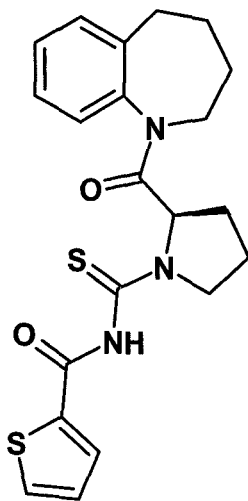
➤ Les dérivés de la thiéno[2,3-b]pyridin-4(7H)-one de Takeda²⁹



➤ Les dérivés 2-arylindoles développés par Merck.³⁰



Un criblage à haut débit, effectué par les chercheurs de Ferring, avait permis d'identifier un premier hit, le composé FE999032, dans un test d'inhibition de la liaison du GnRH à son récepteur.



FE999032

²⁹ Cho N., Harada M., Imaeda T., Imada T., Matsumoto H., Hayase Y., Sasaki S., Furuya S., Suzuki N., Okubo S., Ogi K., Endo S., Onda H., Fujino M.; Discovery of a Novel, Potent, and Orally Active Nonpeptide Antagonist of the Human Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) Receptor; *J. Med. Chem.*, **1998**; *41*, pp 4190-4195.

³⁰ Young J. R., Huang S. X., Walsh T. F., Wyvratt M. J. Jr., Tien Yang Y., Yudkovitz J. B., Cui J., Mount G. R., Ning Ren R. et al.; 2-Arylindoles as gonadotropin releasing hormone (GnRH) antagonists: optimization of the tryptamine side chain; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, pp 827-832.

Selon une stratégie maintenant bien établie, un tel composé est une porte d'entrée vers la préparation d'une série de structure voisine dans le but d'en améliorer la puissance mais également de lui conférer les propriétés de sélectivité, biodisponibilité, stabilité, indispensables pour un médicament.

Ce chapitre a pour but de présenter la stratégie synthétique envisagée et appliquée à la diversification engendrée autour de cette structure menant à la synthèse d'une chimiothèque focalisée de composés, chimiothèque qui a fait l'objet de tests sur la cible afin de mettre en avant de futures têtes de série. Pour des raisons de confidentialité industrielle, les résultats biologiques ne feront pas l'objet de la discussion.

2. SYNTHÈSE D'ANALOGUES DE FE999032.

Avec l'apparition des méthodes de synthèse rapide, la stratégie d'optimisation des composés actifs a considérablement évolué en l'espace de moins d'une décennie.

Plutôt que de suivre un processus itératif, l'approche actuelle consiste à produire et à tester simultanément le plus grand nombre possible de combinaisons des différents éléments de diversité que comporte la structure de départ. La première étape dans la mise en œuvre de cette stratégie est une évaluation des possibilités de diversification du composé de départ telle qu'elle est présentée en figure 57.

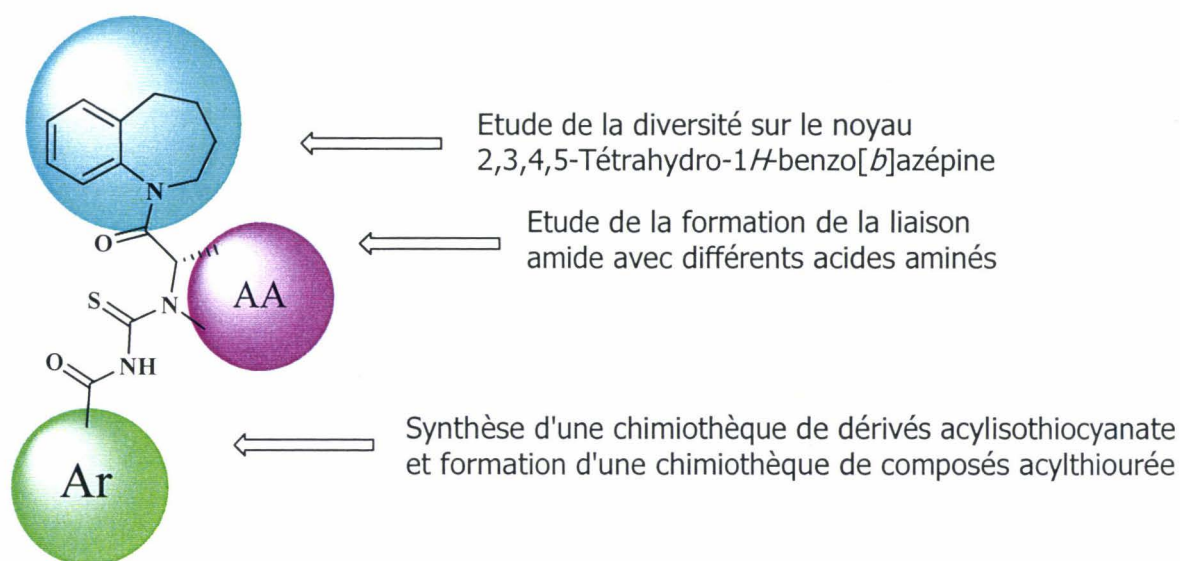


Figure 57. Présentation du squelette de FE999032 et étude des fragments diversifiables.

La molécule FE999032 peut être divisée en trois sous-ensembles :

- Une unité tétrahydrobenzazépine constitue la partie « supérieure » de la molécule. Une diversité structurale au niveau de cette tétrahydrobenzazépine peut être introduite soit sur le noyau aromatique par ajout de substituants de type méthyle, méthoxy, halogénure, nitrile, soit sur la partie cyclique aliphatique par introduction d'un hétéroatome et / ou par ajout de substituants.
- Un acide aminé, alkylé sur le carbone en position α de la fonction acide carboxylique et substitué sur sa fonction aminée par un groupement alkyle constitue la partie centrale de la molécule. Ces deux exigences peuvent être satisfaites simultanément dans le cas de dérivés cycliques comme la proline.
- Le troisième sous-ensemble est constitué d'une acylthiourée, formée par réaction de l'amine de l'acide aminé sur un acylacylisothiocyanate. Il est également envisageable d'incorporer à cet emplacement toute fonctionnalité susceptible de réagir avec l'amine de l'acide aminé. (dérivés de la triazine, chlorures d'acide...).

2.1. Synthèse d'analogues de la 2,3,4,5-tétrahydro-1H-benzazépine.

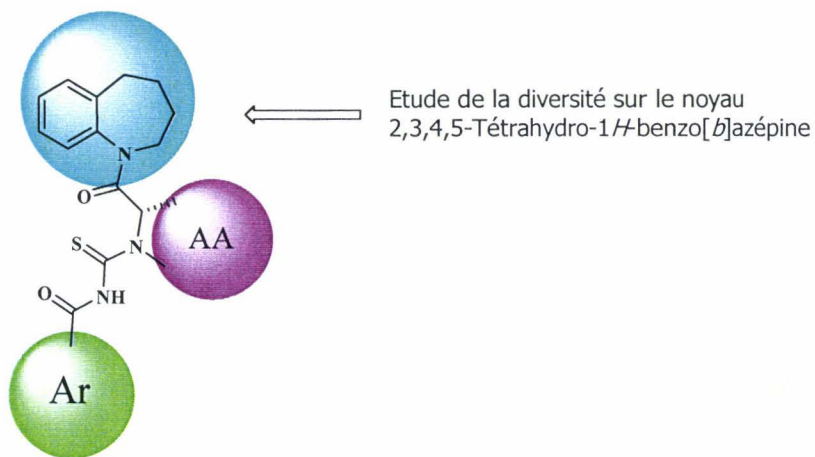


Figure 58. Etude de la diversité sur le noyau tétrahydrobenzazépine.

Dans un premier temps, la synthèse de dérivés de la tétrahydrobenzazépine a été envisagée (figure 58). Ces tétrahydrobenzazépines peuvent être obtenues par réduction de la benzazépinone (1,3,4,5-tétrahydro-benzazépin-2-one) correspondante, elle-même obtenue par réaction de transposition de Beckmann appliquée à l'oxime de stéréochimie E de la tétralone commerciale (figure 59).

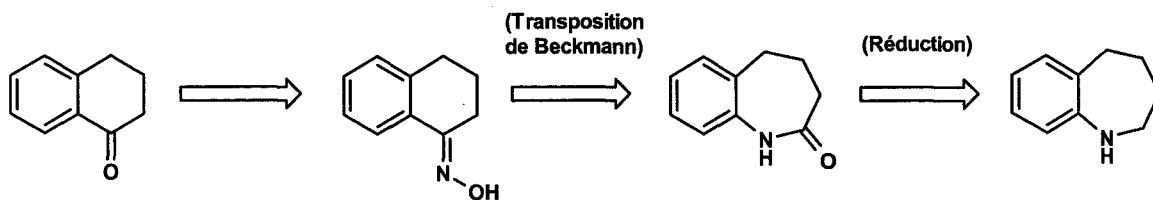


Figure 59. Diagramme rétrosynthétique pour l'obtention d'un noyau tétrahydrobenzazépine.

Cette voie de synthèse requiert trois étapes synthétiques :

- la formation de l'oxime
- l'extension de cycle par transposition de Beckmann
- la réduction de la liaison amide formée

Ce schéma réactionnel nécessite également la séparation des isomères E et Z de chaque oxime synthétisée afin d'obtenir de manière régiosélective le lactame souhaité.

Une méthode plus directe pour la synthèse de tétrahydrobenzazépines à partir de tétralones commerciales a également été envisagée. L'utilisation d'hydrure de diisobutylaluminium a permis récemment d'aboutir à partir des oximes de thiénoazépinones à la formation de thiénoazépines par extension de cycle et cela en une seule étape sans qu'il ait été nécessaire de séparer les formes E et Z de l'oxime.^{31, 32}

Ces deux voies de synthèse ont été comparées dans le cas de la 5,7-diméthyl-1-tétralone.

2.1.1. Présentation des tétralones commercialement disponibles.

Divers composés présentant le squelette de l' α -tétralone ou isostères sont disponibles commercialement. La liste des 12 composés retenus est présentée dans le tableau 3.

³¹ Cho H., Murakami K., Nakanishi H., Isishima H., Hayakawa K. and Uchida I.; Regioselective Synthesis of Several Heterocyclic Fused Azépines Using Diisobutylaluminium Hydride; *Heterocycles*, **1998**, *5*, pp 919-927.

³² Pitt G. et al.; Non-Peptide Vasopressin V₂ Receptor Agonists, RSC-SCI Symposium on Medicinal Chemistry, Cambridge UK, sept. **2001**.

Structure	Nom	Structure	Nom
	α -tétralone		6-méthylchroman-4-one
	4-méthyl-1-tétralone		4-kéto-4,5,6,7-tétrahydrothianaphthène
	5,7-diméthyl-1-tétralone		6,7dihydro-4(5H)-benzofuranone
	4-chromanone		1,5,6,7-tétrahydro-4H-indol-4-one
	6-chlorochroman-4-one		7-nitrotétralone
	6-chlorothiochroman-4-one		6-méthoxy-1-tétralone

Tableau 3. Présentation des cétones commerciales.

Ces composés possèdent une diversité structurale apportée à la fois sur le noyau aromatique par substitution avec des groupements électroattracteurs comme un chlore ou une fonction nitro, mais aussi sur la chaîne aliphatique par insertion d'hétéroatomes comme l'oxygène ou le soufre. Enfin, trois composés possèdent un hétérocycle aromatique de type thiophène, furanne ou pyrrole en remplacement du benzène.

2.1.2. Synthèse des oximes.

2.1.2.1. Présentation des voies de synthèse.

Deux voies de synthèse ont été appliquées à la synthèse des oximes des composés présentés ci-dessus (tableau 3). Ces deux voies de synthèse diffèrent par le choix de la base utilisée pour neutraliser le sel d'hydroxylamine.

□ **Méthode a** : La première voie de synthèse met en jeu deux équivalents de chlorure d'hydroxylamine, deux équivalents d'hydroxyde de sodium en présence d'un équivalent de composé de type tétralone le tout dans une solution éthanolique. Le milieu est alors chauffé à reflux pendant deux heures.

□ **Méthode b** : La seconde voie de synthèse met en jeu deux équivalents de chlorure d'hydroxylamine, deux équivalents de pyridine en présence d'un équivalent de composé de type tétralone le tout dans une solution éthanolique. Le milieu est alors chauffé à reflux pendant deux heures.

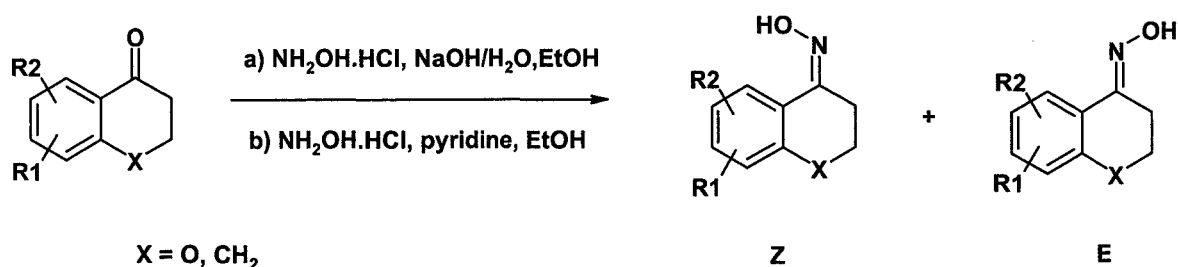
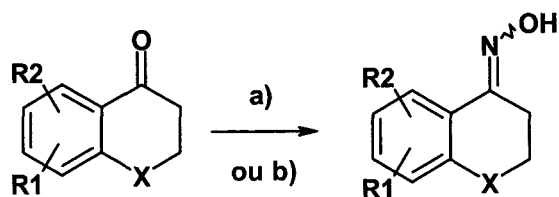


Figure 60. Deux voies de synthèses utilisées pour la synthèse des oximes.

2.1.2.2. Résultats expérimentaux.

Les résultats obtenus à partir des deux méthodes sont présentés dans le tableau 4. Nous y avons fait figurer le rendement global et la répartition entre isomères E et Z, observée par HPLC. Cette donnée est importante, en effet seul l'isomère E peut être converti lors de la transposition classique de Beckmann.



a) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}$, EtOH , reflux ; b) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, pyridine, EtOH , reflux

N°	Structure	Rendement (méthode a)	Rapport E/Z*	Rendement (méthode b)	Rapport E/Z*
34		85 %	9	90 %	9,2
35		85 %	9	80 %	8
36		14 %	7	88 %	6,9
37		80 %	3	75 %	2,9
38		52 %	3	80 %	2,5

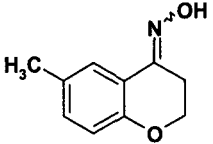
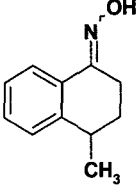
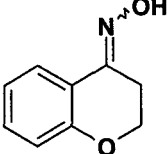
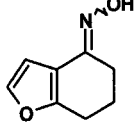
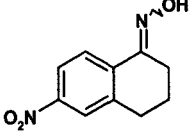
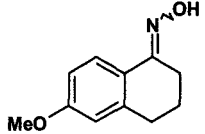
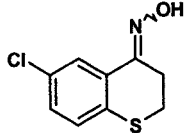
* : déterminé par HPLC.

Tableau 4. Résultats des synthèses des cétones oximes.

Les résultats obtenus selon les deux méthodes sont comparables pour la majorité des cétones de départ. La synthèse de l'oxime est quantitative, et le choix de la base n'influence pas la répartition entre isomères E et Z. On notera par contre que cette répartition est très sensible à la nature de la chaîne aliphatique et du cycle aromatique annelé de la cétone.

Seuls les dérivés de la chromanone se sont montrés instables en présence de soude méthanolique. Cette instabilité est due à une dégradation progressive du composé de départ dans ces conditions. C'est pour cette raison que dans la suite de ce travail, les différentes

oximes ont été synthétisées selon la méthode b. Les résultats de ces synthèses sont présentés dans le tableau 5.

N°	Structure	Rendement	Rapport E/Z*
39		40 %	10
40		58 %	>10
41		84 %	10
42		70 %	1,1
43		86 %	7
44		90 %	9
45		82 %	5

* : déterminé par HPLC.

Tableau 5. Résultats des synthèses de cétones oximes selon la méthode b.

A partir des différentes cétones oximes, deux procédures d'extension de cycle ont été étudiées et sont présentées dans la partie suivante.

2.1.3. Synthèse des azépines.

2.1.3.1. Première voie de synthèse : transposition de Beckmann suivie de la réduction du lactame formé.

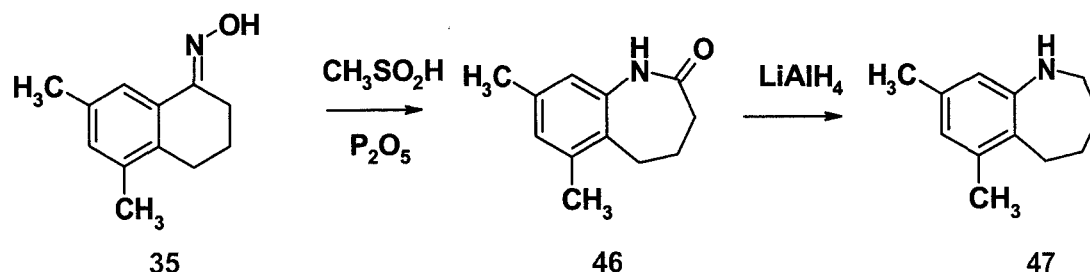


Figure 61. Première voie de synthèse des dérivés benzazépiniques par transposition de Beckmann suivie d'une réduction.

□ Méthode c: (figure 61)

L'oxime d'isomérisation E de la 5,7-diméthyltétralone est obtenue après recristallisation du mélange E/Z (9/1), obtenu après synthèse de l'oxime selon le procédé décrit précédemment. La transposition de Beckmann effectuée sur ce composé selon le protocole mettant en jeu l'acide méthanesulfonique en présence de pentoxyde de phosphore, permet d'obtenir le lactame désiré avec un rendement de 60%. Ce lactame est alors réduit par action du tétrahydridoaluminate de lithium pour donner avec un rendement de 60% la diméthyl-benzazépine souhaitée. Le rendement global de ces deux étapes est de 36%.

Bilan :

- Réaction en deux étapes.
- Rendement global: 36%.

2.1.3.2. Seconde voie de synthèse : réduction et extension de cycle en présence de DIBALH.

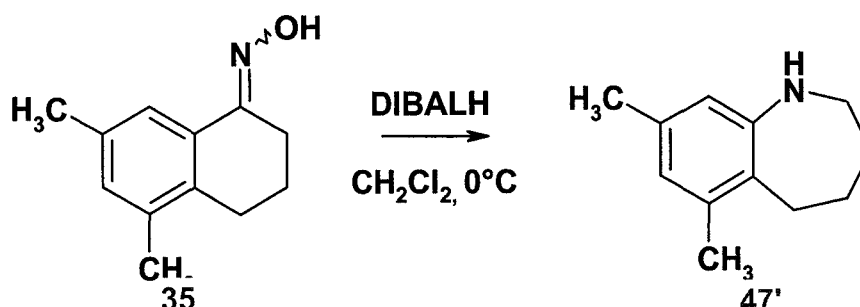


Figure 62. Schéma synthétique de l'extension de cycle en présence de DIBALH.

□ **Méthode d : (figure 62)**

Généralement, le mécanisme de réarrangement de Beckmann s'opère par migration de la liaison positionnée en anti de la fonction hydroxyle, conduisant à l'obtention d'un lactame de manière régiosélective. Contrairement à ce mécanisme de réarrangement, l'extension réductrice de cycle d'un mélange d'isomères E/Z (9/1) de l'oxime de la 5,7-diméthyltétralone en présence d'hydrure de diisobutylaluminium ne conduit qu'à la diméthylazépine désirée avec un rendement de 75%. La réaction est conduite à une température inférieure à 14°C, afin de minimiser la formation de l'amine primaire cyclique obtenue par réduction directe de l'oxime par le DIBALH.

Bilan :

- Réaction en une étape.
- Rendement : 75%.

La méthode d, permet d'obtenir la benzazépine recherchée en une étape avec un rendement de 75%. Cette synthèse ne nécessite pas une purification préalable des isomères E et Z à l'inverse de la réaction de Beckmann classique qui nécessite de plus une étape supplémentaire de réduction qui limite le rendement total de la synthèse.

2.1.3.2.1. Mécanisme proposé.

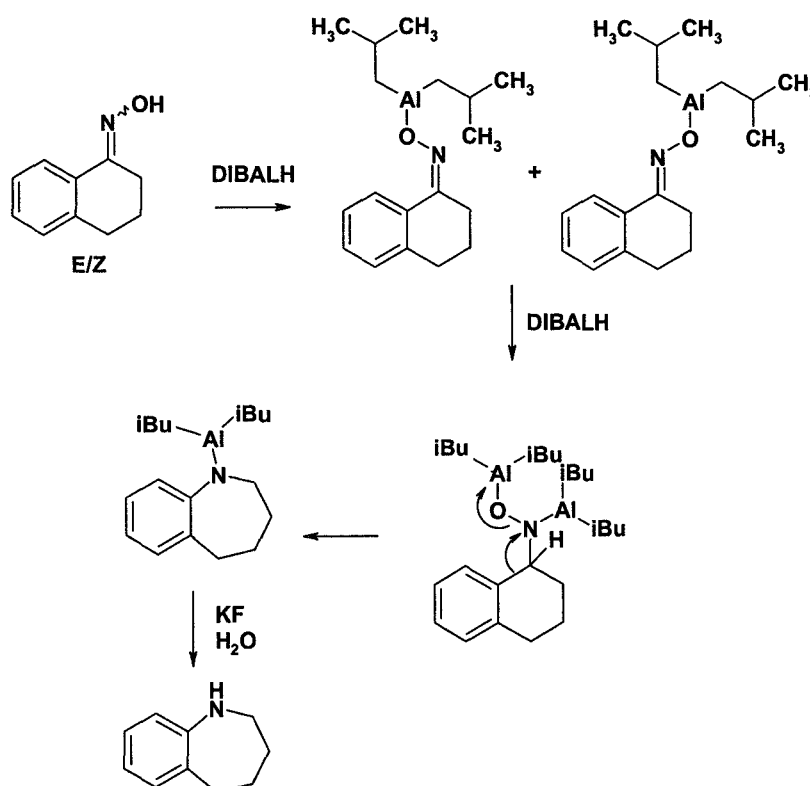


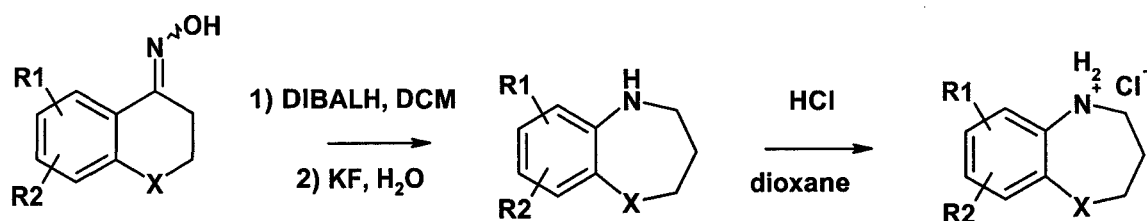
Figure 63. Mécanisme réactionnel proposé pour la réaction d'extension de cycle en présence de DIBALH.

Le mécanisme réactionnel proposé par Cho et al. pour cette réaction consiste en la réduction de la liaison C=N, suivie alors d'une addition d'une seconde molécule de DIBALH, puis d'une migration de la liaison phénylique conduisant ainsi à la formation du cycle azépinique (figure 63).

Cette hypothèse a été formulée en constatant que les isomères E et Z de l'oxime de la 6,7-dihydro-4-(5H)-benzofuranone conduisent dans les conditions réactionnelles au même composé azépinique.

2.1.3.2.2. Résultats expérimentaux.

Les rendements des différentes réactions d'extension de cycle obtenus à partir des cétones oximes correspondantes sont présentés dans le tableau 6.



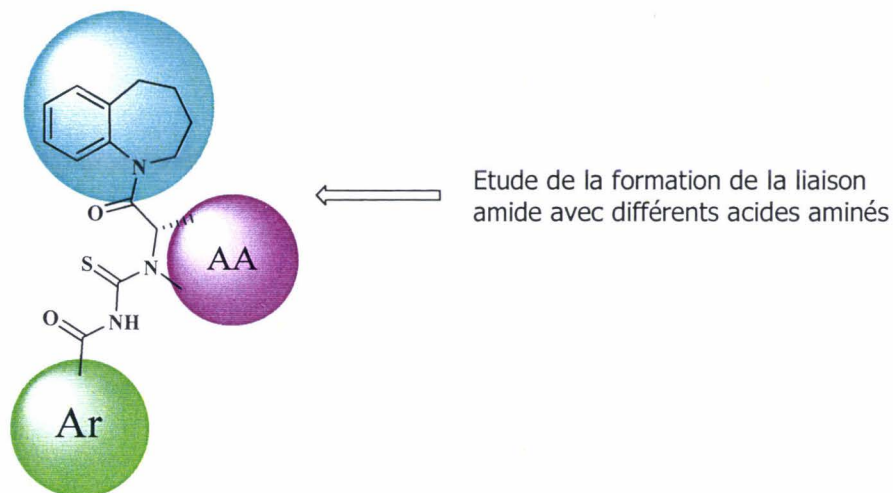
N°	Structure	Rendement (2 étapes)
48		50 %
49		42 %
50		52 %
51		30 %
52		33 %
53		31 %
54		68 %

Tableau 6. Résultats des synthèses d'extension de cycle.

La stabilité des dérivés possédant un hétérocycle aromatique s'étant avérée très faible, il n'a pas été possible d'isoler les produits d'extension de cycle. Ceci ne pourront donc

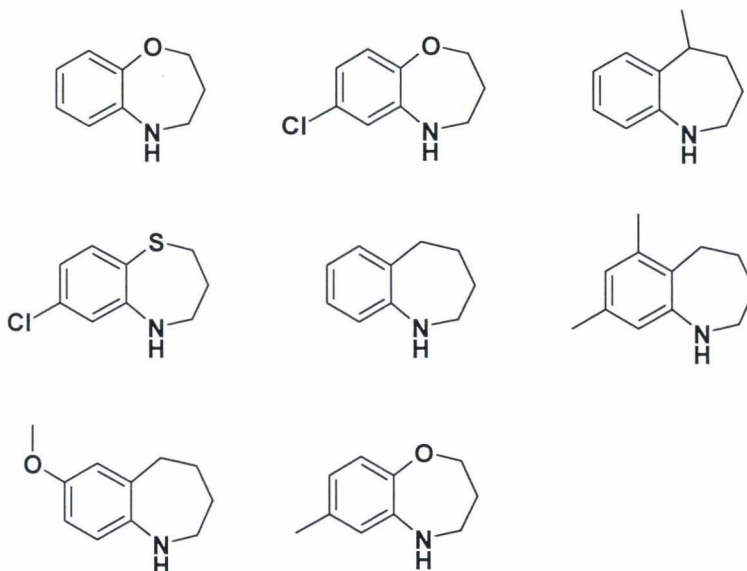
pas faire l'objet d'acylation en présence d'acides aminés dans les conditions que nous allons exposer par la suite.

2.2. Etude de la réaction d'acylation.

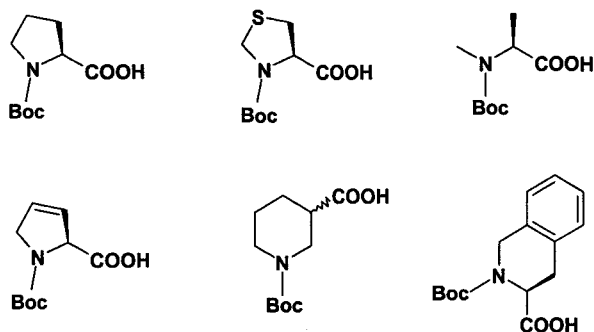


La suite de ce travail a consisté à étudier la réaction d'acylation entre les 8 monomères aminés préalablement synthétisés, présentés ci-dessous, et les 6 acides aminés bioisostères de la proline, présentés sur la page suivante. Le but était de produire toutes les combinaisons possibles de ces deux éléments de diversité, soit 48 composés. Il a donc fallu mettre au point des conditions opératoires suffisamment générales pour préparer ces composés en une seule étape de synthèse parallèle.

□ Monomères aminés disponibles :



□ Acides aminés utilisés :



2.2.1. Introduction à la chimie de la formation de liaisons amides en phase liquide.

L'intérêt considérable porté à la synthèse peptidique a fait que les méthodes de formation de liaisons amides ont dans leur immense majorité été optimisées pour le couplage des acides aminés. Or la gamme de réactivité des différents acides aminés ne représente qu'une fraction très limitée des problèmes présentés par la formation de liaisons amides non peptidiques.

La formation efficace de liaisons amides demande l'activation chimique de la fonction carboxylique de manière à faciliter l'attaque nucléophile du partenaire aminé. Le groupe activant utilisé lors de la réaction doit être choisi afin d'obtenir dans un premier temps la plus grande efficacité en terme de couplage et dans un second temps afin de minimiser au maximum la formation de sous-produits. Il existe quatre groupes principaux de techniques de couplage couramment employées pour l'introduction d'acides aminés protégés sur l'azote en position α du groupement carbonyle. Ces quatre techniques sont décrites dans la suite du texte.

2.2.1.1. La première classe d'agents de couplage : les carbodiimides.

L'agent de couplage le plus utilisé en synthèse peptidique est le 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, figure 64).³³ Il a été décrit pour la première fois en 1950. Le protocole de couplage est le suivant : la DCC est additionnée à une solution concentrée en acide carboxylique (1 éq.), en amine (1 éq.), et en catalyseur le tout dans un solvant tel que le dichlorométhane ou l'acétonitrile. L'adduit hydraté de la DCC : la dicyclohexylurée (DCU) précipite rapidement; cependant, une petite proportion de DCU reste en solution ce qui

³³ Sheehan J. C., Hess G. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, pp 1067.

complique la purification. Des dérivés de la DCC, solubles en phase aqueuse comme le 1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDCI, figure 64), ont été développés afin de résoudre ce problème de purification.³⁴ L'urée de l'EDCI est soluble en phase aqueuse et facilement éliminée de la phase organique par extraction. Les problèmes associés aux carbodiimides sont d'une part la formation de *N*-acylurées non réactives et d'autre part la racémisation qui se fait par formation intermédiaire d'une oxazolone. Ces problèmes sont évités par ajout d'additifs de couplage, qui sont particulièrement utiles pour le couplage de composés stériquement encombrés ou des amines faiblement nucléophiles. L'additif le plus souvent employé est la 1-hydroxybenzotriazole (HOBT), utilisée autant avec les carbodiimides qu'avec d'autres agents de couplage.³⁵ Plus récemment le 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) a été décrit comme plus efficace, augmentant considérablement la vitesse du couplage.³⁶ Il permet également de visualiser la fin de la réaction dont le milieu, jaune au départ du couplage devient incolore une fois le couplage terminé. 3-hydroxy-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazine (HODhbt)³⁷ et hydroxysuccinimide (HOSu)³⁸ sont utilisés moins fréquemment comme additifs pour la synthèse peptidique.

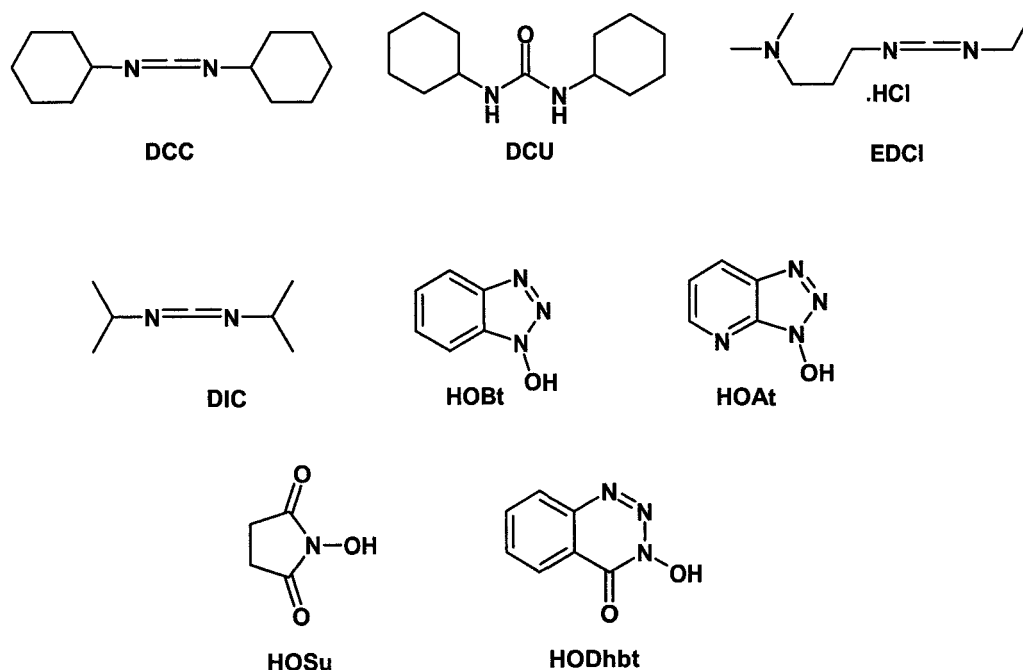


Figure 64. Agents de couplage et additifs utilisés fréquemment en synthèse peptidique.

³⁴ Sheehan J. C., Cruickshank P. A., Boshart G. L.; *J. Org. Chem.*, **1961**, *26*, pp 2525.

³⁵ König W., Geiger R.; *Chem. Ber.*, **1970**, *103*, pp 788, pp 2024, pp 2034.

³⁶ Carpino L. A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, pp 4397.

³⁷ König W., Geiger R.; *Chem. Ber.*, **1970**, *103*, pp 788, pp 2024, pp 2034.

³⁸ Wünsch E., Drees F.; *Chem. Ber.*, **1966**, *99*, pp 110.

2.2.1.2. Anhydrides symétriques ou mixtes préformés.

Les anhydrides symétriques préformés ont été utilisés à cause de leur forte réactivité. Ils sont générés *in situ* en utilisant deux équivalents de l'acide aminé protégé sur son azote et un équivalent de DCC dans le dichlorométhane. La dicyclohexylurée est éliminée par filtration et le couplage est alors réalisé dans le DMF. L'inconvénient de cette voie de synthèse est l'utilisation en excès de l'acide. Le second problème rencontré est la nécessité de synthétiser l'anhydride juste avant le couplage.

La synthèse d'anhydrides mixtes préformés a été développée pour résoudre les problèmes énumérés ci-dessus. La 2-éthoxy-1-éthoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline (EEDQ, figure 65), mise au point en 1968 par Belleau et al.,³⁹ est utilisée en présence d'un équivalent d'acide aminé pour former un anhydride mixte. L'anhydride mixte formé *in situ* est aussi très réactif en présence de nucléophiles comme les amines et permet la formation en une seule étape et avec peu de racémisation d'une liaison peptidique. La 2-isobutoxy-1-isobutoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline (IIDQ) a été introduite pour limiter les sous-produits provenant d'une attaque du nucléophile sur le second carbonyle de l'anhydride mixte.

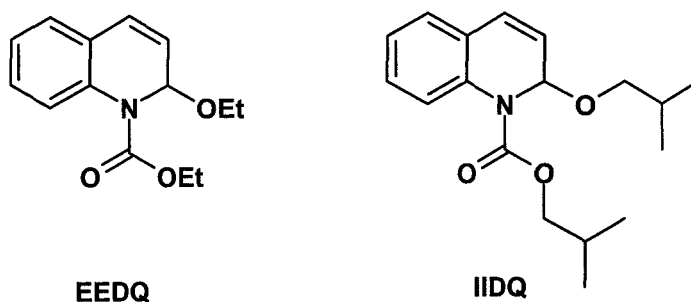


Figure 65. Agents de couplage utilisés pour la formation d'anhydrides mixtes.

2.2.1.3. La seconde classe d'agents de couplage : les sels d'aminium/uronium et de phosphonium de squelette HOBt ou HOAt.

Au cours des dix dernières années, il y a eu une importante évolution dans le développement de nouvelles méthodes d'activation et de leurs applications en phase liquide et en phase solide. La synthèse basée sur la formation d'esters activés a été remplacée par l'utilisation de sels d'aminium/uronium et de phosphonium (figure 66). Knorr a développé

des sels d'uronium, comportant une structure de type 4-oxo-1,2,3-benzotriazine.⁴⁰ En général, ces agents de couplage se sont avérés plus efficaces dans le couplage peptidique tout en préservant la formation de produits secondaires et la racémisation.^{41,42,43,44,45} Ces agents de couplage sont généralement utilisés en présence d'une quantité équimolaire d'acide et d'amine (libre ou sous la forme de sel), et d'une amine tertiaire comme la diisopropyléthylamine, la *N*-méthylmorpholine, la collidine, ou les diméthyl pyridines substituées, dans des solvants tels que le DMF, le THF, ou l'acétonitrile.

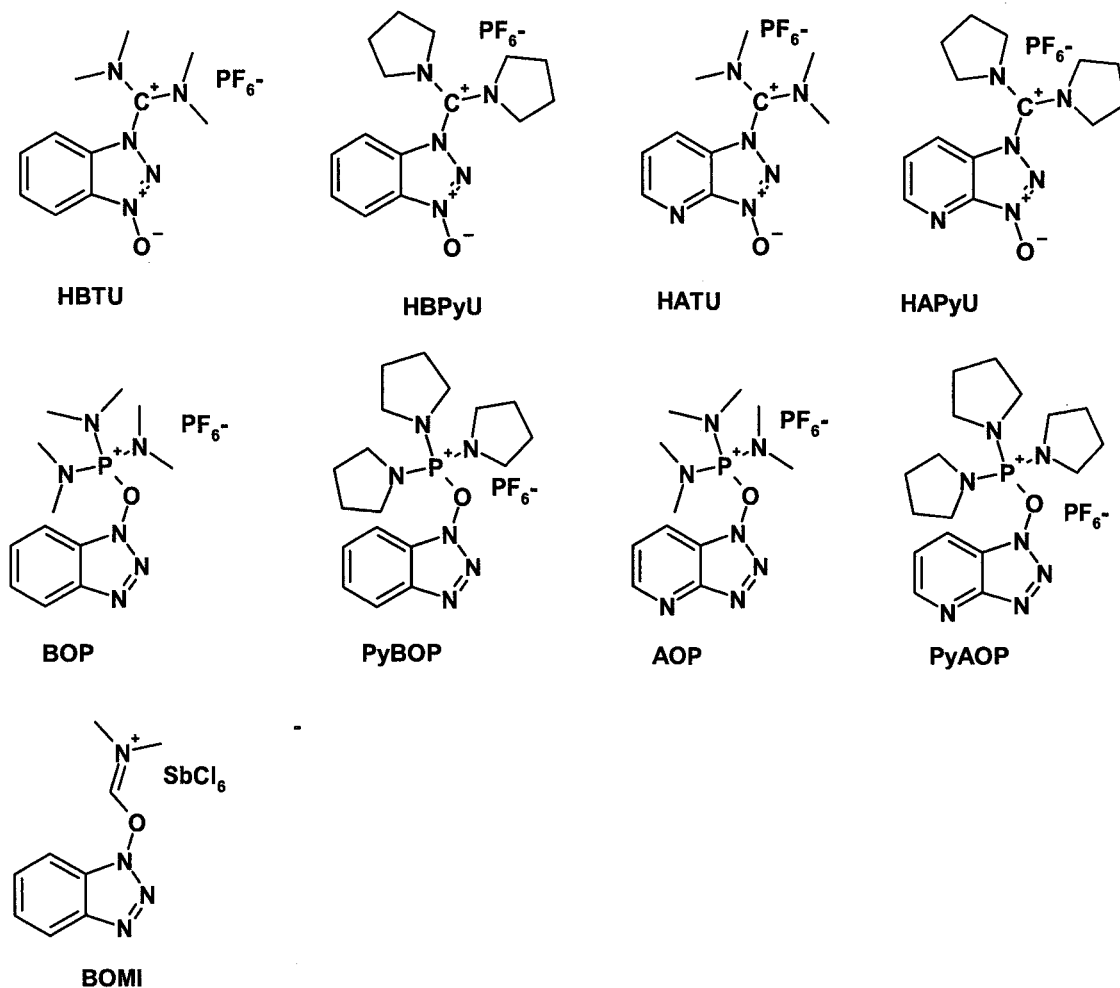


Figure 66. Agents de couplage basés sur les sels d'ammonium/uronium et de phosphonium.

³⁹ Belleau B., Malek G.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, *90*, pp 1651.

⁴⁰ Knorr R., Trzeciak A., Bannwarth W., Gillessen D.; *Tet. Lett.*, **1989**, *30*, pp 1927.

⁴¹ Dourtoglou V., Ziegler J.-C., Gross B.; *Tet. Lett.*, **1978**, *15*, pp 1269.

⁴² Castro B., Dormoy J. R., Evin G., Selve C.; *Tet. Lett.*, **1975**, *14*, pp 1219.

⁴³ Carpino L. A., El-Faham A., Albericio F.; *Tet. Lett.*, **1994**, *35*, pp 2279.

⁴⁴ Albericio F., Cases M., Alsina J., Triolo S. A., Carpino L. A., Kates S. A.; *Tet. Lett.*, **1997**, *38*, pp 4853.

⁴⁵ Li P., Xu J.; *Tet. Lett.*, **1999**, *40*, pp 3605.

2.2.1.4. La troisième classe d'agents de couplage : Les dérivés halogénés.

Les dérivés halogénés ont démontré leur grande réactivité en tant qu'agents de couplage, capables de coupler les fonctions amine d'acides aminés stériquement encombrés par des groupements alkyles sur le carbone en α de la fonction aminée comme l'Aib et cela avec des temps de réaction courts. Les fluorures d'acides aminés protégés sont préparés en utilisant le fluorure de cyanure comme agent de fluoration ou *in situ* à partir de l'hexafluorophosphate de tétraméthyl fluoroformamidinium (TFFH, figure 67).⁴⁶ Des réactifs voisins, BroP, CIP, Dpp-Cl, PyBroP, et PyCloP, agents de bromation ou de chloration ont permis le couplage d'acides aminés comportant un groupement méthyle sur la fonction amine, ce qui s'est généralement avéré difficile avec les carbodiimides.^{47,48,49,50,51}

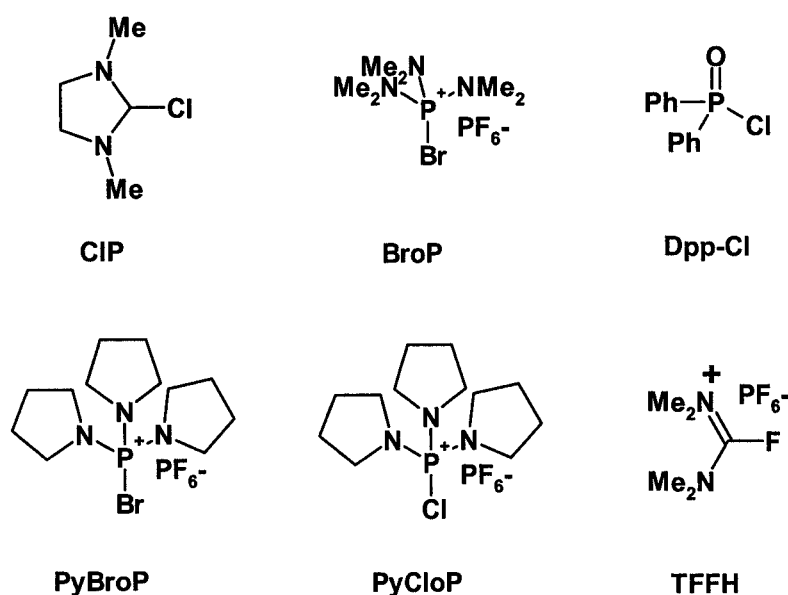


Figure 67. Agents de couplage halogénés.

2.2.2. Application en synthèse parallèle.

2.2.2.1. Exploration de la stratégie de couplage.

Nous avons sélectionné plusieurs de ces agents de couplage de manière à en avoir un échantillonnage représentatif à tester. Il était en effet prévisible que dans notre cas, la formation de la liaison amide fût difficile puisque mettant en jeu une fonction amine aromatique et de plus disubstituée.

⁴⁶ El- Faham A.; *Chem. Lett.*, **1998**, pp 671.

⁴⁷ Akaji K., Kuriyama N., Kiso Y.; *Tet. Lett.*, **1994**, *35*, pp 3315.

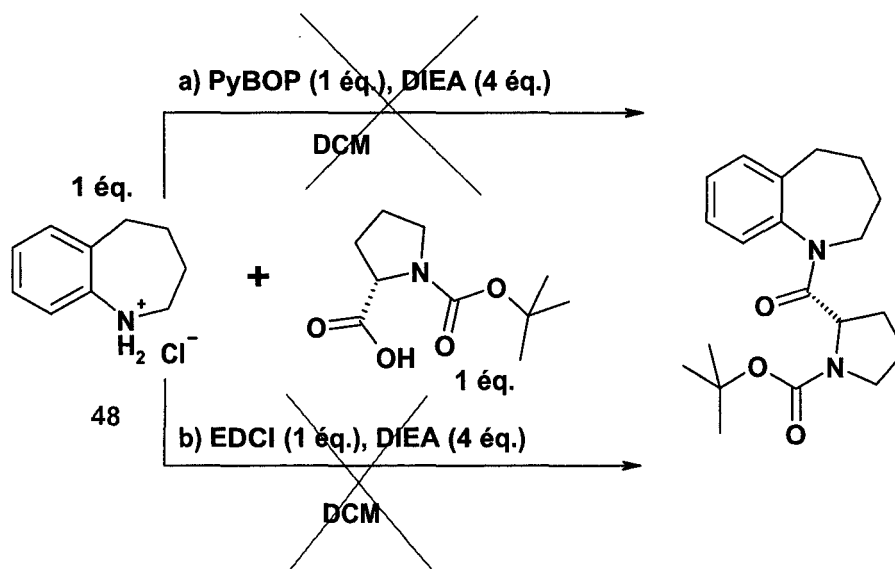
⁴⁸ Coste J., Dufour M.-N., Pantaloni A., Castro B.; *Tet. Lett.*, **1990**, *31*, pp 669.

⁴⁹ Ramage R., Hopton D., Parrott M. J., Richardson R. S., Kenner G. W., Moore G. A.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, **1985**, pp 461.

⁵⁰ Coste J., Frérot E., Jouin P., Castro B.; *Tet. Lett.*, **1991**, *32*, pp 1967.

⁵¹ Coste J., Frérot E., Jouin P.; *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, pp 2437.

2.2.2.1.1. Essais préliminaires.



Deux essais de couplage entre l'azépine **48** et la Boc-proline ont été réalisés en mettant en jeu deux agents de couplage utilisés fréquemment en synthèse peptidique :

- PyBOP : Une solution contenant 1.5 mmoles de Boc-L-Pro-OH, 6 mmoles de DIEA, 1.5 mmoles de PyBOP, et 1.6 mmoles de **48** dans 2 mL de DCM est agitée à température ambiante pendant 18 heures.⁵²
- EDCI : Une solution contenant 1.5 mmoles de Boc-L-Pro-OH, 6 mmoles de DIEA, 1.5 mmoles de EDCI, et 1.6 mmoles de **48** dans 2 mL de DCM est agitée à température ambiante pendant 18 heures.

Lors de ces deux essais, la formation du produit de couplage n'a pas pu être observée. Ce résultat montre clairement que la nature de la liaison amide à former ne permettait pas d'extrapoler systématiquement des données de chimie peptidique.

Afin d'explorer la réactivité des deux produits de départ en fonction des agents de couplage utilisés, de la base employée, du solvant et de la température du milieu réactionnel, deux plaques de 96 puits reprenant cette diversité ont été construites, afin que chaque puits corresponde à une combinaison différente de ces conditions expérimentales.

⁵² Frérot E., Coste J., Pantaloni A., Dufour M. N. and Jouin P.; PyBOP and PyBroP: Two Reagents For The Difficult Coupling of The α,α -Dialkyl Amino Acid, Aib; *Tetrahedron*, **1991**, *67*, pp 259-270.

Les puits des cinq premières colonnes de chaque plaque sont remplis respectivement par 100 μL des cinq solutions suivantes :

- PyBOP ($C=10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) dans le DCM.
- EDCI ($C=10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) dans le DCM.
- DIC ($C=10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) dans le DCM.
- TBTU ($C=10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) dans le DCM.
- DCC ($C=10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) dans le DCM.

⇒ Chaque colonne de la plaque représente donc une diversité dans le choix de l'agent de couplage.

Dans tous les puits sont alors disposés 100 μL d'une solution de Boc-Pro-OH ($C=10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) dans le DCM.

Le dichlorométhane est évaporé en étuve chauffée à 50°C.

Enfin, 300 μL des solutions ci-dessous sont disposés dans les puits de chaque ligne.

- DIEA ($C=10^{-2}/3 \text{ mol.L}^{-1}$), **48** ($C=10^{-2}/3 \text{ mol.L}^{-1}$) dans le DCM.
- DIEA ($C=10^{-2}/3 \text{ mol.L}^{-1}$), **48** ($C=10^{-2}/3 \text{ mol.L}^{-1}$) dans la NMP.
- DIEA ($C=10^{-2}/3 \text{ mol.L}^{-1}$), **48** ($C=10^{-2}/3 \text{ mol.L}^{-1}$) dans la DMA.
- DIEA ($C=10^{-2}/3 \text{ mol.L}^{-1}$), **48** ($C=10^{-2}/3 \text{ mol.L}^{-1}$) dans un mélange DCM/DMA (7/3, V/V).
- DMAP ($C=10^{-2}/3 \text{ mol.L}^{-1}$), **48** ($C=10^{-2}/3 \text{ mol.L}^{-1}$) dans le DCM.
- DMAP ($C=10^{-2}/3 \text{ mol.L}^{-1}$), **48** ($C=10^{-2}/3 \text{ mol.L}^{-1}$) dans la NMP.
- DMAP ($C=10^{-2}/3 \text{ mol.L}^{-1}$), **48** ($C=10^{-2}/3 \text{ mol.L}^{-1}$) dans la DMA.
- DMAP ($C=10^{-2}/3 \text{ mol.L}^{-1}$), **48** ($C=10^{-2}/3 \text{ mol.L}^{-1}$) dans un mélange DCM/DMA (7/3, V/V).

⇒ L'influence du solvant est prise en compte dans chaque ligne, et celle de la base dans chaque groupe de quatre lignes (A-D et E-H, figure 68).

De plus, une plaque est placée sous agitation mécanique à température ambiante alors que la seconde plaque identique est placée dans une étuve chauffée à 65°C.

⇒ L'influence de la température pourra être analysée.

Les conversions obtenues lors de cette étape d'optimisation ont été regroupées à la figure 68.

L'avancement de la réaction d'acylation est analysé dans chaque puits par HPLC après 17 heures de réaction et par LC-MS après 40 heures de réaction. Cet avancement a été évalué en calculant le rapport des surfaces des pics de la tétrahydrobenzazépine **48** et du produit d'acylation, mesurées à la longueur d'onde de 220 nm. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 68.

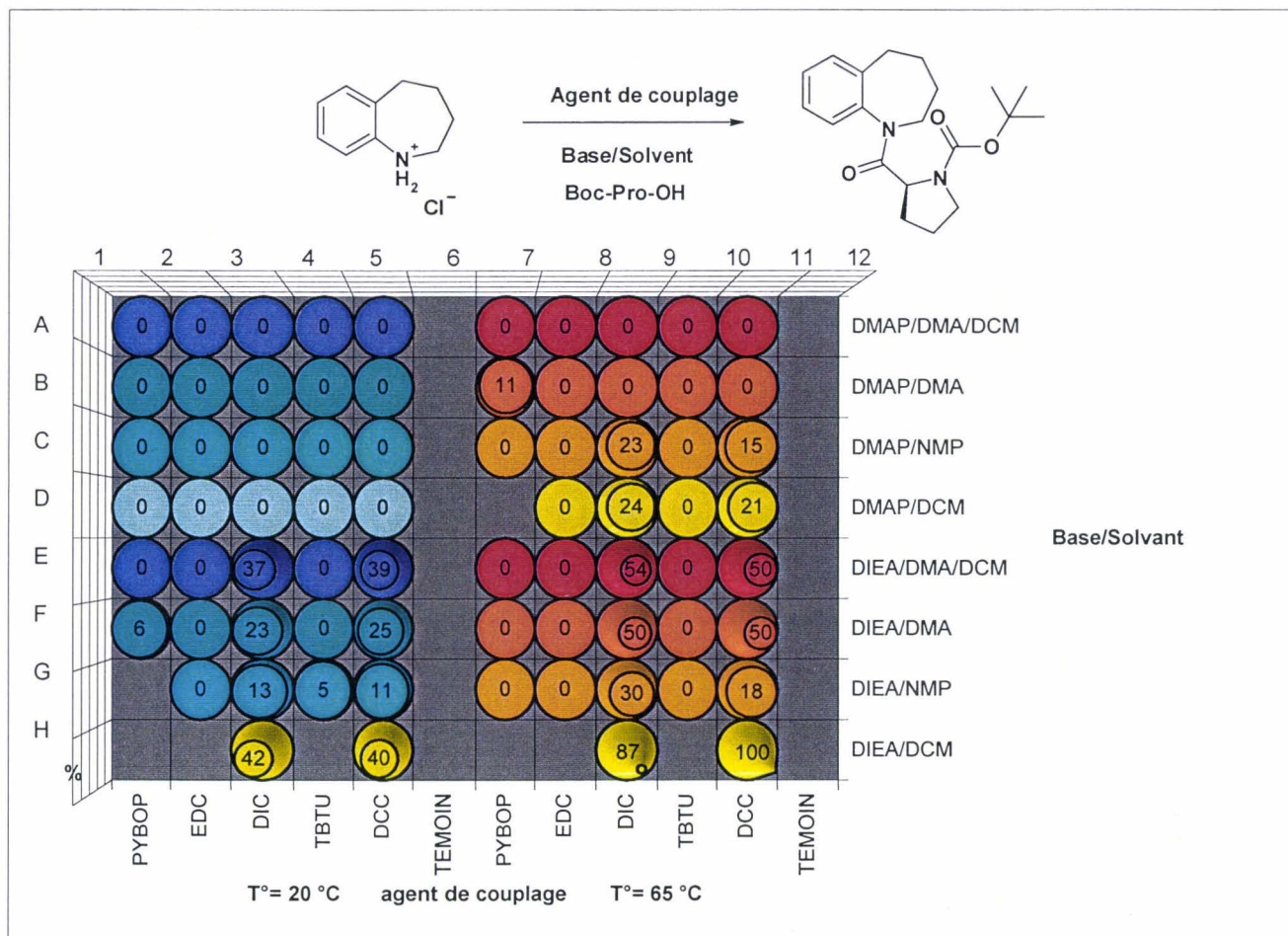


Figure 68. Quantification de la réaction d'acylation entre la Boc-Pro-OH et la 2,3,4,5-tétrahydro-1H-benzazépine après 40 heures d'agitation en fonction de l'agent de couplage, de la base, du système de solvant utilisé et de la température.

2.2.2.1.2. Analyse des résultats.

Plusieurs constatations peuvent être effectuées à partir des résultats d'acylation obtenus :

- Seuls les agents de couplage de type carbodiimide (DCC et DIC, colonnes 3, 5, 9 et 11) ont permis d'obtenir le produit acylé désiré. Les conversions variant de 11 à 100%.
- Les agents de couplage de type sel de phosphonium (PyBOP) et sel d'ammonium (TBTU) se sont avérés inefficaces dans pratiquement toutes les conditions (5, 6 et 11% de conversion dans les puits respectifs G4, F1 et B7).
- La réaction d'acylation semble également être dépendante du solvant utilisé : les réactions réalisées dans le dichlorométhane montrent une conversion en produit de réaction supérieure aux autres réactions identiques réalisées dans la NMP ou la DMA (lignes H et E).
- La base appropriée pour cette réaction est la DIEA, la DMAP n'a permis de favoriser la formation du produit attendu que dans 5 puits sur 40, (17 sur 40 dans le cas de la DIEA).
- Enfin, le chauffage du milieu réactionnel favorise également la formation du produit d'acylation (comparaison des colonnes 3, 5 avec 9, 11).

2.2.2.1.3. Interprétation des résultats expérimentaux.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour tenter d'expliquer ces résultats.

La formation d'une liaison amide entre une amine et une fonction acide implique deux étapes :

- la première étape consiste en l'activation de la fonction carboxylique par formation d'un ester d'HOBt dans le cas des agents de couplage TBTU et PyBOP, dont le mécanisme de formation est schématisé en figure 69. Dans le cas des carbodiimides DCC et DIC, c'est l'intermédiaire O-acylisourée qui est formé par addition du carboxylate sur le réactif de couplage (figure 70).
- la seconde étape correspond à l'attaque nucléophile du dérivé aminé sur le groupement carbonyle activé (figure 71).

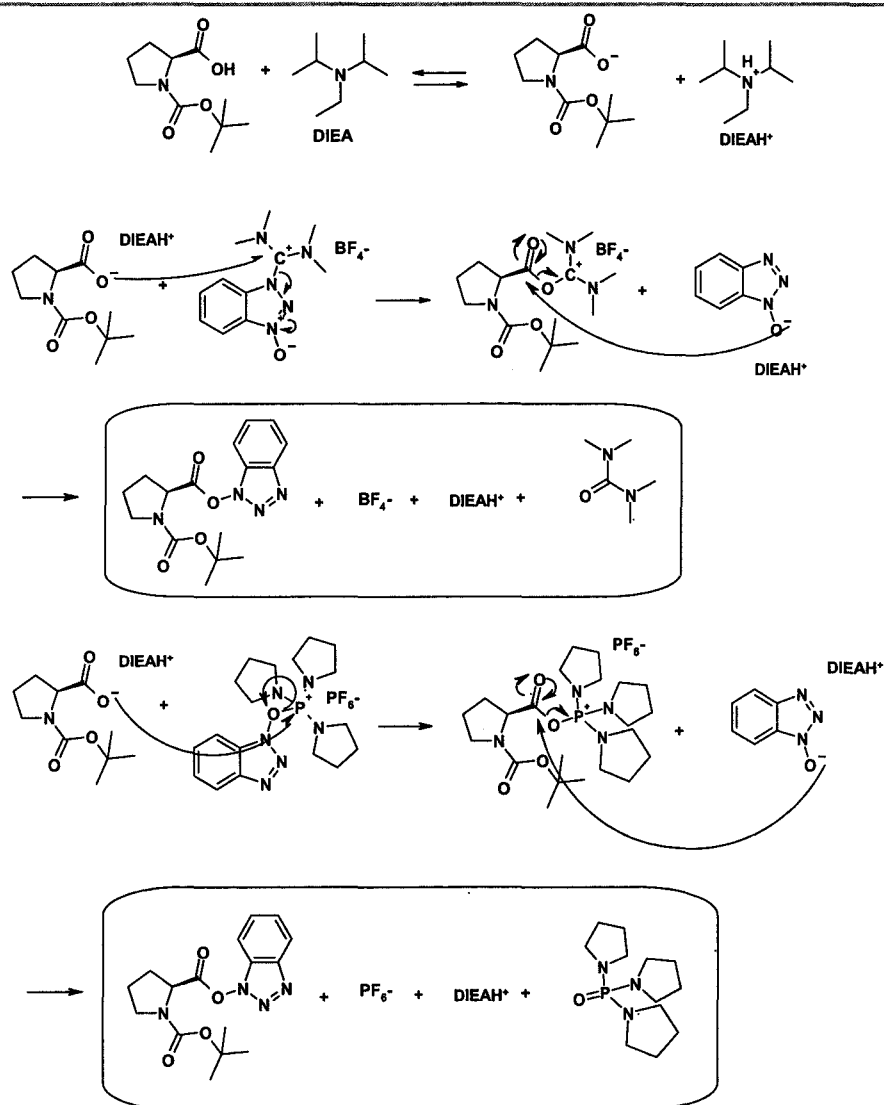


Figure 69. Schéma de formation de l'ester activé d'HOBt à partir de Boc-Pro-OH et de TBTU et PyBOP.

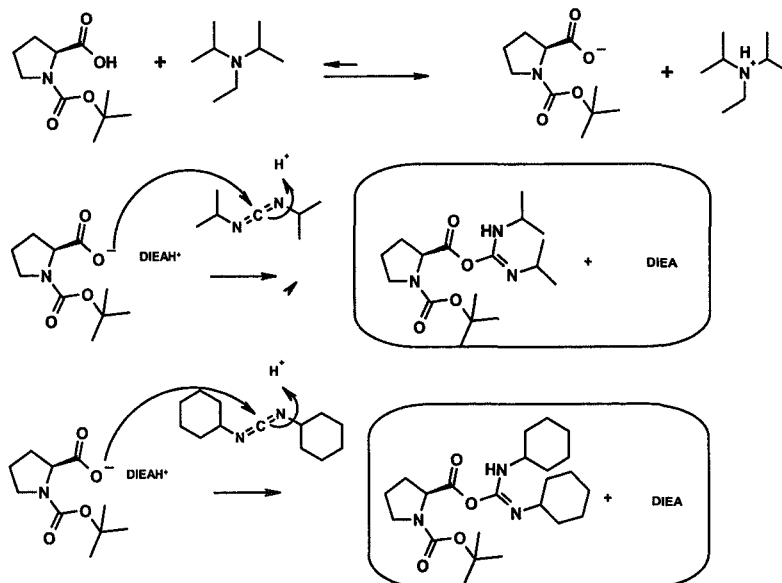


Figure 70. Formation des dérivés O-acylisourée de Boc-Pro-OH par addition des agents de couplage DCC et DIC.

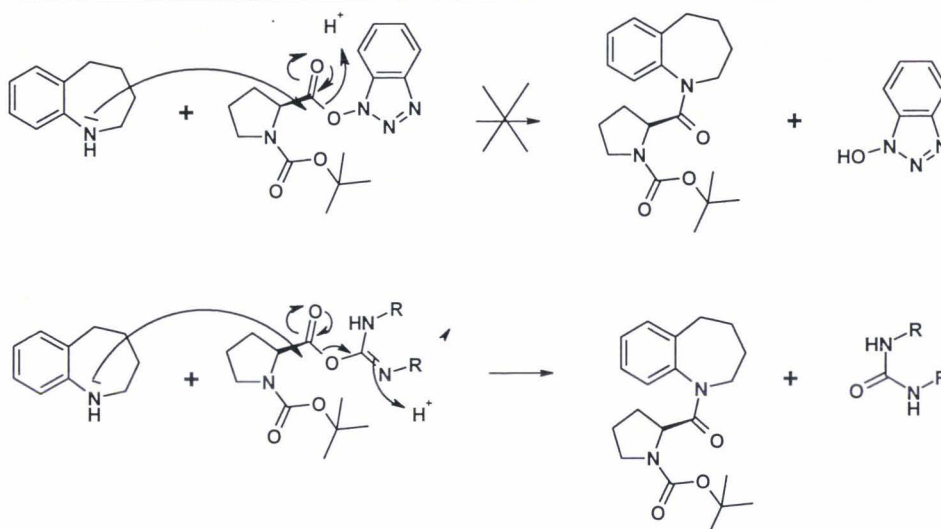


Figure 71. Attaque nucléophile de la tétrahydrobenzazépine sur l'ester activé.

Cette étape d'attaque nucléophile dépend à la fois de la nature de l'espèce activée ainsi que de la nature du nucléophile impliqué.

Dans le cas étudié, le nucléophile qui intervient est la fonction aminée de la tétrahydrobenzazépine. Cette fonction aminée est faiblement nucléophile, en effet, le doublet de l'azote est délocalisé sur la liaison azote-cycle aromatique. Cette nucléophilie ne se voit que légèrement renforcée par l'effet inducteur de la chaîne carbonée du cycle azépinique.

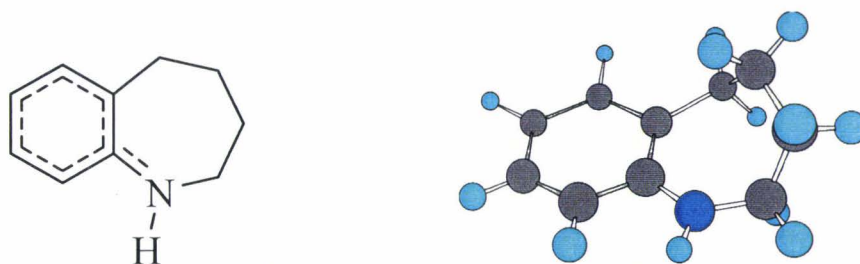


Figure 72. Etude de la structure de la tétrahydrobenzazépine.

Par contre cette chaîne carbonée provoque une gêne stérique, qui rend le doublet de l'azote moins accessible (figure 72). Par conséquent, l'attaque nucléophile de la tétrahydrobenzazépine va être ici l'étape limitante dans la formation de la liaison amide.

La différence de réactivité entre HBTU, PyBOP et les carbodiimides DCC et DIC peut d'abord s'expliquer par une différence de réactivité et de stabilité à la fois des agents de couplage mais surtout de l'espèce activée Boc-Pro-OR.

Une étude réalisée sur la stabilité des agents de couplage HBTU et PyBOP en solution dans le DMF en présence de DIEA en milieu ouvert a montré qu'après une heure, seulement 62 et 31% de ces agents étaient encore présents et n'avaient pas subis de dégradation.⁵³

⁵³ Albericio F., Bofill J. M., El-Faham A. and Kates S. A.; Use of Onium Salt-Based Coupling Reagents in Peptide Synthesis; *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, pp 9678-9683.

La stabilité des agents de couplage est donc un paramètre non négligeable surtout lorsque l'espèce nucléophile est faiblement réactive.

Ces deux hypothèses peuvent expliquer pourquoi dans le cas des esters d'HOBt, aucun produit d'acylation n'est formé et que l'on retrouve quantitativement dans le milieu réactionnel l'HOBt.

Cette dégradation de l'ester activé Boc-Pro-OBt peut également être favorisée par le manque d'accessibilité du carbone électrophile par le doublet de l'azote relatif dû à l'encombrement stérique.

L'emploi d'une base comme la DIEA, plutôt qu'une base plus faible comme la DMAP, favorise également l'activation de la fonction acide.

2.2.2.2. Amélioration des premiers résultats.

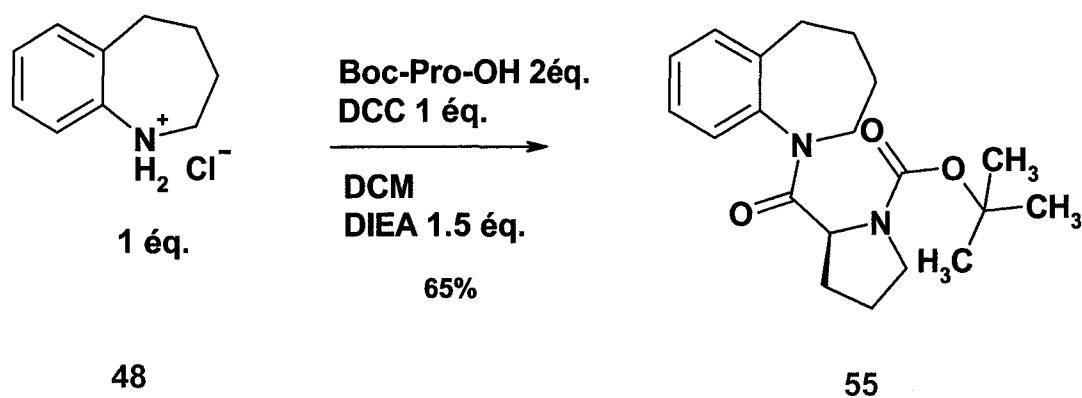


Figure 73. Acylation par formation *in situ* de l'anhydride symétrique de l'acide en présence de DCC en excès.

Sur la base des résultats obtenus précédemment, nous nous sommes tournés vers la synthèse *in situ* de l'anhydride symétrique de la Boc-Pro-OH, à partir de deux équivalents de Boc-Pro-OH et d'un équivalent de DCC. La DCU formée est filtrée sur coton de verre. La tétrahydrobenzazépine (1 éq.) est alors ajoutée au milieu et l'agitation est maintenue pendant 18 heures à température ambiante.

Ce protocole a permis d'obtenir une conversion en produit d'acylation de 85% et un rendement après purification de 65% (figure 73).

Sur la base de ce premier résultat, la réactivité de sept dérivés tétrahydrobenzazépine a été étudiée vis-à-vis de l'anhydride symétrique de la Boc-Proline et de l'anhydride symétrique de la Boc-thiaproline.

Les composés étudiés diffèrent, soit par l'ajout d'un substituant électroattracteur ou électrodonneur sur le noyau aromatique, soit par le remplacement d'un groupement méthylène par un hétéroatome sur la chaîne cyclique saturée.

28 réactions en parallèle ont été conduites, chacune suivant le même protocole que précédemment :

- Formation de l'anhydride *in situ* en utilisant 2 équivalents d'acide aminé et 1 équivalent de DCC dans le DCM.
- Filtration de la DCU formée.
- Ajout de 1 équivalent de la tétrahydrobenzazépine et de 1.5 équivalent de DIEA et mise sous agitation de la réaction à température ambiante.
- Dans 14 puits sur 28 la réaction a été conduite dans un mélange 1/1 (V/V) DCM/DMF.

Les 28 réactions ont été quantifiées après 18 heures comme précédemment.

Les conversions obtenues sont présentées à la figure 74.

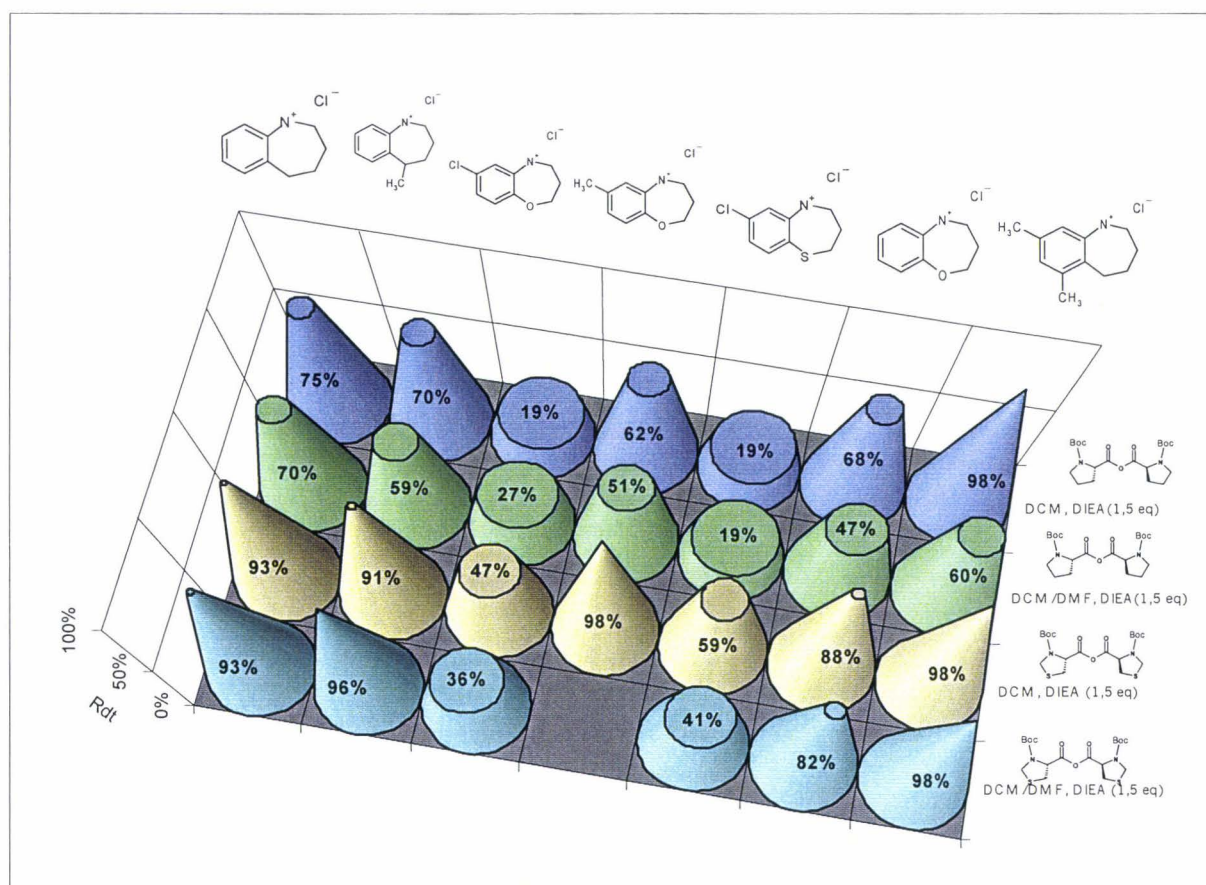


Figure 74. Présentation des conversions obtenues avec les différentes tétrahydrobenzazépines synthétisées en présence de deux anhydrides symétriques.

L'avancement de la réaction après 18 heures d'agitation confirme bien l'effet électronique du noyau aromatique de la tétrahydrobenzazépine sur la nucléophilie et donc la réactivité de l'amine. En effet, une substitution du noyau aromatique par un groupement électroattracteur comme le chlore va appauvrir ce noyau en électrons et diminuer la nucléophilie et la réactivité de la tétrahydrobenzazépine. Les conversions observées dans les cas de la 7-chloro-2,3,4,5-[1,4]benzoxazépine et de la 7-chloro-2,3,4,5-tétrahydro-[1,4]benzothiazépine sont ainsi nettement inférieures aux conversions des composés non substitués.

A l'opposé, une substitution du noyau aromatique par deux groupements méthyle, comme dans le cas de la 6,8-diméthyl-2,3,4,5-tétrahydro-1*H*-benzazépine, va enrichir le noyau en électrons et favoriser la réactivité de ce composé.

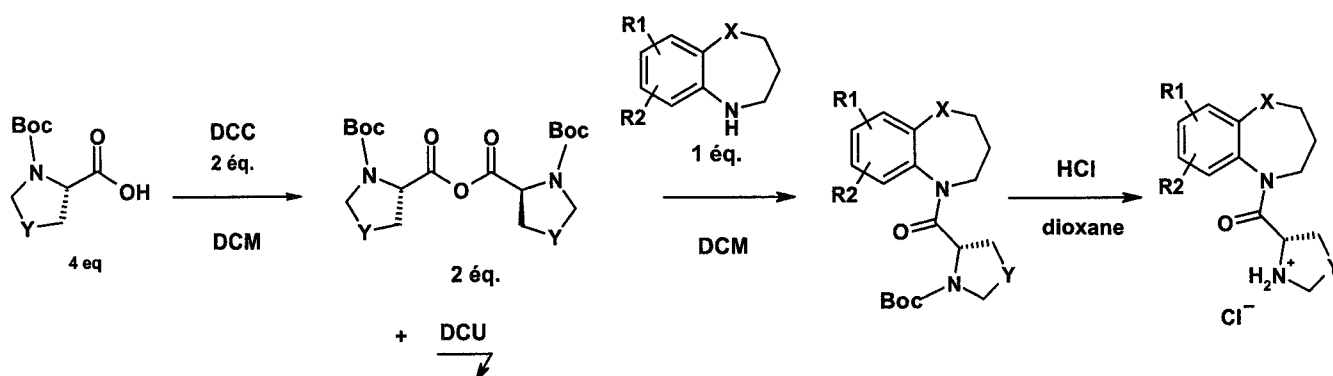
De ces résultats, il apparaît donc probable que la cinétique de la réaction d'acylation est principalement dépendante de la nucléophilie de l'amine de la tétrahydrobenzazépine.

Il semblerait également que la nature de l'acide aminé utilisé pour l'acylation influence la cinétique de la réaction. Cette influence est certainement gouvernée par la disponibilité du groupement carbonyle au nucléophile grâce à une disposition plus favorable des atomes comme dans le cas de l'anhydride de la Boc-thiaproline.

2.2.2.2.1. Présentation des résultats obtenus.

Le protocole mis au point précédemment a ensuite été appliqué aux six dérivés de type benzazépine, en présence de *L*-proline ou de *L*-thiaproline.

Le schéma synthétique est le suivant:



Les résultats des synthèses obtenus après purification et déprotection sont regroupés dans le tableau 7.

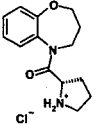
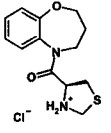
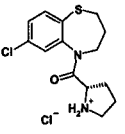
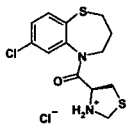
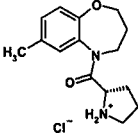
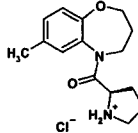
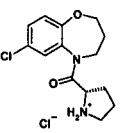
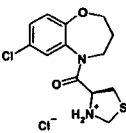
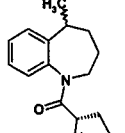
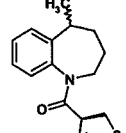
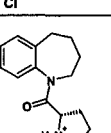
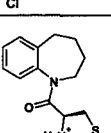
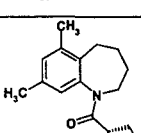
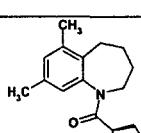
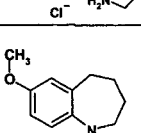
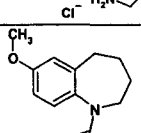
N°	Structure	Rendement (2 étapes)	N°	Structure	Rendement (2 étapes)
56		62 %	64		64 %
57		42 %	65		50 %
58		67 %	66		46 %
59		39 %	67		55 %
60		68 %	68		46 %
61		86 %	69		52 %
62		78 %	70		80 %
63		65 %	71		58 %

Tableau 7. Résultats des réactions d'acylation.

2.2.2.2.2. Comparaison entre DCC et EDCI pour la formation des anhydrides symétriques.

L'utilisation de la DCC pour la formation de l'anhydride symétrique et son utilisation *in situ* dans la réaction d'acylation avec les tétrahydrobenzazépines comporte un inconvénient majeur: la formation de dicyclohexylurée (DCU). Cette urée reste présente en faible quantité dans le milieu réactionnel, même après filtration. Chaque réaction réalisée en présence de DCC nécessite donc une purification par chromatographie sur colonne de silice.

La première possibilité envisagée pour éviter ce désagrément a été d'utiliser une carbodiimide soluble EDCI dans la formation de l'anhydride symétrique, et ce dans les mêmes conditions opératoires que pour la DCC (figure 75).

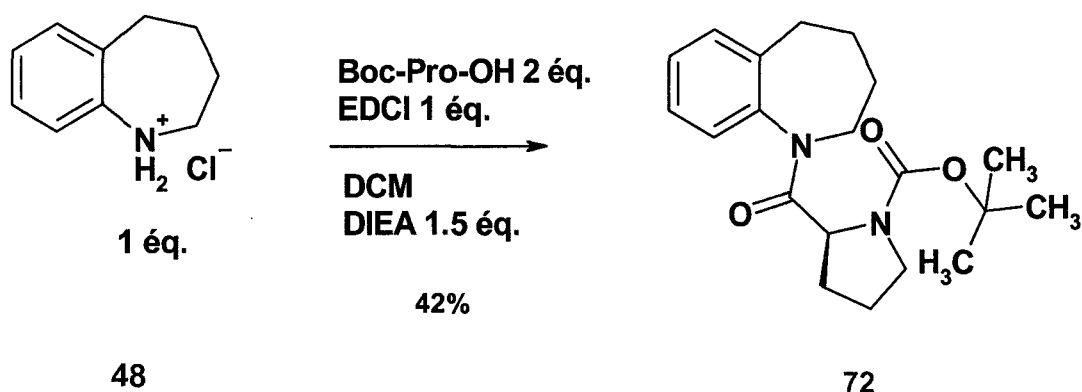


Figure 75. Présentation du protocole de la formation des anhydrides mixtes *in situ* à partir du carbodiimide EDCI.

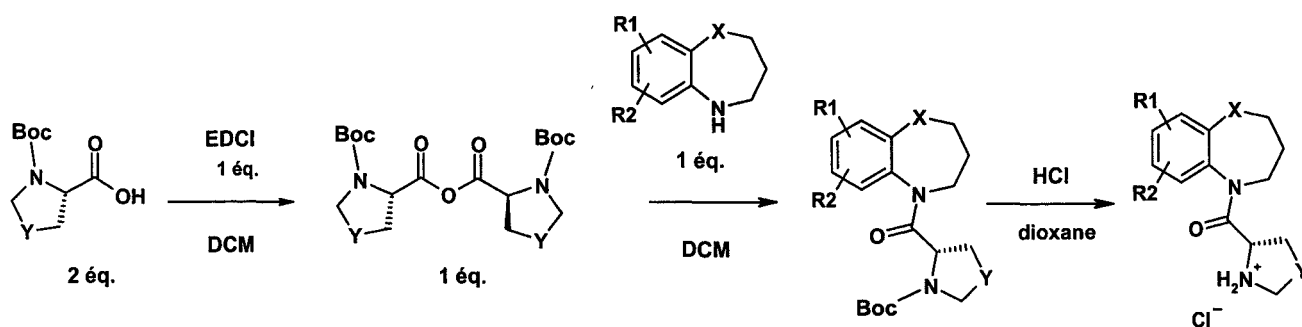
Le protocole est le suivant:

- Formation de l'anhydride *in situ* en utilisant 2 équivalents d'acide aminé et 1 équivalent de EDCI dans le DCM.
- Ajout de 1 équivalent de la tétrahydrobenzazépine et de 1.5 équivalents de DIEA et mise sous agitation de la réaction à température ambiante.

L'utilisation du carbodiimide soluble (EDCI) dans la préparation *in situ* des anhydrides symétriques n'a pas permis d'accroître les rendements. En revanche l'étape de purification du composé intermédiaire Boc s'en trouve facilitée.

La synthèse de huit monomères a été réalisée selon cette méthode et les résultats sont reportés dans le tableau 8.

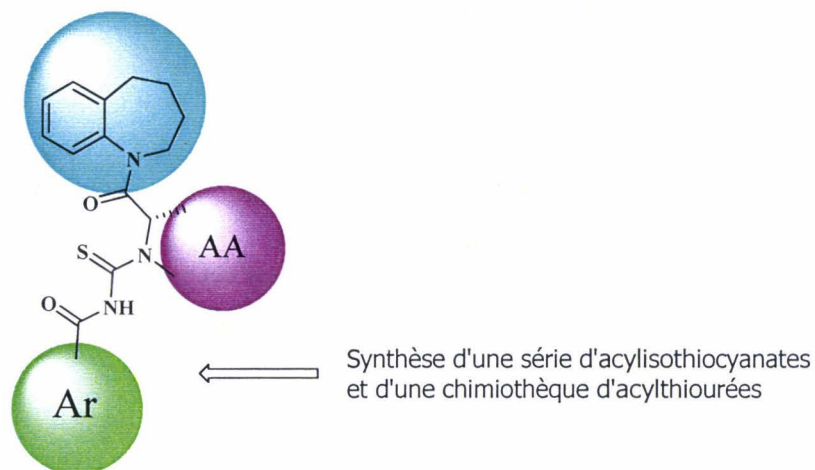
Le schéma synthétique est le suivant :



N°	Structure	Rendement (2 étapes)	N°	Structure	Rendement (2 étapes)
73		27 % (78% DCC)	77		43 % (80% DCC)
74		32 % (65% DCC)	78		38 % (58% DCC)
75		26 %	79		41 %
76		16 %	80		12 %

Tableau 8. Résultats des acylations obtenues à partir des anhydrides symétriques formés avec l'EDCI et le DCC.

2.3. Synthèse parallèle d'acylthiourées.



La dernière étape qui consiste en la formation d'une liaison acylthiourée a été réalisée en synthèse parallèle, par couplage des différents monomères obtenus préalablement avec 23 acylisothiocyanates synthétisés en phase homogène.

2.3.1. Préparation des acylisothiocyanates.

2.3.1.1. A partir de chlorures d'acyle.

18 des 23 acylisothiocyanates ont été synthétisés directement à partir des chlorures d'acyle disponibles commercialement. Les conditions de cette synthèse sont exposées à la figure 76.⁵⁴

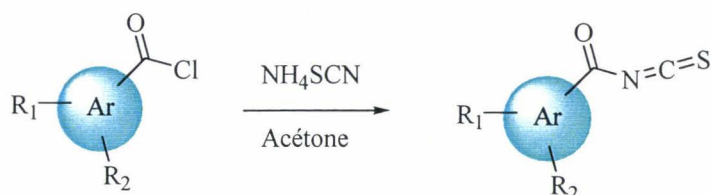


Figure 76. Schéma réactionnel de la synthèse des 18 acylisothiocyanates à partir de chlorures d'acyles.

Le noyau aromatique (Ar) correspond soit à :

- Un noyau benzénique
- Un noyau naphthalénique
- Un noyau hétéroaromatique de type furanne ou thiophène

Les substituants R_1 et R_2 sont des atomes électroattracteurs comme le chlore ou le fluor ou des groupements comme le méthyl ou le méthoxy.

2.3.1.2. A partir d'acides carboxyliques.

Les cinq acylisothiocyanates restants ont été synthétisés en deux étapes à partir des acides carboxyliques. La première étape est la formation du chlorure d'acyle par réaction avec le chlorure de thionyle dans le toluène. La seconde étape est la synthèse de l'acylisothiocyanate par réaction du chlorure d'acyle avec le thiocyanate d'ammonium dans l'acétone. Le schéma synthétique est présenté en figure 77.

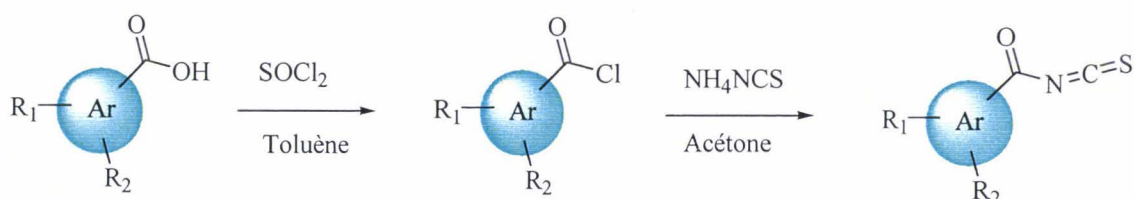


Figure 77. Schéma réactionnel de la synthèse en deux étapes des cinq acylisothiocyanates, à partir des acides correspondants.

2.3.1.3. Résultats expérimentaux.

Les rendements sont compris entre 65 et 80%.

La synthèse des différents acylisothiocyanates a conduit à des composés suffisamment purs pour être directement utilisés en synthèse parallèle robotisée.

2.3.2. Synthèse en phase parallèle des acylthiourées.

2.3.2.1. Qualification de la réaction de couplage.

Afin de vérifier la qualité de la réaction de couplage entre les différents monomères et les acylisothiocyanates, un essai de couplage a été effectué entre le composé **64** et le 4-chlorobenzoyl acylisothiocyanate **81** (figure 78).

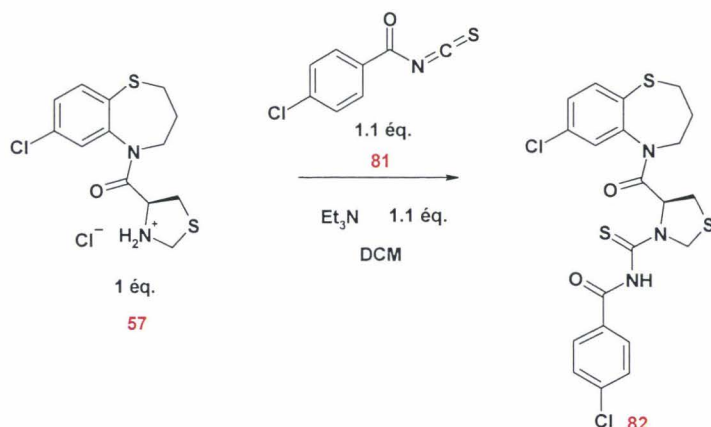


Figure 78. Qualification de la réaction de couplage sur un dérivé acylisothiocyanate.

Cet essai a été réalisé sur une faible quantité de dérivé aminé (3.32×10^{-4} mole), en présence de 1.1 équivalents d'acylisothiocyanates et d'une quantité équimolaire de

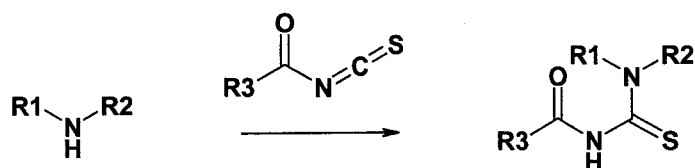
triéthylamine, le tout dans 5 mL de dichlorométhane. Après une heure d'agitation à température ambiante, la conversion, estimée par HPLC, est totale.

Après traitement du milieu réactionnel, le produit désiré a été obtenu avec un rendement de 67%.

2.3.2.2. Synthèse parallèle de 480 composés.

Sur la base des résultats obtenus avec la réaction test précédente, 5 plaques de 96 puits ont été construites, selon l'architecture 4 X 24 exposée dans le chapitre précédent.

Le schéma réactionnel pour chaque puits est le suivant :



Le contenu des cinq plaques est présenté à la figure 79.

Les résultats d'activité obtenus avec les quatre premières plaques vont permettre de formuler une première hypothèse quant à l'effet de la diversité imposée au noyau tétrahydrobenzazépine sur l'activité de ces composés.

Les résultats obtenus avec la cinquième plaque permettront d'estimer si une autre alternative que la *L*-proline comme acide aminé central formant le squelette des différentes molécules est envisageable.

Chapitre 2 : Conception et synthèse d'une chimiothèque focalisée sur la structure d'un antagoniste du récepteur d'une hormone peptidique.

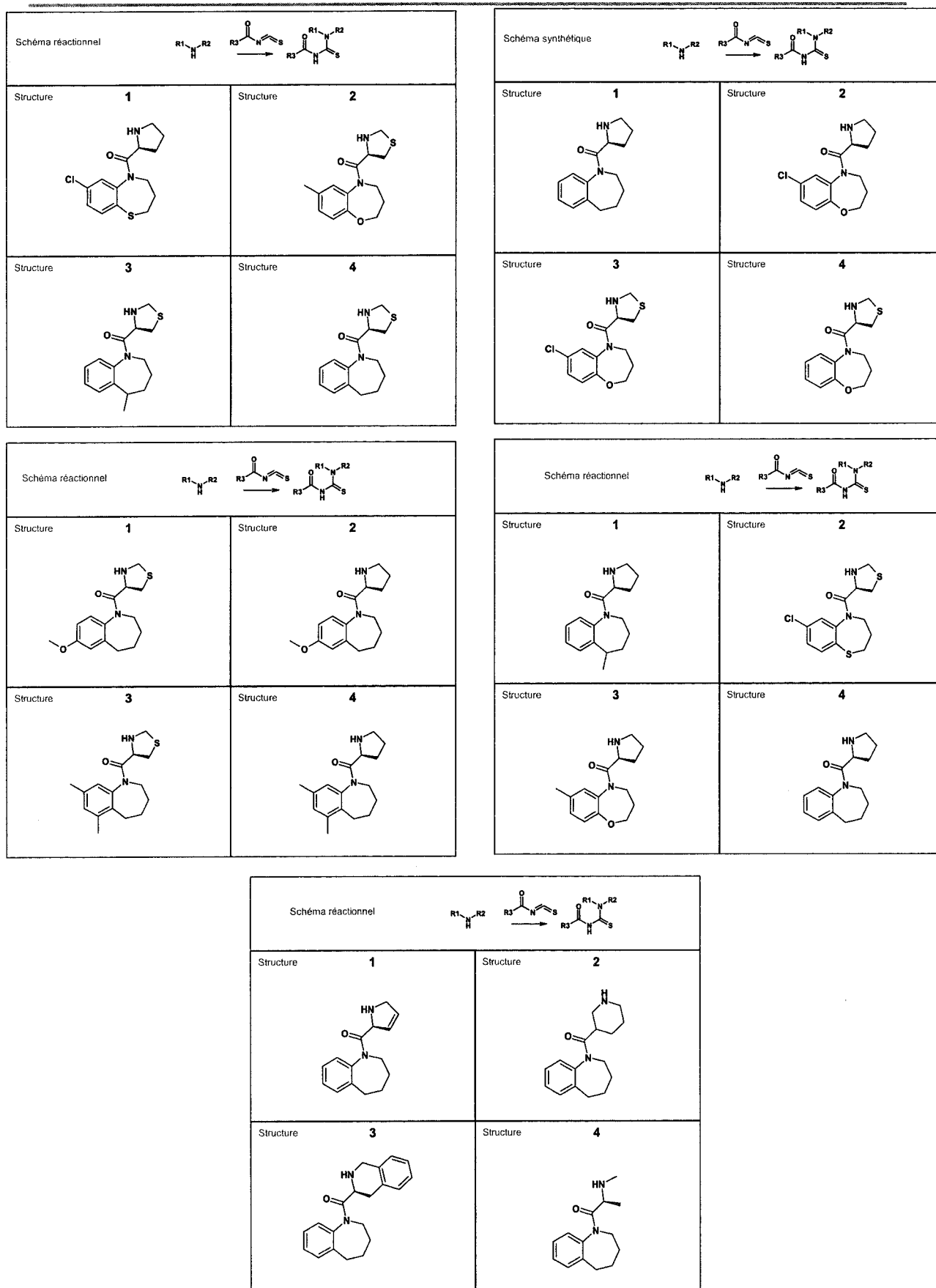


Figure 79. Présentation de l'architecture des cinq plaques synthétisées: 4 monomères aminés x 24 acylisothiocyanates, soit 96 composés différents par plaque.

2.3.2.3. Contrôle qualité de la chimiothèque.

		Plaques					Composés	
		1	2	3	4	5	Total	%
Pureté	n>70%	55	38	34	47	9	183	38
	70%>n>50%	40	56	59	47	78	280	58
	50%>n	1	2	3	2	9	17	4
	Total	96	96	96	96	96	480	100

Tableau 9. Résultats des puretés enregistrées pour la chimiothèque de 480 composés.

Le contrôle qualité des 480 composés issus de la réaction de couplage entre les différents monomères aminés et les acylisothiocyanates, a mis en évidence une proportion plus importante de composés de pureté comprise entre 50 et 70 % (généralement voisine de 60%) que de composés de pureté supérieure à 70% (tableau 9).

Cette observation peut s'expliquer par la présence de sous-produits provenant de la réaction de synthèse des acylacylisothiocyanates, qui n'ont pas été purifiés.

Ce paramètre a été pris en compte lors des tests biologiques réalisés sur ces composés. De plus, le contenu de chaque puits, présentant une activité, a été systématiquement confirmé par LC-MS. Le tableau 10, présente les spectrogrammes de masse obtenus pour quatre composés.

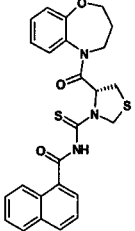
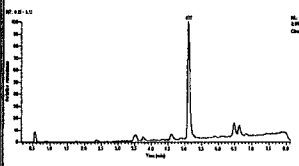
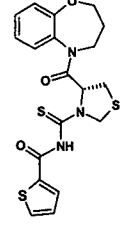
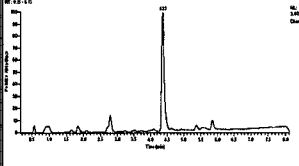
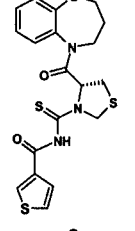
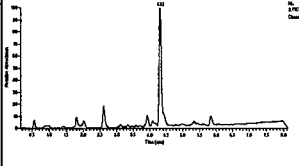
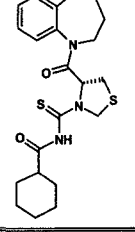
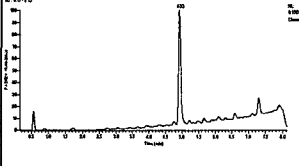
		Analyses			
		Contrôle HPLC du puits	Pureté à 254 nm (%)	MW	Masse trouvée
Composés			72,6	477,6	477,23
			70,2	433,6	433,23
			64,3	433,6	433,23
			78,5	433,6	433,25

Tableau 10. Analyses spectrométriques de 4 puits.

3. CONCLUSIONS.

L'objectif principal de ce travail a été la synthèse rationnelle d'une chimiothèque de 480 composés destinée à l'optimisation d'un hit obtenu par criblage systématique sur le récepteur GnRH.

L'étude rétrosynthétique de la structure de ce hit a permis d'envisager une stratégie de diversification des trois sous-unités structurales qui constituent le squelette de cette molécule. Cette étude a été présentée en trois volets dans ce paragraphe.

Dans une première partie nous nous sommes attachés au développement et à l'application d'un nouveau schéma synthétique de dérivés tétrahydrobenzazépines. Ceci a été réalisé à partir des différentes cétones oximes préalablement synthétisées et en présence d'hydrure de diisobutylaluminium. Cette synthèse a permis l'obtention de huit cycles azépiniques, avec des rendements compris entre 31 et 76%.

Le premier avantage de cette synthèse est qu'elle peut s'appliquer à un grand nombre de cétone oximes, dont celles traitées dans le chapitre suivant.

Cette synthèse a également pour avantage, en comparaison avec la transposition de Beckmann classique qui fait intervenir une étape supplémentaire de réduction, d'être « one-pot » et quantitative dans la plupart des cas. Elle peut s'avérer être un outil de choix dans la conception de dérivés benzazépiniques ou benzoxazépiniques, dont les squelettes sont rencontrés fréquemment dans les produits biologiquement actifs.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à la fonctionnalisation de ces structures, en étudiant l'acylation de l'amine secondaire du cycle azépinique, en présence de différents acides aminés et d'agents de couplage utilisés couramment en synthèse peptidique.

Cette seconde étude nous a permis de valider deux protocoles permettant l'accès rapide à 19 structures originales avec des rendements compris entre 12 et 86% selon les structures.

Enfin, dans une troisième partie, la stratégie utilisée en synthèse parallèle robotisée a conduit à la constitution d'une chimiothèque de 480 composés, présentant des puretés, dans la majeure partie des puits, supérieures à 70%.

Cette chimiothèque a fait l'objet de criblages sur le récepteur dans un test fonctionnel et dans un test d'inhibition de la liaison du ligand à son récepteur. Les informations de relation structure-activité nécessaires à l'élaboration d'une molécule tête de série, ont été tirées de ces résultats.

CHAPITRE 3 :

Conception, synthèse, étude structurale et
évaluation de nouvelles structures privilégiées.

1. INTRODUCTION.

1.1. Chimiothèques de nouvelle génération.

L'optimisation des composés issus des chimiothèques combinatoires de première génération s'est surtout heurtée à la mauvaise biodisponibilité de ces composés. Il est apparu assez rapidement que celle-ci n'était pas une propriété isolée mais, ayant un caractère générique, « contaminait » l'ensemble de la famille.

De ces observations sont issues des méthodes rapides d'évaluation des paramètres de DMPK ainsi que des règles prédictives comme la règle des 5 de Lipinski que nous évoquerons rapidement ci-dessous.

Cette stratégie, dans un premier temps a eu une vocation plus « curative » que « préventive », fournissant des règles utiles pour établir des priorités entre les « hits » issus du criblage ainsi que des directions au cours de leur optimisation ultérieure.

Une nouvelle stratégie très récente consiste à intervenir non plus après le criblage mais avant celui-ci en introduisant certaines contraintes dès la conception des chimiothèques, de telle sorte que les molécules qui en résulteront présentent directement des caractéristiques favorables à un développement pharmaceutique. Dans le travail que nous avons réalisé, nous avons voulu montrer qu'il était possible de prendre en compte également un second critère qui est d'augmenter le pourcentage de composés actifs en privilégiant les structures connues pour leur capacité d'interaction avec les cibles pharmacologiques importantes.

Des chimiothèques basées sur de telles structures seront particulièrement avantageuses au niveau des criblages primaires au cours desquels elles seront confrontées à une large diversité de récepteurs/enzymes. Elles permettront d'identifier directement des composés d'activité élevée dont l'optimisation par des modifications structurales généralement limitées permet d'accroître la sélectivité.⁵⁵

Après avoir rappelé rapidement ces différentes règles, nous montrerons comment nous avons conçu et synthétisé une chimiothèque satisfaisant simultanément les critères de « drugability » et de structure privilégiée.

1.1.1. La prise en compte de la « drugabilité ».

Au cours de la conception d'un médicament, l'activité pharmacologique et la spécificité des produits sont les principales propriétés optimisées, mais il faut aussi s'assurer que les molécules seront aussi solubles et biodisponibles. Il est donc de plus en plus

⁵⁵ Poulain R., Horvarth D., Bonnet B., Eckhoff C., Chapelain B., Bodinier M. C., Déprez B.; *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, pp 3391.

important de tenir compte très tôt de tous les paramètres physico-chimiques qui régissent la biodisponibilité des molécules synthétisées.

Des méthodes *in-vitro* ont été développées, elles permettent d'évaluer des paramètres liés à l'ADME (absorption, distribution, métabolisme et excrétion).

C'est ainsi que la biodisponibilité orale d'un produit est fonction de nombreux paramètres :

- Facteurs physiologiques (par ex. transport membranaire, vidange gastrique...)
- Facteurs pharmacocinétiques :
 - ❖ Métabolisme
 - ❖ Instabilité chimique
 - ❖ Efflux
 - ❖ Distribution et clairance
- Propriétés physico-chimiques :
 - ❖ Lipophilie
 - ❖ Solubilité
 - ❖ Ionisation
 - ❖ Poids moléculaire et forme
 - ❖ Potentiel de liaisons hydrogènes
- Formulation (taille de la particule, cinétique de dissolution,...).

Actuellement, le modèle des cellules Caco-2 est largement utilisé pour la modélisation de la perméabilité intestinale.⁵⁶

Un autre paramètre important est le métabolisme hépatique qui peut limiter considérablement la biodisponibilité orale. Grâce à l'emploi de microsomes hépatiques, il est possible de caractériser *in vitro* l'étendue de ce métabolisme oxydatif. La stabilité métabolique est évaluée par LC-MS après incubation des composés avec un mélange de microsomes hépatiques humains ou animaux⁵⁷. L'analyse par LC-MS-MS permet également de connaître la structure des métabolites.

De la même manière, des données sur les propriétés physico-chimiques des produits peuvent être calculées ou évaluées au moyen de tests rapides.

⁵⁶ Gres M. C., Julian B., Bourie M., Meunierv V., Roques C., Berger M., Boulenc X., Berger Y., Fabre G.; Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line : comparison with the parental Caco-2 cell line; *Pharm. Res.*, **1998**, *15*, pp 726-733.

⁵⁷ Kuhn W., Gieschen H.; Predicting the oral bioavailability of 19-nortestosterone progestins in vivo from their metabolic stability in human liver microsomal preparations in vitro; *Drug Metab. Dispos.*, **1998**, *26*, pp 1120-1127.

La solubilité peut être évaluée par des expériences de turbidimétrie⁵⁸. On peut l'évaluer en diluant une solution concentrée dans le DMSO soit dans un tampon à pH 7.4, soit dans le méthanol. La comparaison des concentrations en produit des surnageants aqueux et organiques, déterminable en spectrophotométrie couplée à l'HPLC, permet d'évaluer cette solubilité.⁵⁹

La lipophilie, représentée par le logP peut être calculée (clogP), ou déterminée expérimentalement par mesure spectrophotométrique. Les produits sont équilibrés entre le n-octanol et un tampon aqueux. La spectrophotométrie couplée à la LC-MS permet de calculer le logD⁶⁰ (mesure du logP à un pH donné), par comparaison des concentrations en produit des surnageants aqueux et organiques.

De plus en plus de programmes informatiques permettent de prédire le logP, le pKa et la surface polaire. Ces outils, à la disposition du chimiste médicinal, permettent désormais de diriger la conception d'une série chimique en prenant en compte très tôt ces critères.

1.1.2. La règle des 5.

Lors du criblage primaire de molécules sur des cibles pharmacologiques, on parle aussi de « HTS »⁶¹, l'objectif est de trouver une molécule possédant une affinité pour une cible. On appelle alors cette molécule un « hit ». L'optimisation de ce hit nécessite l'amélioration, en parallèle des propriétés pharmacodynamiques et des propriétés physico-chimiques, pour obtenir si cela est possible une bonne biodisponibilité orale. Plusieurs chercheurs ont réalisé des études statistiques sur les médicaments déjà sur le marché, en vue de connaître les différents paramètres physico-chimiques afin d'intégrer ces notions aux molécules synthétisées avant tout criblage.

Lipinski et al.⁵⁸ ont analysé les propriétés de biodisponibilité de composés mis sur le marché et ont identifié une série de paramètres structuraux corrélés aux capacités des structures à passer les épreuves de sélection préliminaires.⁶² De cette étude statistique sont présentés les quatre caractères structuraux critiques d'une molécule pour évaluer sa biodisponibilité. Si deux de ces caractères ne sont pas respectés, il est probable que la biodisponibilité en soit faible.

Ces quatre propriétés sont définies sous le nom de règle appelée « Règle des 5 ».

⁵⁸ Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J.; Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings; *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1997**, *23*, pp 3-25.

⁵⁹ Higuchi T., Shih F. M., Kimura T., Rytting J. H.; Solubility determination of barely aqueous-organic solids; *J. Pharm. Sci.*, **1979**, *68*, pp 1267-1272.

⁶⁰ Yazdanian M., Glynn S. L., Wright J. L., Hawi A.; Correlating partitioning and caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds; *Pharm. Res.*, **1998**, *15*, pp 1490-1494.

⁶¹ HTS = high throughput screening.

⁶² Lipinski C. A., Lombardo F., Feeney P. J.; Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings; *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1997**, *23*, pp 3-25.

Cette règle énonce qu'une faible absorption est plus probable quand un composé présente au moins deux de ces critères :

- Plus de 5 donneurs de liaisons hydrogènes
- Plus de 10 (2 x 5) accepteurs de liaisons hydrogènes
- Une masse moléculaire supérieure à 500 g.mol⁻¹
- Un clogP supérieur à 5

L'ensemble de ces caractéristiques est utilisé comme valeur d'alerte mais ne remplace nullement l'expérimentation.

1.1.3. L'incidence de la flexibilité.

Plus récemment, l'équipe de D. F. Veber chez GlaxoSmithKline a décrit un certain nombre de conditions pour une bonne biodisponibilité orale.⁶³ Ils ont étudié 1100 molécules des chimiothèques de GSK dont la biodisponibilité orale chez l'animal avait été évaluée. Ils ont calculé la flexibilité moléculaire (en pratique le nombre de liaisons possédant une rotation libre), et la surface polaire (en pratique le nombre total d'accepteurs et de donneurs de liaison H), et ce uniquement pour des molécules dont la biodisponibilité orale était supérieure à 20%.

De cette étude ressortent deux critères amenant à une biodisponibilité orale moyenne :

- un nombre de rotules, en général, inférieur à 10
- une surface polaire inférieure à 140 Å² soit un nombre d'accepteurs et de donneurs de liaison hydrogène inférieur à 12.

Il ressort également de cette étude que les composés biodisponibles respectant ces deux critères peuvent présenter une masse moléculaire supérieure à 500 Da (figure 80).

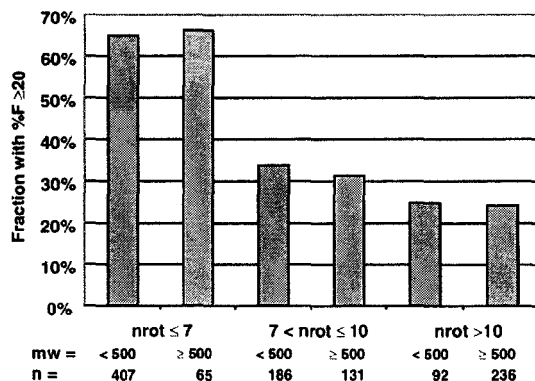


Figure 80. Distribution de la biodisponibilité (F%) chez le rat, des médicaments en fonction de leur poids moléculaire et de leur flexibilité.

⁶³ Veber D. F., Johnson S. R., Cheng H. Y., Smith B. R., Ward K. W. and Kopple K. D.; Molecular Properties that influence The Oral Bioavailability of Drug Candidates; *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, pp 2615-2623.

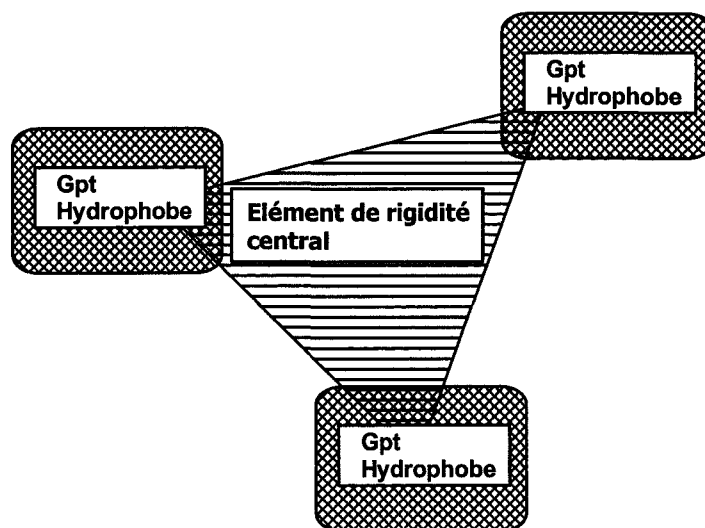
Cette étude met aussi en évidence que la surface polaire est mieux corrélée à la perméabilité au travers de membranes que le logP.

Il apparaît aussi que les contraintes conformationnelles sont souvent bénéfiques ce qui est à rapprocher du concept de « privileged structure », ou « structure privilégiée »,⁶⁴ qui est donné aux sous-structures conférant à la molécule des propriétés particulières (souvent « drug-like »).

1.2. Notion de « structure privilégiée ».

1.2.1. Définition.

Le terme de structure privilégiée a été introduit par Evans et al. en 1988⁶⁴, après une étude sur les benzodiazépines et il est utilisé pour définir une structure constituée d'une architecture semi-rigide présentant des groupements hydrophobes. Ces propriétés permettent à ce type de molécules de se lier à un grand nombre de récepteurs très divers. La rigidité de la structure interdit le repliement de la molécule sur elle-même lorsqu'elle est mise en solution dans l'eau (collapse hydrophobe).



Architecture d'une structure privilégiée :

Présentation de **groupements hydrophobes** introduits autour d'un **élément de rigidité central** empêchant le repliement de la molécule.

⁶⁴ Evans B. E., Rittle K. E., Bock M. G., DiPardo R. M., Freidinger R. M., Whitter W. L., Lundell G. F., Veber D. F., Anderson P. S., Chang R. S. L., Lotti V. J., Cerino D. J., Chen T. B., Kling P. J., Kunkel K. A., Springer J. P., Hirshfield J.; *J. Med. Chem.*, **1988**, *31*, pp 2235.

1.2.2. Présentation de structures privilégiées.

Depuis l'apparition de cette terminologie, de nombreux groupes ont présenté des structures remplissant ces caractéristiques et appartenant à de nombreux composés biologiquement actifs. Par exemple, les structures de type 1,4-benzodiazépin-2-one,^{61,65} biphenyle,⁶⁶ 1,4-dihydropyridine,⁶⁷ benzopyrane,⁶⁸ spiropipéridine,^{61,69} et indole^{61,60,70} ont toutes été décrites comme étant des structures privilégiées. La figure 81 reprend des exemples parmi les principales structures publiées.

⁶⁵ Patchett A. A. and Nargund R. P.; Privileged structures-An Update; *Ann. Rep. Med. Chem.*, **2000**, *35*, pp 289-298.

⁶⁶ Hajduk P. J., Bures M., Praestgaard J. and Fesik S. W.; Privileged Molecules for Protein Binding Identified from NMR-Based Screening; *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, pp 3443 – 3447.

⁶⁷ Jacobson K. A., Kim Y.-C. and King B. F.; In search of selective P2 receptor ligands: interaction of dihydropyridine derivatives at recombinant rat P2X₂ receptors; *J. Auton. Nerv. Syst.*, **2000**, *81*, pp 152-157.

⁶⁸ Nicolaou K. C., Pfefferkorn J. A., Roecker A. J., Cao G. Q., Barluenga S., Mitchell H. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, pp 9939.

⁶⁹ Mason J. S., Morize I., Menard P. R., Cheney D. L., Hulme C. and Labaudiniere R. F.; New 4-Point Pharmacophore Method for Molecular Similarity and Diversity Applications: Overview of the Method and Applications, Including a Novel Approach to the Design of Combinatorial Libraries Containing Privileged Substructures; *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, pp 3251-3264.

⁷⁰ Austin J. F. and MacMillan D. W. C.; Enantioselective Organocatalytic Indole Alkylations. Design of a New and Highly Effective Chiral Amine for Iminium Catalysis; *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, pp 1172-1173.

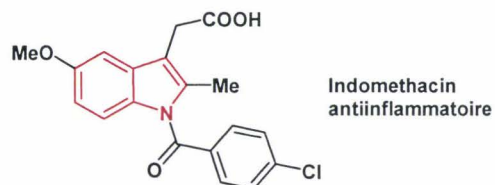
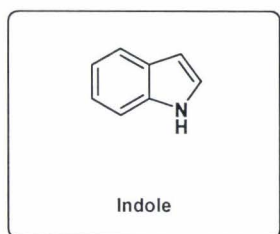
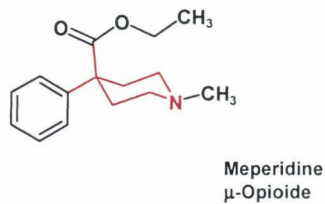
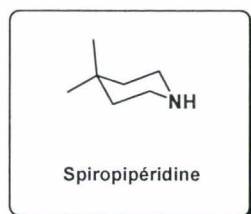
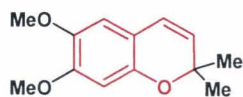
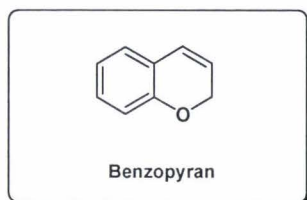
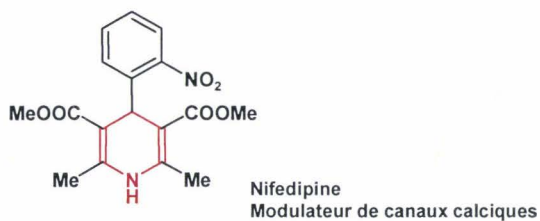
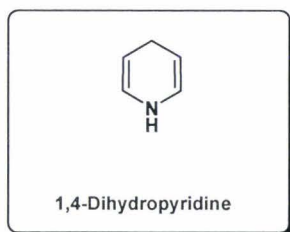
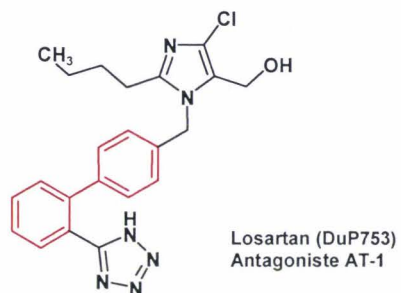
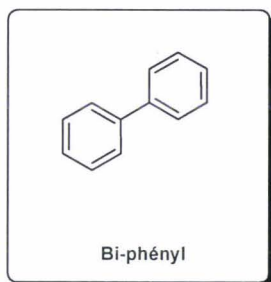
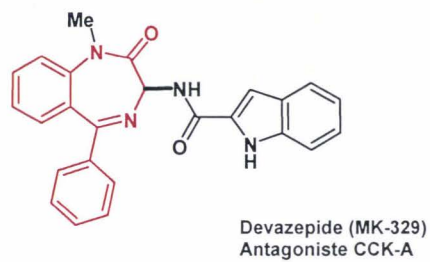
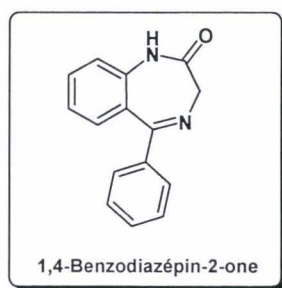


Figure 81. Présentation de quelques structures privilégiées issues de la littérature.

1.3. Validation de nouvelles structures privilégiées par la conception d'une chimiothèque.

Le choix du motif de base (figure 82) de notre chimiothèque a tiré partie du travail réalisé et présenté dans le deuxième chapitre.

Outre la 1,4-benzodiazépin-2-one, les hétérocycles constitués d'un cycle aromatique fusionné à un cycle aliphatique à sept chaînons avec au minimum un azote (benzazépines, benzoxazépines, benzothiazépines, 1,5-benzodiazépines) sont des structures que l'on retrouve dans un grand nombre de molécules biologiquement actives.

On retrouve des structures de type benzazépines en tant qu'agonistes et antagonistes des récepteurs à la vasopressine (V_{1a} et V_2),⁷¹ des benzoxazépines dans des inhibiteurs de la transcriptase inverse de HIV.⁷² Des benzoxazépines et des benzothiazépines sont également présentes dans des composés responsables de l'ouverture de canaux potassiques,⁷³ ou comme ligands des récepteurs 5-HT_{1A}.⁷⁴

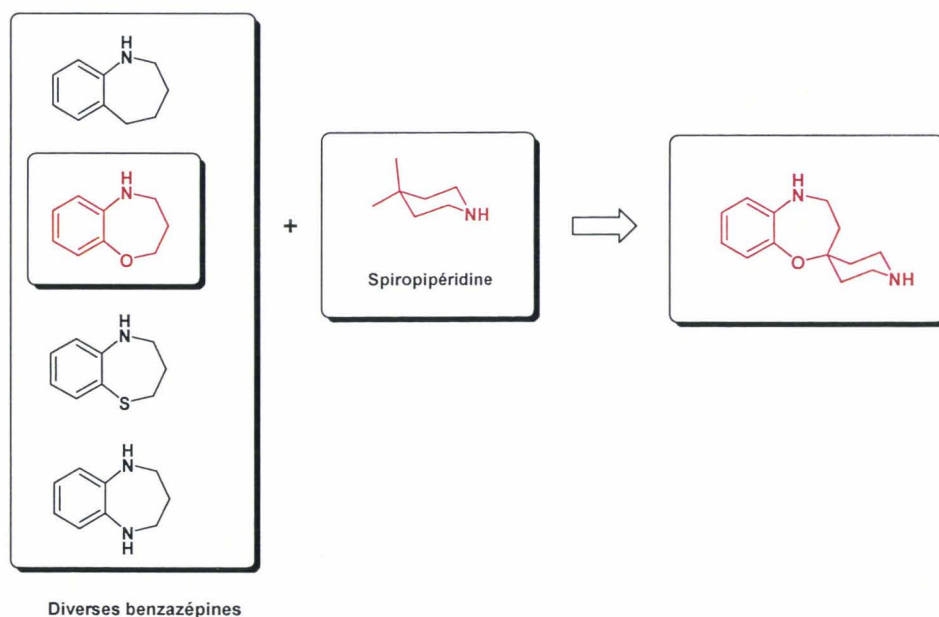


Figure 82. Approche de la conception du squelette 4,5-dihydro-3H-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine]

⁷¹ Trybulski E. J., *Ann. Rep. Med. Chem.*, **2001**, *36*, pp 159-168.

⁷² Campiani G., Morelli E., Fabbrini M., Nacci V., Greco G., Novellino E., Ramunno A., Maga G., Spadari S., Caliendo G., Bergamini A., Faggioli E., Uccella I., Bolacchi F., Marini S., Coletta M., Nacca A. and Caccia S.; Pyrrolbenzoxazepinone Derivatives as Non-Nucleoside HIV-1 RT Inhibitors: Further Structure-Activity Relationship Studies and Identification of More Potent Broad-Spectrum HIV-1 RT Inhibitors with Antiviral Activity; *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, pp 4462-4470.

⁷³ Matsumoto Y., Tsuzuki R., Matsuhisa A., Yoden T., Yamagiwa Y., Yanagisawa I., Shibamura T. and Nohira H.; Novel potassium channel openers. Part 4: transformation of the 1,4-benzoxazine skeleton into 1,4-benzothiazine, 1,2,3,4-tetrahydroquinoline, 1,2,3,4-tetrahydroquinoxaline, indoline, and 1,5-benzoxazepine; *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, *8*, pp 393-404.

⁷⁴ Mátyus P., Varga I., Zára E., Mezei A., Behr Á., Simay A., Haider N., Boros S., Bakonyi A., Horváth E. and Horváth K.; Novel pyridazino[4,5-b][1,5]oxazepines and -thiazepines as 5-HT_{1A} receptor ligands; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *7*, pp 2857-2862.

Un autre paramètre essentiel que nous avons souhaité voir figurer dans notre structure est le carbone spiranique favorisant la rigidification du squelette.

Une étude bibliographique nous a permis de constater que dans les molécules ayant une activité et possédant un carbone spiranique, l'activité était liée généralement à un conformère particulier de la molécule. En effet pour obtenir une activité sur un récepteur, il est important de « remplir » un maximum de poches de liaisons du récepteur et de réaliser les bonnes interactions avec celui-ci, interactions dans les trois dimensions de l'espace. On comprend alors que nos structures ne doivent pas rester planes, et comme on a pu le voir précédemment, ne doivent pas être trop flexibles. On retrouve ces caractéristiques dans le cycle pipéridinique lié par un carbone spiranique à un autre cycle, qui permet une orientation perpendiculaire des deux cycles (figure 83):

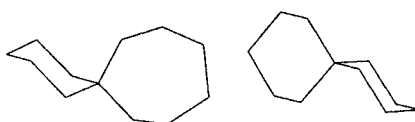


Figure 83. Schéma de l'orientation perpendiculaire des deux cycles liés par un carbone spiranique.

Dans la littérature, on retrouve ces cycles spiropipéridiniques associés à des hétérocycles à six ou sept sommets. Dans une étude sur l'activité de ce type de molécules sur le récepteur 5-HT_{1A}, Mokrosz et al. montrent l'importance de la conformation d'une spiro-pipéridine pour la présentation du doublet non liant de l'azote qui se traduit par une variation de l'activité.⁷⁵ On retrouve le même type de conclusion pour des composés dotés d'activité sécrétagogue de la GH.⁷⁶

Cette caractéristique conformationnelle du carbone spiranique, est très utile pour la synthèse d'analogues de composés actifs possédant une conformation particulière. C'est le cas pour la synthèse d'analogues de la morphine.⁷⁷ Mais l'activité que l'on retrouve le plus pour des analogues de notre molécule-type, est l'affinité spécifique pour les récepteurs Sigma.^{78,79,80} Ces derniers sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G, et l'activité de ces analogues sur les récepteurs Sigma 1 ont fait l'objet de plusieurs brevets. Heureusement, notre schéma-type de molécule n'est pas revendiqué dans ces brevets.

⁷⁵ Mokrosz M. J., Duszynska B., Bojarski A. J. and Mokrosz J. L.; Structure-Activity Relationship Studies of CNS Agents-XVII. Spiro[Piperidine-4',1-(1,2,3,4-Tetrahydro-β-Carboline)] as a Probe Defining the Extended Topographic Model of 5-HT_{1A}; *Bioorg. Med. Chem.*, **1995**, *3*, pp 533-538.

⁷⁶ Lihu Y., Morriello G., Prendergast K., Kang C., Jacks T., Chan W. W., Schlem K. D., Smith R. G. and Patchett A. A.; Potent 3-spiropiperidine growth hormone secretagogues; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, pp 107-112.

⁷⁷ Tsai Y.-C., Liou J.-P., Liao R., Cheng C.-Y. and Tao P.-L.; C-Alkylated spiro[benzofuran-3(2H),4'-1'-methyl-piperidine-7-ols] as potent opioids: A conformation-activity study; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, pp 1813-1818.

⁷⁸ Mehrotra M. M., Heath J. A., Rose J. W., Smyth M. S., Seroogy J., Volkots D. L., Ruhter G., Schotten T., Alaimo L., and Park G.; Spirocyclic nonpeptide glycoprotein IIb-IIIa antagonists. Part 3: synthesis and SAR of potent and specific 2,8-diazaspiro[4.5]decanes; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, pp 1103-1107.

⁷⁹ Quaglia W., Giannella M., Piergentili A., Pignini M., Brasili L., Di Toro R., Rossetti L., Spampinato S., and Melchiorre C.; 1'-Benzyl-3,4-dihydrospiro[2H-1-benzothiopyran-2,4'-pipéridine] (Spipethiane), a Potent and Highly Selective Ligand; *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, pp 1557-1560.

⁸⁰ Chambers M. S. et al.; *J. Med. Chem.*, **1992**, *35*, pp 2033-2039.

Dans une approche thermodynamique des critères que nous venons de développer concernant l'activité, on peut écrire sous forme d'équations, l'affinité d'un ligand pour son récepteur :



Avec $\Delta G = -RT \cdot \ln K$ et $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

On retrouve alors dans la grandeur ΔH (enthalpie), les différentes interactions du ligand avec son récepteur par liaison hydrogène (règle des trois) et dans ΔS , la notion de rigidité de la molécule. En effet, en interaction avec son récepteur, le ligand n'adopte qu'une seule conformation. Si en solution ce même ligand possède un grand nombre de conformations, la perte d'entropie lors de la liaison est importante, $\Delta S \ll 0$, ce qui entraîne un ΔG moins important en valeur absolue, et par conséquent, une constante d'affinité K plus faible.

L'expérience nous enseigne que la rigidité des structures, de même que les groupements pharmacophores qu'elles portent sont essentiels à l'affinité pour le récepteur. L'application des règles thermodynamiques confirme cette double dépendance de l'affinité vis-à-vis du nombre de conformations et des forces d'interactions ligand-récepteur.

De plus, les molécules qui en résultent ont un nombre très limité de libres rotations et entrent en général dans le cadre des règles de Lipinski.

2. PRESENTATION DU SCHEMA SYNTHETIQUE.

2.1. Présentation des voies de synthèse envisagées.

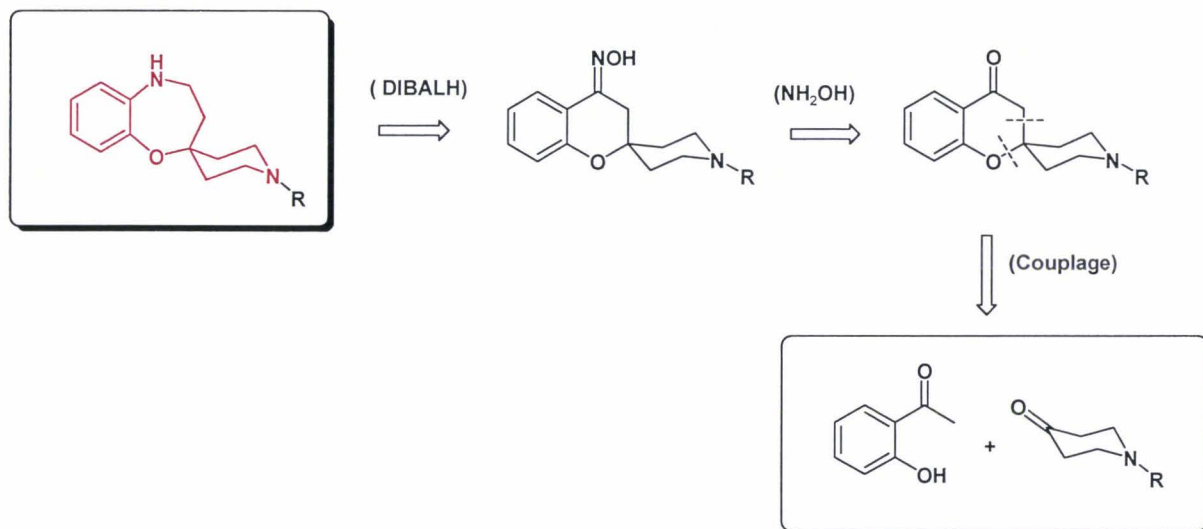


Figure 84. Schéma rétro-synthétique envisagé pour la synthèse de structures 4,5-dihydro-3H-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine].

Le schéma de rétrosynthèse envisagée pour la formation de structures spiro[benzoxazépine-pipéridine] est présenté à la figure 84. Il comporte trois étapes :

- Une extension de cycle de « type Beckmann », en présence de DIBALH, présentée et étudiée dans le second chapitre.
- Une synthèse d'oxime à partir de dérivés chromanones.
- Une condensation de l'hydroxyacétophénone avec une pipéridone substituée sur l'azote par un groupement protecteur pour donner le dérivé chromanone.

Les points clefs de cette synthèse qui vont être traités dans la suite de ce chapitre sont le choix du groupement protecteur de la pipéridone et le comportement de ce type de structures en présence d'un réducteur comme le DIBALH.

2.2. Choix du groupement protecteur.

Le choix du groupement protecteur de l'azote de la pipéridone s'est porté sur le groupement benzyle et sur le groupement *t*-butoxycarboxyle. Les deux premières étapes : la condensation et la synthèse de l'oxime de la cétone ont été conduites avec ces deux fonctions.

La dernière étape d'extension de cycle en présence de DIBALH a orienté notre choix pour l'un des deux substituants.

2.2.1. Première étape : synthèse des dérivés [chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one .

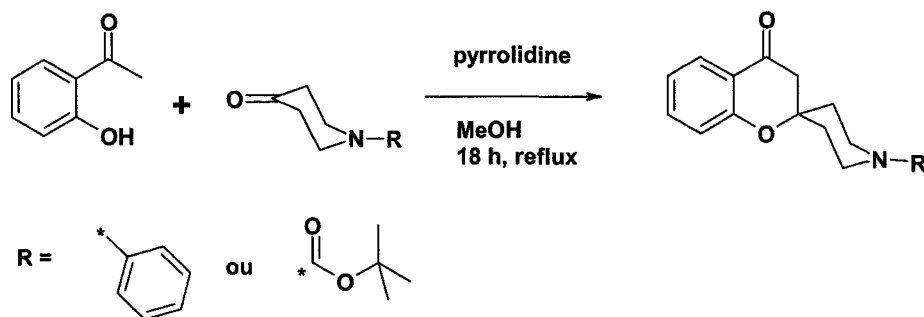


Figure 85. Réaction de condensation.

La première étape de cette synthèse consiste en la condensation d'une cétone (bi-électrophile), sur une *ortho*-hydroxyacétophénone (bi-nucléophile 1,5). Cette réaction se déroule à reflux dans le méthanol en présence de pyrrolidine. La pyrrolidine intervient ici comme catalyseur, afin d'engendrer une énamine plus nucléophile que la cétone (figure 85).

Les dérivés [chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one (figure 86) sont obtenus dans ces conditions avec un rendement quantitatif et une pureté supérieure à 95 % et sont utilisables sans aucune purification pour l'étape suivante. La synthèse de ce type de composés a déjà été employée et publiée, notamment par Burbaum et al.⁸¹

Résultats :

- Etape quantitative.
- Obtention de produits purs (>95%) après évaporation et lavages.
- Passage à l'étape suivante sans autre purification.

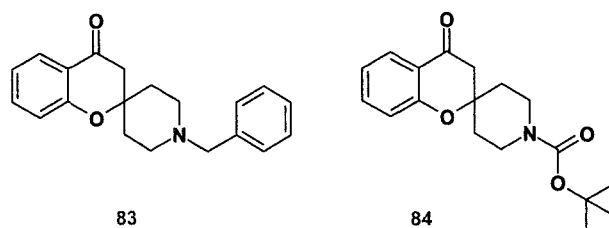


Figure 86. Molécules synthétisées.

⁸¹ Burbaum J. J., Ohlmeyer M. H., Reader J. C., Henderson I., Dillard L. W., Li G., Randle T., Siagal N. H., Chelsky D., Baldwin J. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1995**, *92*, pp 6027-6031.

Mécanisme réactionnel :

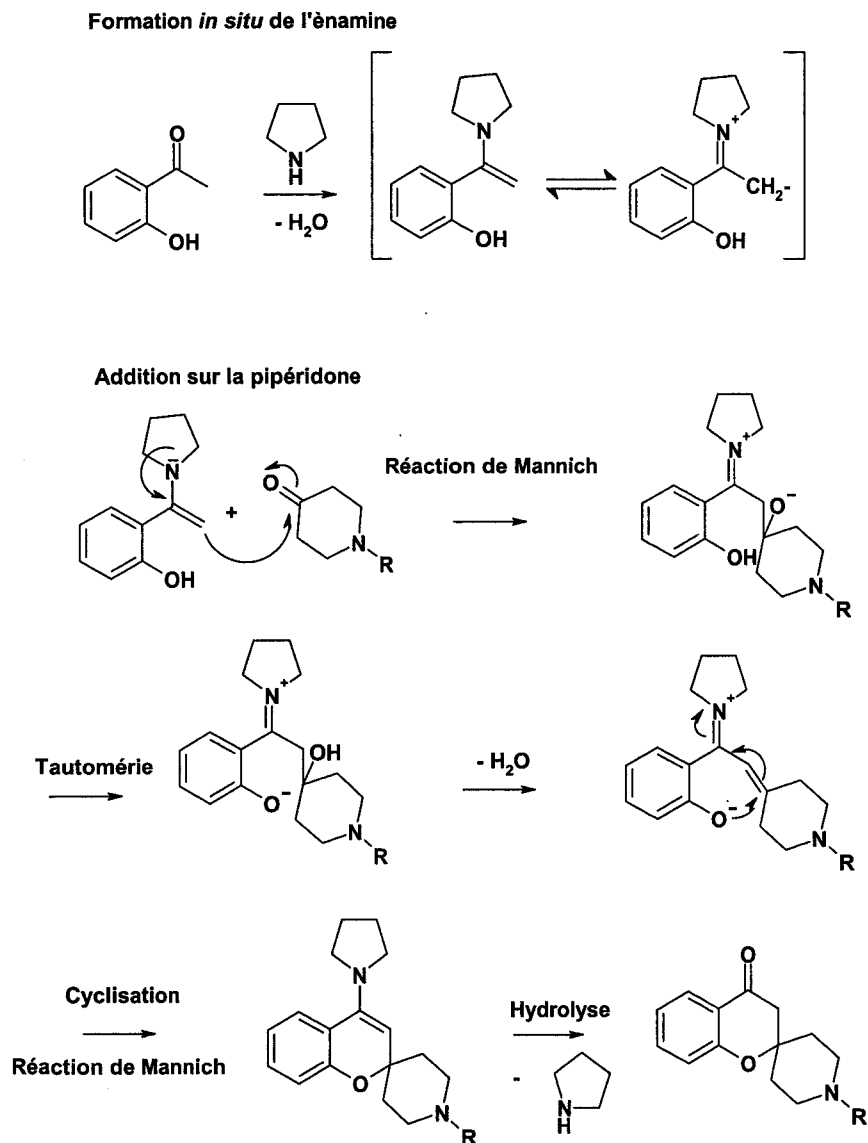


Figure 87. Mécanisme réactionnel de la synthèse des dérivés [chromène-2,4'-pipéridin]-4(3H)-one.

2.2.2. Synthèse des dérivés [chromène-2,4'-pipéridin]-4(3H)-one oxime.

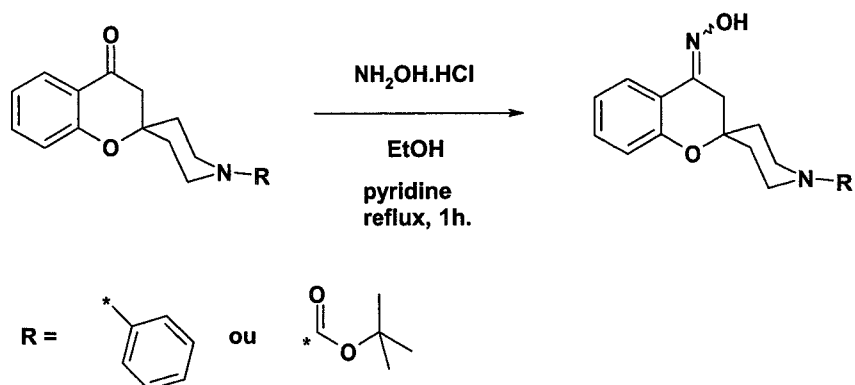


Figure 88. Schéma synthétique des dérivés [chromène-2,4'-pipéridin]-4(3H)-one oxime.

La synthèse des dérivés [chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one oxime (figure 89) est réalisée selon la méthode b décrite dans le second chapitre (figure 88). Cette étape est également quantitative et le produit est obtenu avec une pureté supérieure à 95%.

Résultats :

- Etape quantitative.
- Obtention d'un produit pur (>95%) après évaporation, lavages et recristallisation.
- Pas de réactions secondaires ou de dégradation dans le milieu réactionnel.
- Passage à l'étape suivante sans purification intermédiaire.

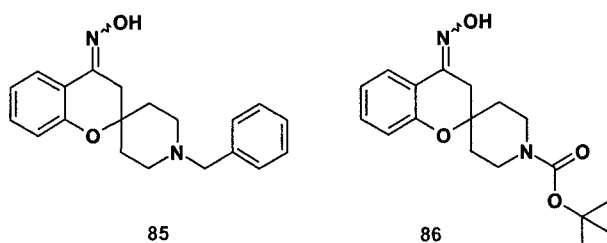


Figure 89. Molécules synthétisées.

2.2.3. Extension de cycle.

2.2.3.1. A partir du dérivé *N*-Boc-pipéridone.

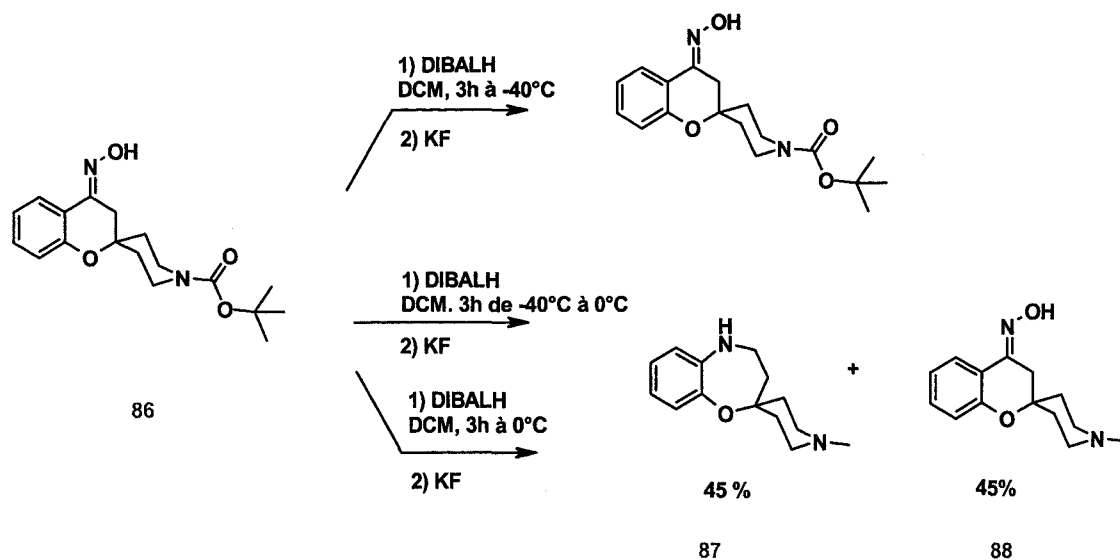


Figure 90. Extension de cycle au DIBALH à partir du dérivé *N*-Boc-pipéridone.

L'extension de cycle du composé protégé par un groupement Boc a tout d'abord été réalisée dans les conditions mises au point dans le second chapitre : 4.8 équivalents de DIBALH dans le dichlorométhane anhydre à une température de 0°C pendant trois heures. Les produits obtenus après traitement de la réaction montrent que l'extension de cycle s'est

produite mais de façon non quantitative puisque une partie du DIBALH a été consommée pour réduire la fonction Boc en méthyle. Des essais réalisés en commençant tout d'abord la réaction à -40°C puis en élevant progressivement la température jusqu'à 0°C sur une période de trois heures et ensuite en ne travaillant qu'à une température de -40°C ont conduit dans le premier cas aux mêmes résultats que la première tentative (0°C pendant 3h) et dans le second cas à une absence totale de produit de réaction (figure 90).

Ces essais réactionnels permettent de conclure que la réduction du groupement Boc se fait avec une cinétique plus rapide que la réaction d'extension de cycle, et que d'autre part l'extension de cycle ne peut se réaliser qu'à une température proche de 0°C .

Le groupement Boc ne présente donc pas les caractéristiques d'une protection adéquate pour ce type de réaction.

2.2.3.2. A partir du dérivé *N*-benzyl-pipéridine.

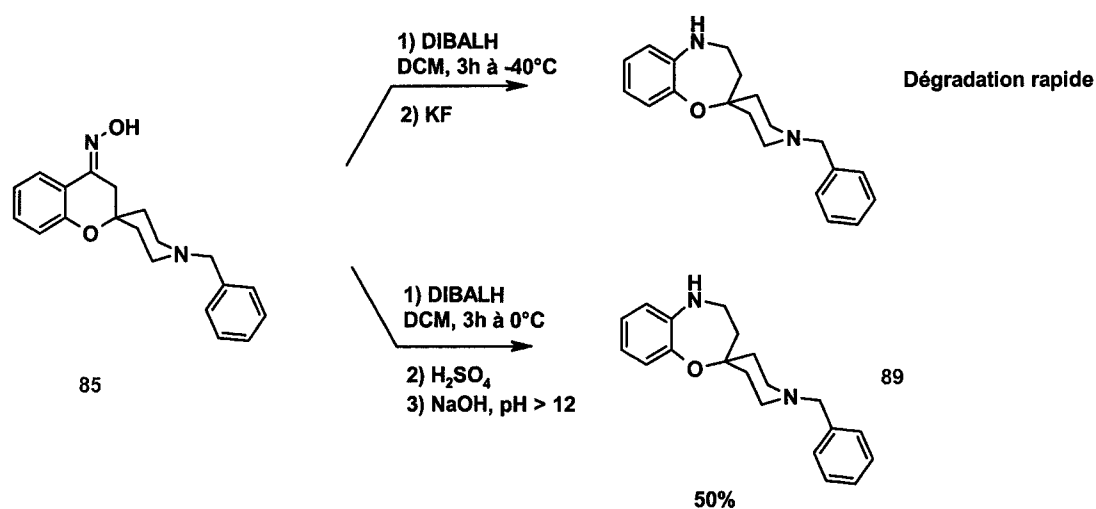


Figure 91. Extension de cycle au DIBALH à partir du dérivé *N*-benzyl-pipéridine.

Les résultats obtenus à partir du composé portant le groupement protecteur benzylique ont été plus satisfaisants. Le problème rencontré lors de la mise en œuvre de cette réaction (figure 91) a été une dégradation rapide du brut réactionnel lors de la coupure de la liaison azote-aluminium par le fluorure de potassium. Le recours à une solution d'acide sulfurique à 20%⁸² a permis l'hydrolyse du composé sans obtenir de dégradation lors de l'étape de retraitement. Le produit d'extension de cycle désiré est alors extrait sous forme libre par l'acétate d'éthyle après alcalinisation du milieu par ajout d'une solution de soude à 30%.

⁸² Glass R. S., Sabahi M., and Singh W. P.; A New Synthesis of 2-Substituted 6-*endo*(Methylthio)bicyclo[2.2.1]heptanes. Synthesis and Crystal and Molecular Structure of a Conformationally Restricted Methionine; *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, pp 2683-2688.

Résultats :

- Rendement = 50%.
- La LC-MS du composé obtenu à une longueur d'onde de 215 nm révèle la présence d'un produit d'une pureté de 95% dont la masse moléculaire est 308. La RMN de ce composé confirme la synthèse du produit attendu. Le rendement global des trois étapes est de 40%.

3. ETUDE DE LA REACTIVITE DU DERIVE SPIRO[1,5-BENZOXAZEPINE-2,4'-N-BENZYL-PIPERIDINE] ET DE SA DIVERSIFICATION.

Afin de valoriser au mieux cette structure de base pour générer des chimiothèques, il était nécessaire de démontrer la possibilité d'y introduire des éléments de diversité. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la réactivité de l'azote du cycle aliphatique à sept chaîons, dont la position adjacente au cycle aromatique laissait présager une réactivité faible dans ces réactions mettant en jeu uniquement la nucléophilie de l'azote, ce que nous avons observé précédemment. Par contre, la possibilité de conjugaison avec le cycle aromatique, permettait d'attendre un comportement favorable de ce type de structures dans une réaction d'amination réductrice faisant intervenir une espèce de type iminium. Des réactions d'alkylation comme l'amination réductrice, et des réactions d'acylation en présence de chlorures d'acides ont été entreprises et validées.

Dans un second temps, une chimiothèque de composés diversement substitués sur le cycle aromatique fusionné au cycle aliphatique a été construite.

Enfin, nous avons étudié la déprotection de l'azote de la pipéridine et son utilisation en temps que point d'ancrage dans la synthèse d'une chimiothèque focalisée autour de cette structure rigide.

Les différentes étapes de cette approche sont détaillées dans cette partie.

3.1. Etude de la réactivité de l'azote benzoxazépinique.

3.1.1. Réaction d'alkylation.

La réaction d'alkylation choisie a été l'amination réductrice en présence d'un aldéhyde et d'un réducteur spécifique des imines : le triacétoxyborohydrure de sodium. Cette réaction a été choisie puisque une grande diversité d'aldéhydes, de réactivité très homogène est disponible commercialement et représente une source de pharmacophores potentiels.

D'autre part, la réaction d'alkylation faisant intervenir des halogénures est très dépendante de la nature des substituants, à la fois portés par le nucléophile et par l'halogénure. Elle est donc d'usage moins commode en chimie parallèle.

Le schéma synthétique de la réaction d'amination réductrice est illustré en figure 92.

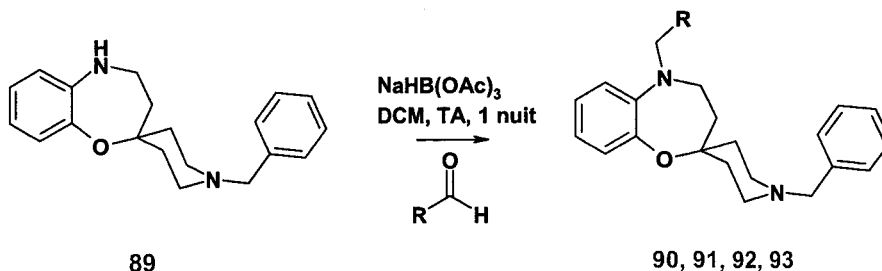


Figure 92. Schéma réactionnel de l'amination réductrice à partir du spiro[benzoxazépine-pipéridine].

Les rendements obtenus sont corrects, l'iminium formé par l'attaque nucléophile de l'azote sur le carbone électrophile de l'aldéhyde est stabilisé par effet de mésomère avec le cycle aromatique en position α .

Les structures obtenues avec différents aldéhydes sont présentées dans le tableau 11.

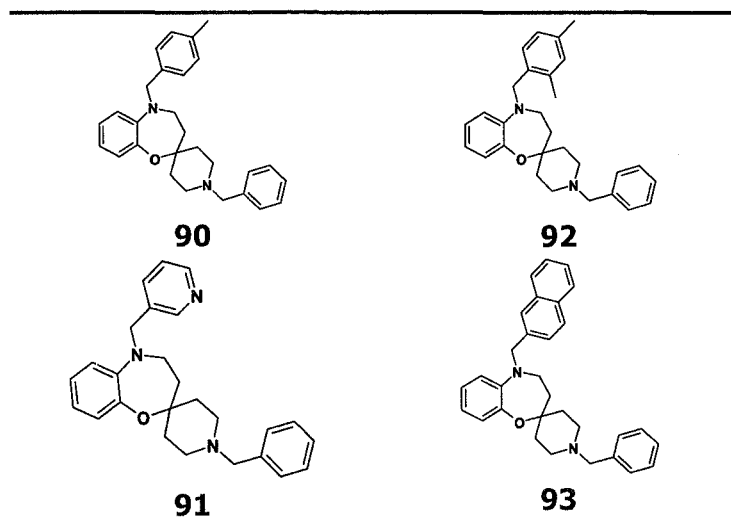


Tableau 11. Produits d'amination réductrice.

3.1.2. Réaction d'acylation.

A la différence des halogénures d'alkyle, les halogénures d'acyle sont plus réactifs et montrent également une réactivité plus homogène.

De la même façon, plusieurs chlorures d'acides ont été couplés à la structure spiro[benzoxazépine-pipéridine] dans les conditions classiques. (figure 93)

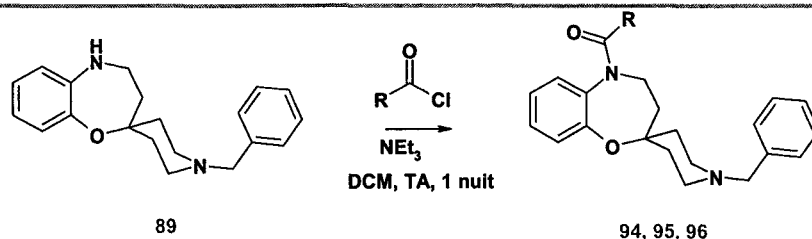


Figure 93. Schéma réactionnel de la réaction d'acylation.

Les structures obtenues sont présentées dans le tableau 12.

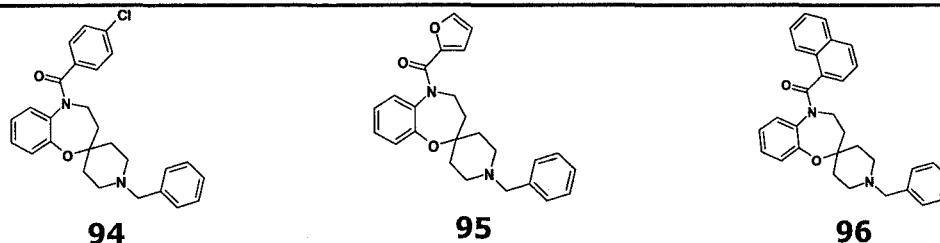


Tableau 12. Produits d'acylation.

3.2. Apport de diversité sur le noyau aromatique.

3.2.1. Synthèse d'une chimiothèque.

Une chimiothèque de dix dérivés spiro[benzoxazépine-pipéridine] substitués sur le noyau aromatique par un ou plusieurs groupements a été préparée à partir de 10 dérivés *ortho*-hydroxyacétophénone commerciaux. La synthèse des différents composés présentés dans le tableau 13 a été réalisée en reprenant le même schéma réactionnel que celui présenté dans le chapitre 2, à savoir :

- Synthèse du dérivé spiro[chromanone-pipéridine] à partir de la *N*-benzyl-pipéridone.
- Formation de l'oxime.
- Extension de cycle en présence de DIBALH.

Résultats:

Les résultats sont regroupés dans le tableau 13.

Les deux premières étapes de la synthèse sont quantitatives quelle que soit l'hydroxyacétophénone de départ.

Lors de la réaction d'extension de cycle, seuls les dérivés naphthaléniques se sont révélés instables. La présence de nombreux sous-produits n'a pas permis d'isoler ces composés après purification par chromatographie sur gel d'alumine.

Pour les autres dérivés, les rendements calculés sur les trois étapes varient entre 32 et 45%.

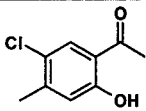
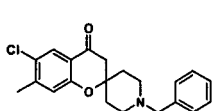
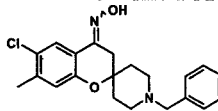
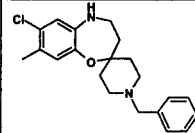
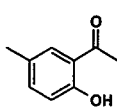
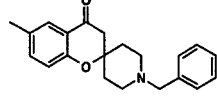
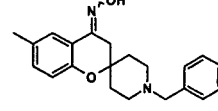
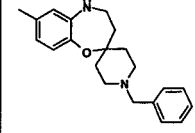
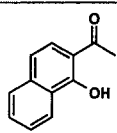
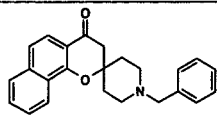
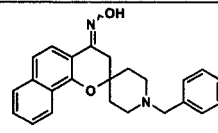
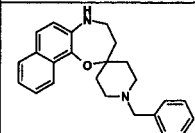
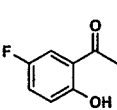
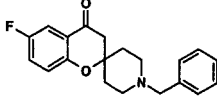
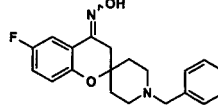
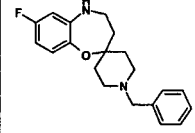
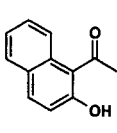
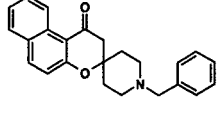
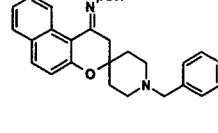
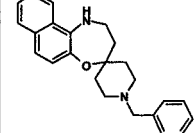
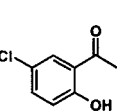
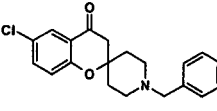
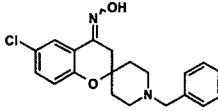
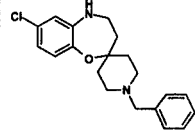
cétones commerciales	Nom	N°	cétone	N°	oxime	N°	benzoxazépine	R %
	5'-chloro-2'-hydroxy-4'-méthyl-acétophénone	97		103		109		45
	2'-hydroxy-5'-méthyl-acétophénone	98		104		110		35
	2-acétyl-1-naphthol	99		105		111		0
	5'-fluoro-2'-hydroxy-acétophénone	100		106		112		40
	1-acétyl-2-naphthol	101		107		113		34
	5'-chloro-2'-hydroxy-acétophénone	102		108		114		32

Tableau 13. Résultats des synthèses réalisées à partir des hydroxyacétophénones commerciales.

Ces composés synthétisés présentent donc une diversité structurale apportée par les substituants du cycle aromatique de la benzoxazépine : halogènes (F, Cl), méthyle et méthoxy. A l'exception des dérivés chlorés, qui peuvent être en théorie engagés dans une réaction de couplage croisé, ces dérivés ne présentent pas de fonction réactive sur le noyau aromatique, susceptible d'apporter un nouveau point d'ancrage.

Nous avons donc entrepris la synthèse des dérivés spiro[benzoxazépine-pipéridine] portant une fonction hydroxyle.

3.2.2. Synthèse du 7-(benzyloxy)-1'-benzyl-4,5-dihydro-3H-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine].

3.2.2.1. Etape de protection.

La 2',4'-dihydroxyacétophénone et la 2',5'-dihydroxyacétophénone ont été mises en présence d'une base, le bicarbonate de potassium, et de bromure de benzyle afin de réaliser la mono-alkylation de la fonction hydroxy en position para et méta, respectivement, de la fonction cétonique. (figure 94)

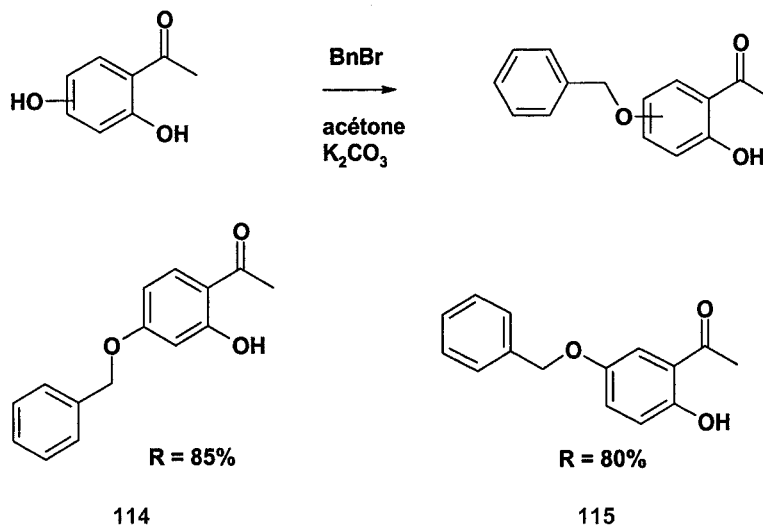


Figure 94. Schéma synthétique de la réaction de monoalkylation d'une fonction hydroxy des dihydroacétophénone.

3.2.2.2. Synthèse des intermédiaires chromanones et oximes.

Les composés spiro[chromanone-pipéridine] correspondants ont été synthétisés selon le même protocole décrit auparavant. Les oximes correspondantes ont également été synthétisées, afin d'entreprendre la réaction d'extension de cycle en présence de DIBALH (figure 95). Les rendements de ces deux étapes ont été quantitatifs.

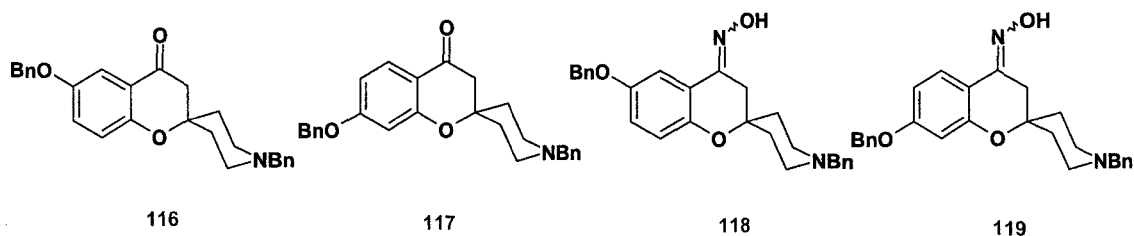


Figure 95. Cétones et oximes intermédiaires obtenus à partir des dihydroacétophénone monoprotégées.

3.2.2.3. Extension de cycle.

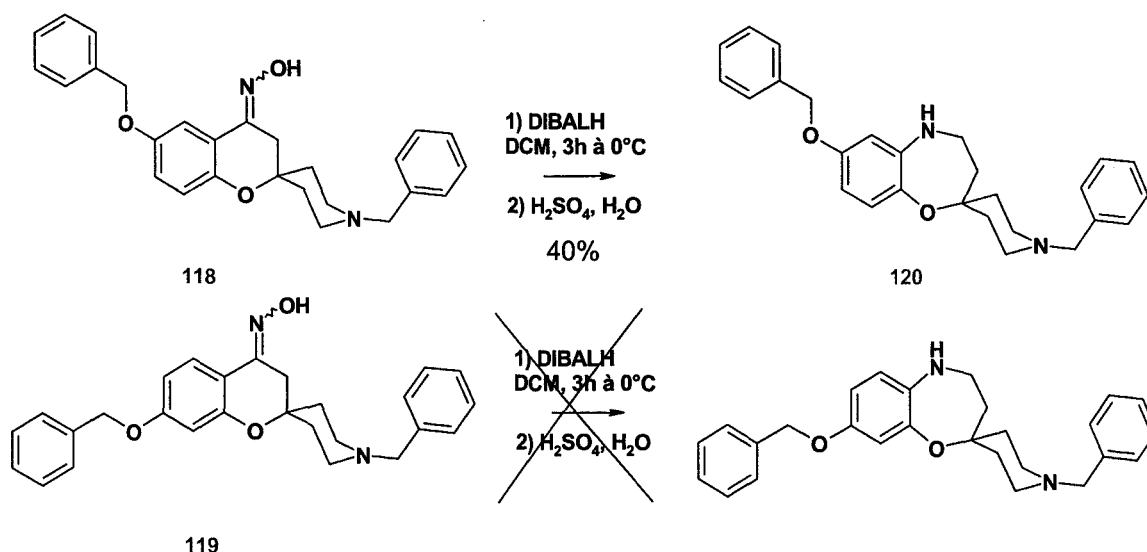


Figure 96. Schéma de synthèse de l'extension de cycle à partir des deux oximes synthétisées.

Les deux oximes synthétisées n'ont pas adoptés le même comportement en présence de DIBALH. L'oxime **118** possédant la fonction benzyloxy en position 6 (figure 96) a conduit à la benzoxazépine correspondante avec un rendement de 40% après purification, alors que l'oxime **119**, substituée en position 7, a conduit à un mélange de composés non identifiables. Cette observation peut s'expliquer par la formation de quinones dans les conditions opératoires.

3.2.2.4. Etude réactionnelle du composé 120.

Le composé ainsi obtenu a été alkylé par amination réductrice au moyen du 2,4-diméthyl-benzaldéhyde puis déprotégé en présence de palladium sur charbon et de dihydrogène. La pipéridine a ensuite été acylée par le chlorure de 4-chloro-benzoïque acide. Enfin, la fonction hydroxy libre a été alkylée par le bromoacétate de *tertio*-butyle en présence d'hydrure de sodium (figure 97).

La fonction acide carboxylique a pu être libérée par acidolyse de l'ester *tertio*-butylique. (figure 97)

Ce schéma synthétique présente bien la possibilité d'introduire des pharmacophores par alkylation de la fonction hydroxy une fois déprotégée au moyen de dérivés halogénés, mais aussi par des réactions de couplage peptidique sur la fonction carboxylique introduite par addition d'un bras carboxyméthyle par alkylation avec le bromoacétate de *tertio*-butyle.

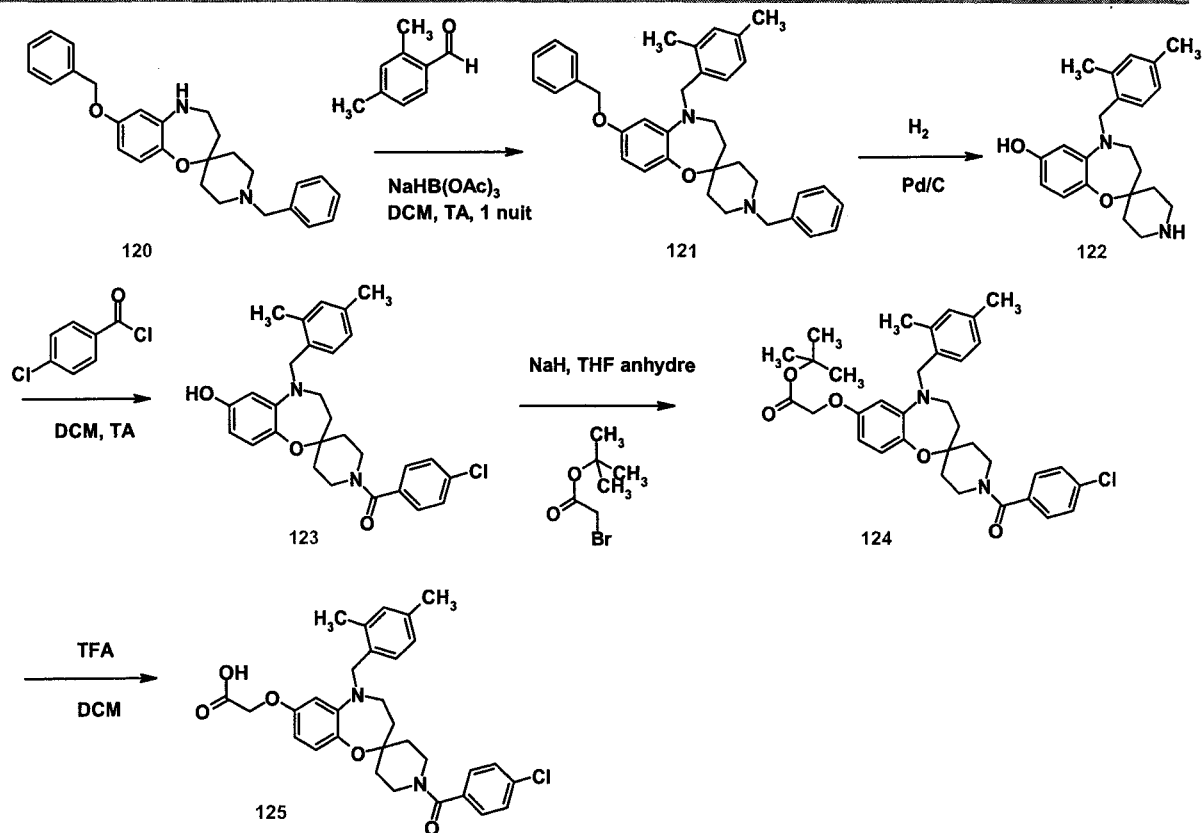


Figure 97. Schéma réactionnel de la fonctionnalisation du groupement hydroxy porté par le composé 123.

3.3. Déprotection de la pipéridine.

La déprotection de la pipéridine est réalisée dans les conditions classiques par hydrogénation, en présence de palladium sur charbon. La déprotection est quantitative et sélective.

3.3.1. A partir des dérivés alkylés et acylés.

Les résultats obtenus sur différents composés sont présentés dans les tableaux 13 et 14.

A partir des dérivés alkylés :

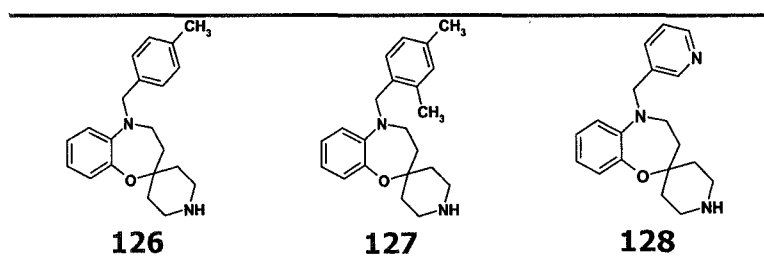


Tableau 13. Produits alkylés issus de la réaction de débenzylation.

A partir des dérivés acylés :

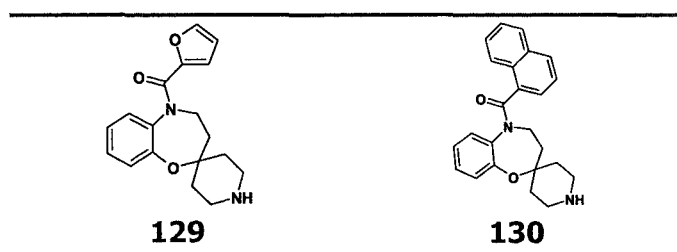


Tableau 14. Produits acylés issus de la réaction de débenzylation.

3.3.2. Introduction d'un groupement protecteur Boc sur le composé 89.

Il est possible de déprotéger la spiro[benzoxazépine-pipéridine] sans avoir à substituer l'azote benzoxazépinique. Ceci permet alors d'introduire un autre groupement protecteur sur la pipéridine comme le Boc, par addition d'anhydride *tert*-butoxycarbonyl, et ce afin de réaliser des synthèses parallèles robotisées sur plaque 96 puits. (figure 98)

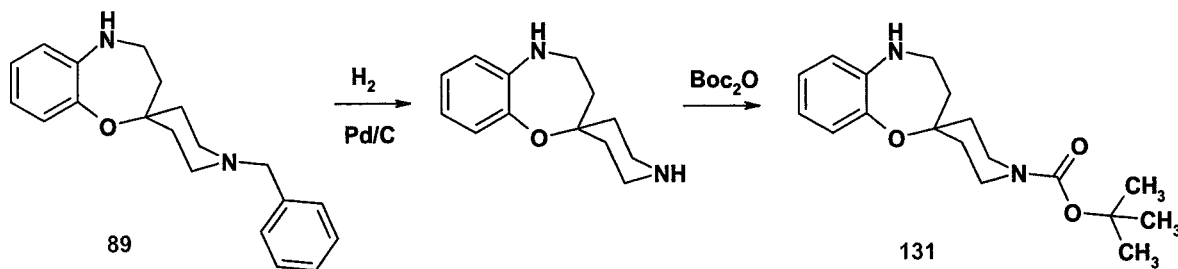


Figure 98. Procédure de changement de groupement protecteur porté par la pipéridine.

3.4. Conclusion.

La possibilité d'introduire une diversité à la fois sur le noyau benzénique, par des substituants ou par des groupements fonctionnels, sur l'azote du cycle azépinique, mais aussi sur l'azote de la pipéridine démontre bien que le squelette spiro[benzoxazépine-pipéridine] peut déployer dans les trois directions de l'espace des groupements de nature aromatique, des groupements donneurs, accepteurs de liaison hydrogène. Cette structure remplit donc un des critères énoncés de structure privilégiée à savoir la présentation de pharmacophores à sa périphérie comme l'illustre la figure 99.

La seconde étape, pour valider ce type de structure, a été d'étudier la conformation adoptée dans un cristal et en solution et ainsi d'estimer leur rigidité.

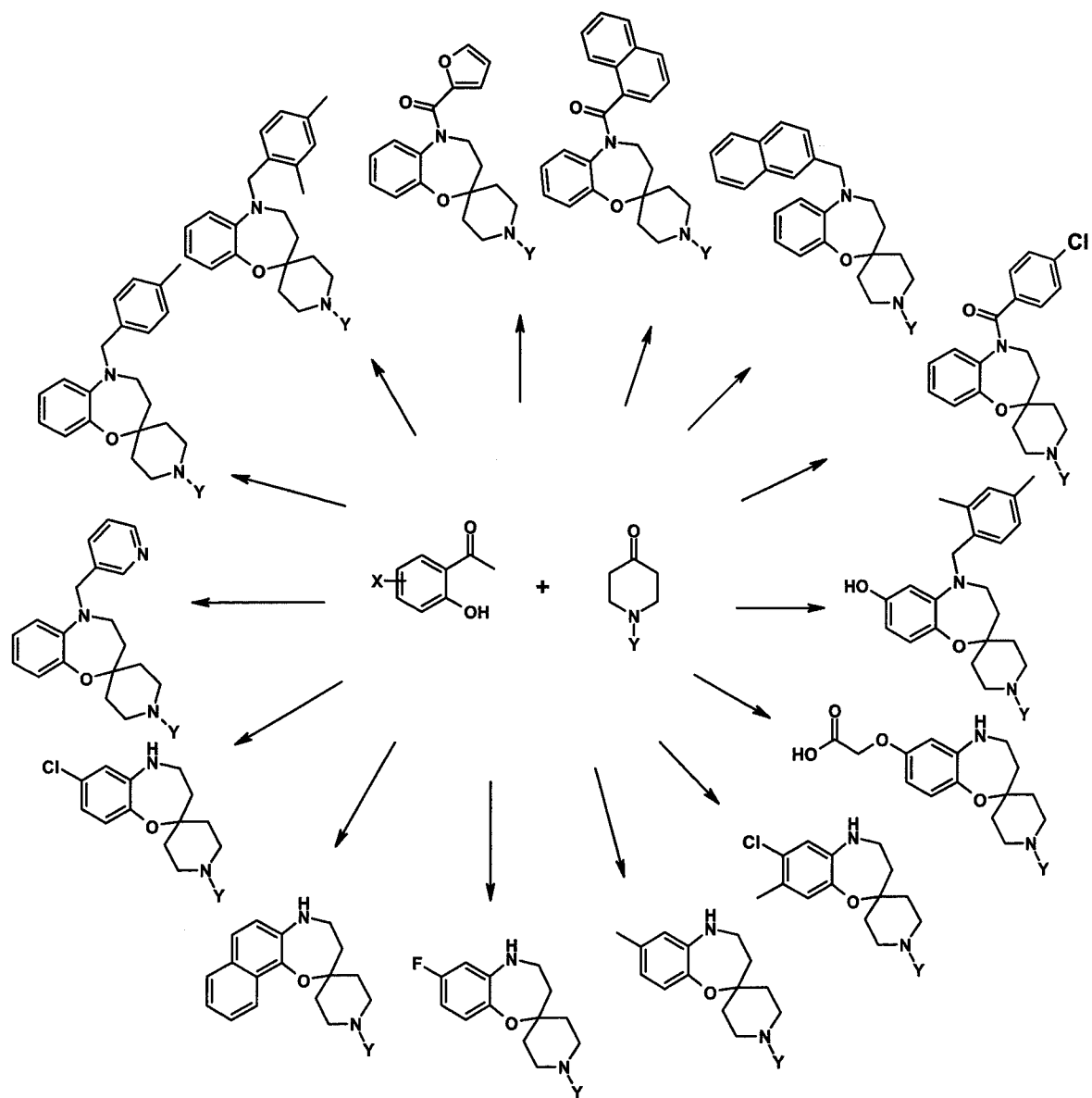


Figure 99. Illustration des différents motifs spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] obtenus à partir d'unités hydroxyacétophénone et *N*-pipéridone.

4. ÉTUDE STRUCTURALE D'UNE SPIRO-BENZOXAZEPINE.

La formule développée du composé **126**, dont la structure a été étudiée, est présentée en figure 100.

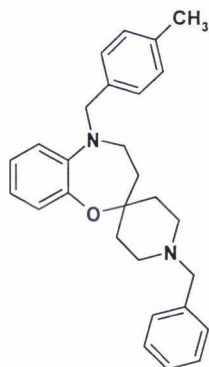


Figure 100. Composé 126 étudié par RMN et radiocristallographie.

L'existence du carbone spiranique dans ce type de molécule et la présence de la pipéridine, nous amène à réfléchir sur la conformation spatiale et la flexibilité de telles molécules. Une étude cristallographique par diffraction des rayons X et par résonance magnétique nucléaire nous a permis de connaître la conformation de cette molécule à la fois dans un cristal, mais aussi en solution.

4.1. Etude radiocristallographique.

Nous avons déduit des études cristallographiques de ce produit la géométrie suivante :

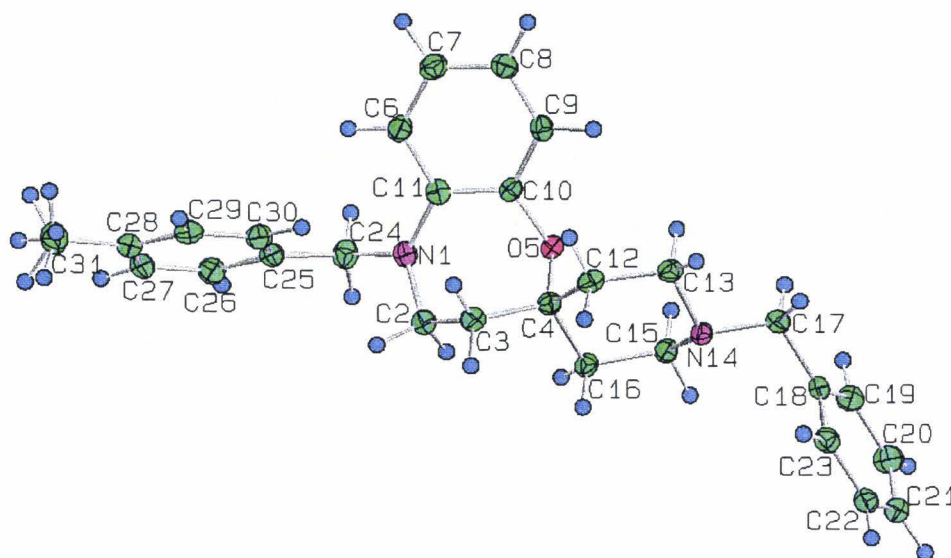


Figure 101. Conformation du composé 126 cristallisé.

De cette première analyse, nous pouvons en déduire que la conformation adoptée dans le cristal par la pipéridine est une conformation chaise, présentant l'atome d'oxygène 5 en position axiale par rapport au cycle pipéridinique sur le carbone spiranique 4 (figure 101).

Nous avons alors étudié en détail les spectres RMN de cette même molécule pour savoir si en solution, la conformation adoptée était la même, mais surtout si la molécule était flexible au niveau du cycle pipéridinique.

Plusieurs questions se posaient :

- En solution, les conformations présentées en figure 102 peuvent-elles exister en équilibre ?
- Est-il possible de n'avoir qu'une seule conformation prépondérante ?

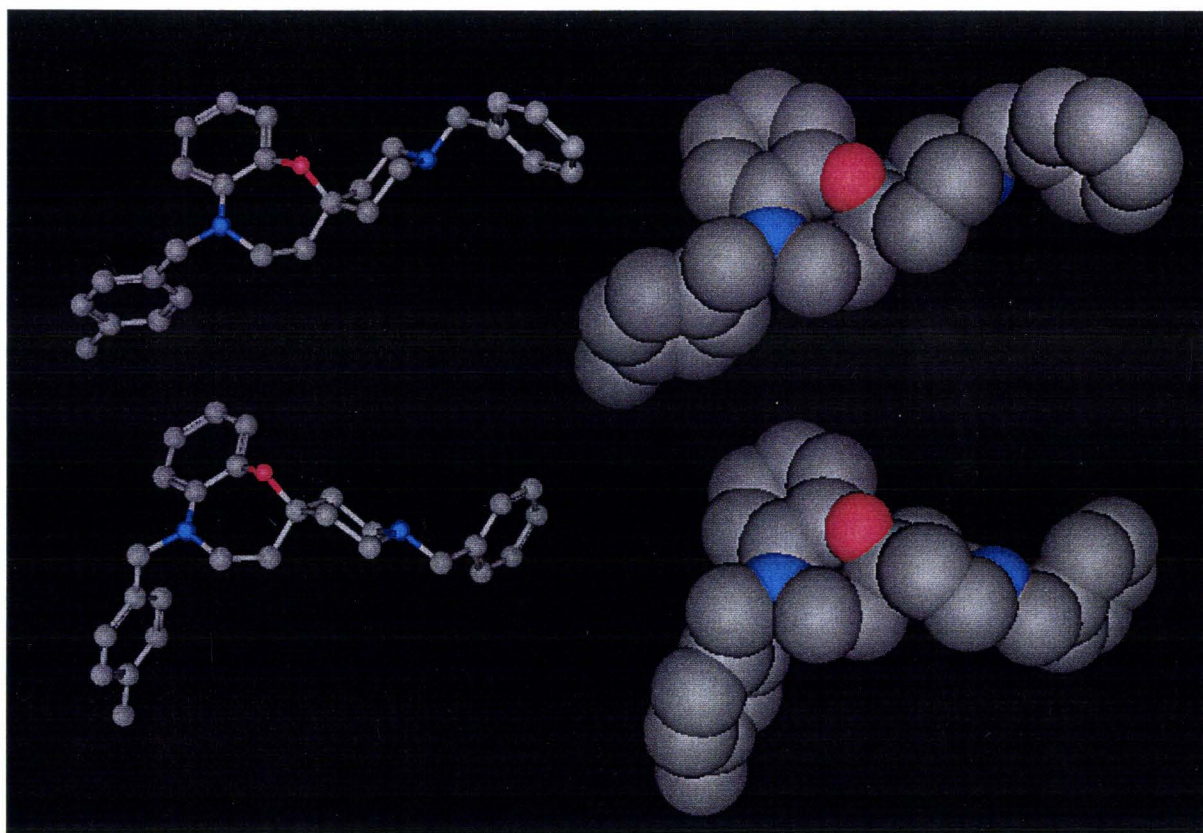


Figure 102. Comparaison des conformations du composé 126 avec inversion de la chaise de la pipéridine.

4.2. Etude en Résonance Magnétique Nucléaire.

4.2.1. Attribution des spectres ^1H et ^{13}C .

Pour obtenir toutes les informations nécessaires à notre étude, nous avons utilisé les techniques de RMN du proton, du carbone, et les expériences *COSY* et *ROESY* qui nous ont permis de mettre en évidence les couplages entre protons à travers les liaisons ou dans l'espace (lorsque ceux-ci sont éloignés d'une distance inférieure à 3.5 Å).

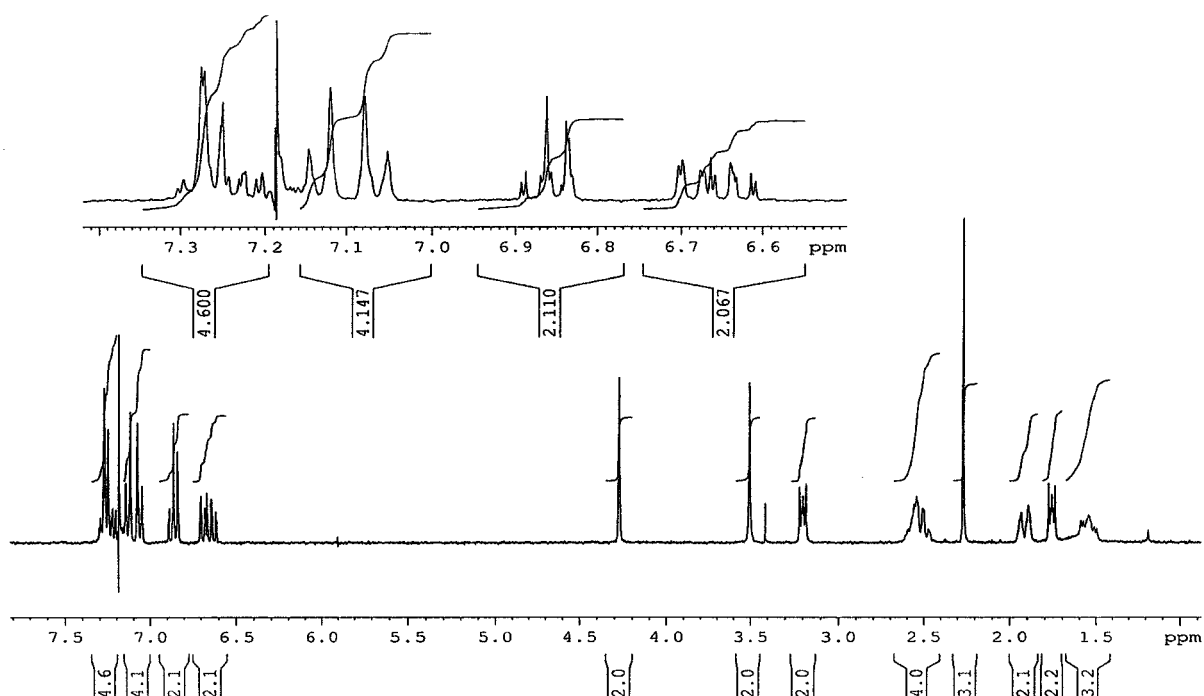


Figure 103. Spectre des protons aromatiques et aliphatiques.

d (ppm)	Intégration	Type de massif	Attribution
1.6	2	triplet dédoublé	16Eq & 12Eq
1.8	2	triplet	3
1.9	2	doublet	16Ax & 12Ax
2.3	3	singulet	31
2.5	4	massif	13 & 15
3.2	2	triplet	2
3.5	2	singulet	17
4.3	2	singulet	24
6.65	2	multiplet	8 & 10
6.85	2	multiplet	7 & 9
7.1	4	doublets	26, 27, 29 & 30
7.25	5	massif	19, 20, 21, 22 & 23

Tableau 15. Attribution des signaux de RMN.

En comparant les constantes de couplages observées à celles de couplages théoriques des protons équatoriaux et axiaux dans un cycle à six atomes en conformation chaise, nous avons pu attribuer aux massifs de déplacement chimique 1.6, 1.9 et 2.5 ppm les protons du cycle pipéridinique, et même à identifier les signaux correspondant aux protons axiaux et équatoriaux portés par les carbones 12 et 16.

Les constantes de couplages théoriques sont :

$$J^{2(\text{gem})} = 10 \text{ à } 18 \text{ Hz}$$

$$J^{3\text{Ax-Ax}} = 8 \text{ à } 12\text{Hz}$$

$$J^{3\text{Ax-Eq}} = 2 \text{ à } 8 \text{ Hz}$$

$$J^{3\text{Eq-Eq}} = 2 \text{ à } 6 \text{ Hz}$$

Les protons 13 et 15 (proches de l'azote) doivent avoir un déplacement chimique plus important. Le massif à 2.5 correspond donc aux protons 13 et 15 (on ne peut ici différencier les équatoriaux des axiaux).

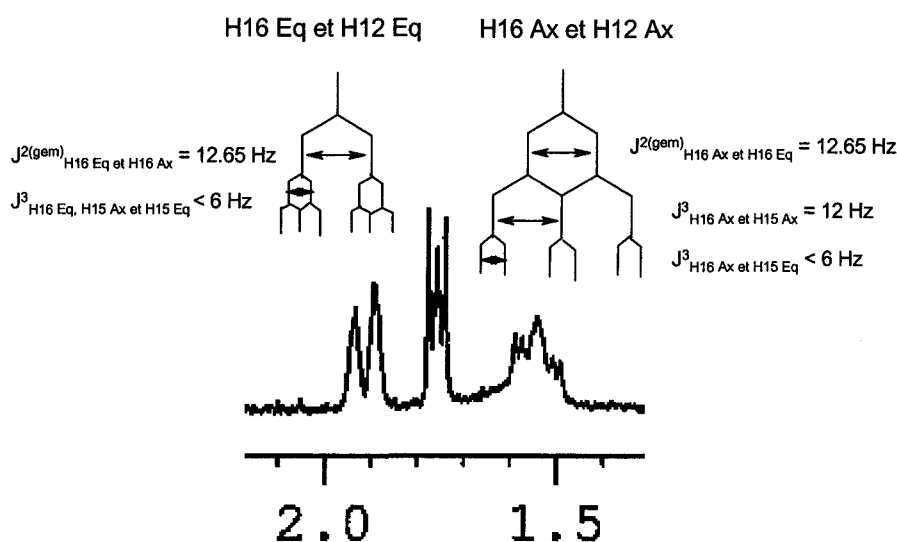


Figure 104. Attribution des protons H16 et H12.

Les protons axiaux 12Ax et 16Ax doivent avoir une constante J^2 de couplage géminale avec les protons équatoriaux 12Eq et 16Eq comprise entre 10 et 18 Hz (J^2 observée = 12.65 Hz), un couplage J^3 avec les protons axiaux 13Ax et 15Ax, de 8 à 12 Hz (J^3 observée = 12.04 Hz) enfin un couplage J^3 avec les protons équatoriaux 13Eq et 15Eq de 2 à 6 Hz (J^3 observée = 5.39 Hz). Les protons équatoriaux 12Eq et 16Eq sont couplés avec une constante J^2 de couplage géminale avec les protons axiaux 12Ax et 16Ax comprise entre 10 et 18 Hz (J^2 observée = 12.65 Hz), les constantes de couplage J^3 avec les protons axiaux et équatoriaux portés par les carbones 13 et 15 sont inférieures à 6 Hz.

De ces données théoriques, et comme le montre la figure 104, les protons axiaux 12Ax et 16Ax apparaissent sous la forme d'un triplet, triplet que l'on retrouve au déplacement chimique de 1.55 ppm, alors que les protons équatoriaux apparaissent sous la forme d'un doublet, présent à 1.90 ppm.

Les spectres (^1H - ^{13}C) COSY et ROESY, nous permettent de confirmer les attributions de spectres du proton (figure 105):

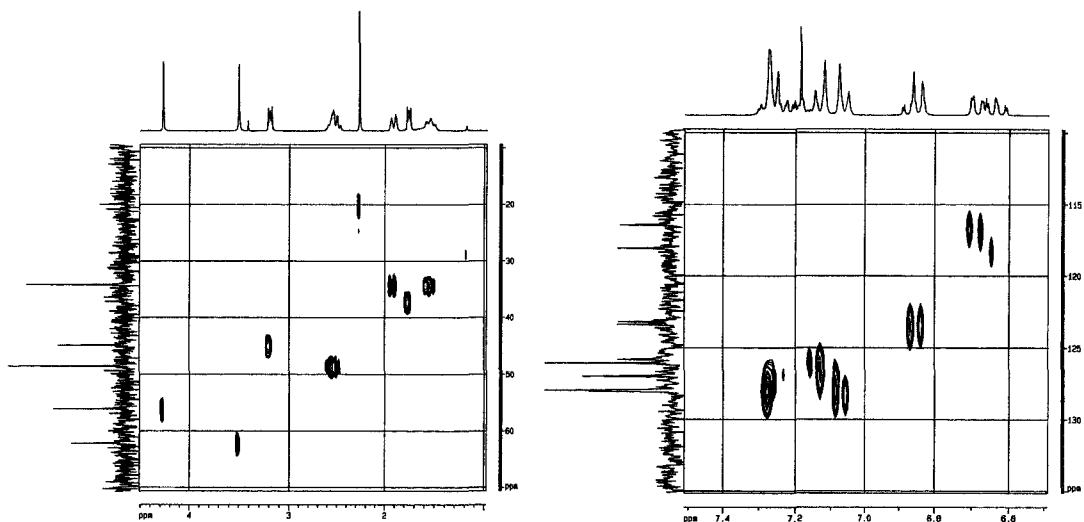


Figure 105. Spectres COSY ^1H - ^{13}C

$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Attribution
22.0	31
35.7	12 & 16
37.8	3
46.4	2
50.1	13 & 15
57.6	24
63.7	17
118.1	10
119.7	8
124.8	7
125.0	9
127.5 à 129.7	26, 27, 29, 30 & 19 à 23

Tableau 16. Attribution des signaux du carbone ^{13}C .

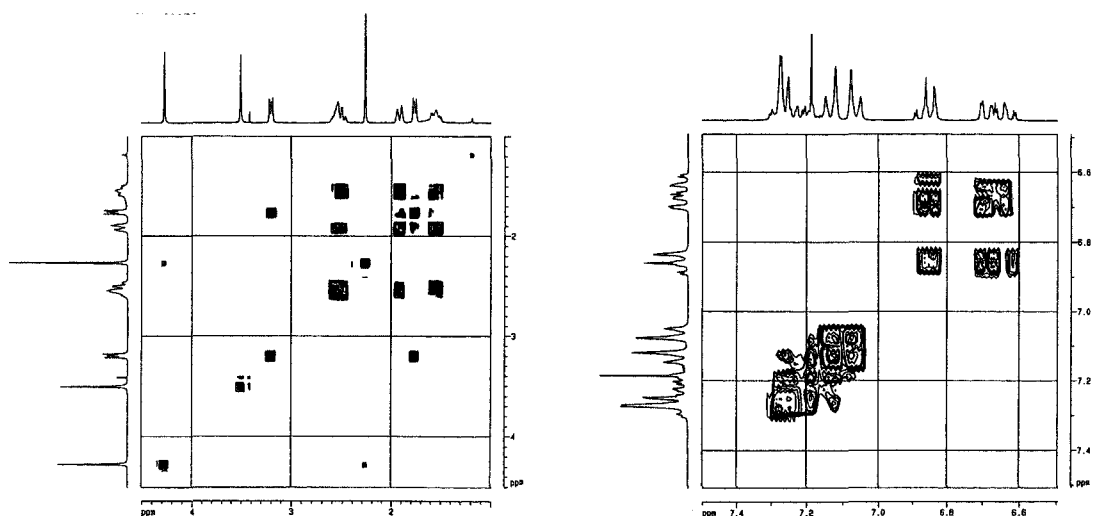


Figure 106. Spectres COSY (^1H - ^1H).

Proton(s)	d (ppm)	Proton(s) couplé(s)	Type de couplage
12Eq & 16Eq	1.6	12Ax & 16Ax	$J^2 = 12.65 \text{ Hz}$
		13 & 15	$J^3 = 12.04 \text{ Hz}$
3	1.8	2	$J^3 = 5.39 \text{ Hz}$
12Ax & 16Ax	1.9	12Eq & 16Eq	$J^2 = 12.65 \text{ Hz}$
		13 & 15	$J^3 = 4.77 \text{ Hz}$
31	2.3	aucun	
13 & 15	2.5	12 & 16	Non déterminable
2	3.2	3	$J^3 = 5.39 \text{ Hz}$
17 & 24	3.5 & 4.3	aucun	
8	6.63	7, 9 & 10	$J^3 = 6.61 \text{ Hz}$
			$J^4 = 1.60 \text{ Hz}$
10	6.68	9 & 8	$J^3 = 8.01 \text{ Hz}$
			$J^4 = 1.38 \text{ Hz}$
7	6.84	9 & 8	$J^3 = 8.01 \text{ Hz}$
9	6.86	8, 10 & 7	$J^3 = 6.61 \text{ Hz}$
			$J^4 = 1.60 \text{ Hz}$
27 & 29	7.06	26 & 30	$J^3 = 8.00 \text{ Hz}$
26 & 30	7.12	27 & 29	$J^3 = 8.00 \text{ Hz}$

Tableau 17. Interprétation des spectres 2D.

4.2.2. Etude ROESY.

Cette expérience met en évidence les couplages entre protons dans l'espace, et non scalaires. Elle nous a permis d'éliminer une des deux conformations possibles de la pipéridine (figure 107).

Cette étude a été menée à la fois dans un solvant organique : le chloroforme deutéré et dans l'eau lourde deutérée en présence de DCI. Les résultats présentés ont été obtenus dans le chloroforme deutéré.

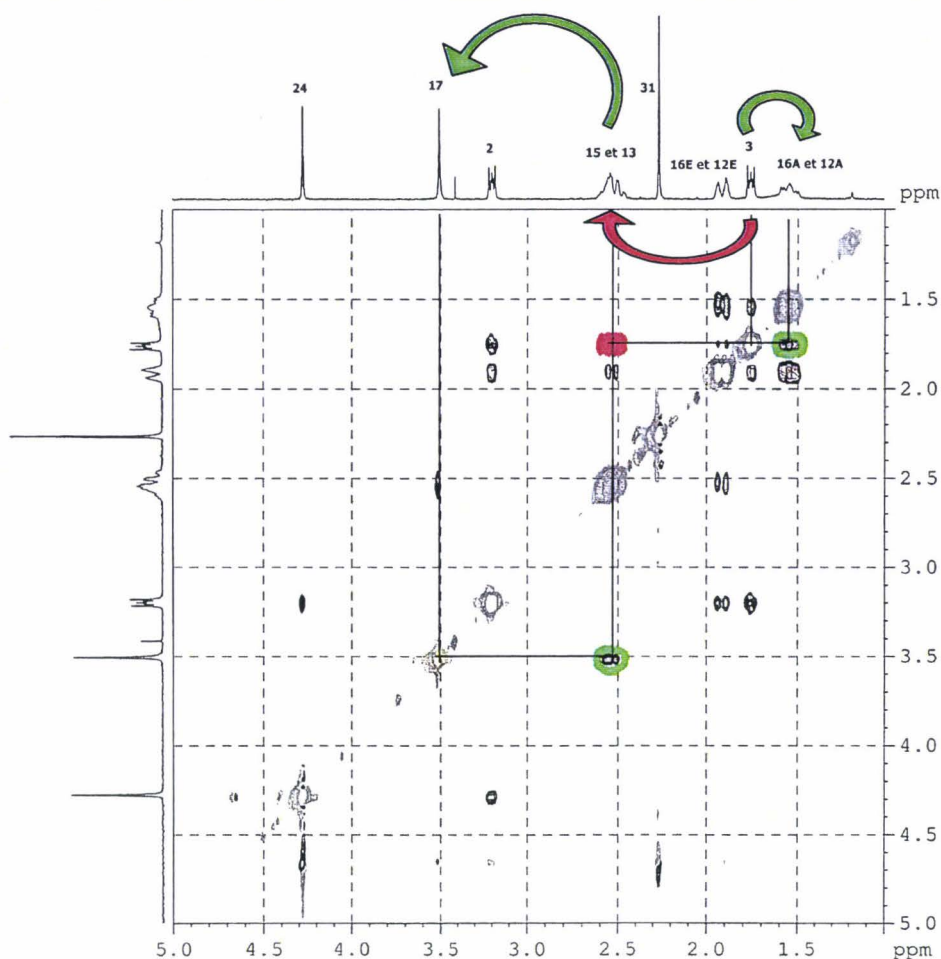


Figure 107. Spectre ROESY du composé 126.

Le spectre ROESY (figure 107) permet de déduire les informations suivantes:

- Contact dans l'espace entre les protons 3 et les protons axiaux 16Ax et 12Ax.
- Contact dans l'espace entre les protons 15 et 13 avec les protons 17.
- Absence de contact entre les protons 3 et les protons 15 et 13.

Ces informations sont cohérentes avec les contacts observés sur la structure de conformation 1, qui est la conformation de la molécule dans le cristal et ne coïncident pas avec les contacts attendus pour la conformation 2, notamment les contacts entre protons 3 et protons axiaux 13Ax et 15Ax (figure 108).

Conformation 1		
Protons	Proton 3	Proton 17
16A	2.25 Å	
12A	2.57 Å	
15A	4.60 Å	2.41 Å
13A	4.80 Å	2.42 Å

■ Corrélations observées sur le spectre ROESY

■ Corrélations absentes sur le spectre ROESY

Conformation 2		
Protons	Proton 3	Proton 17
16A	3.62 Å	
12A	3.64 Å	
15A	2.16 Å	2.41 Å
13A	2.50 Å	2.42 Å

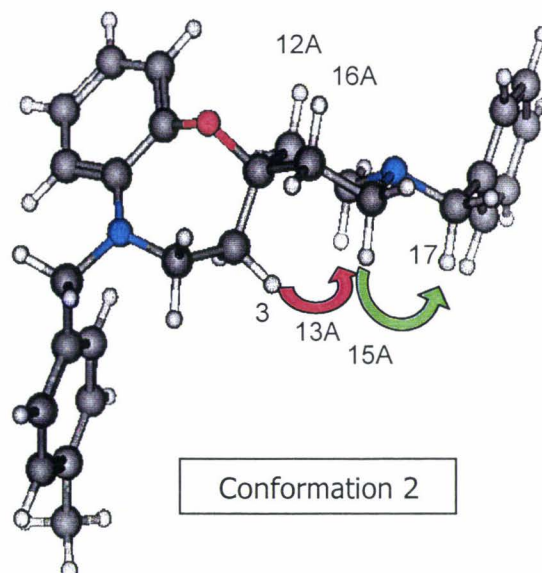
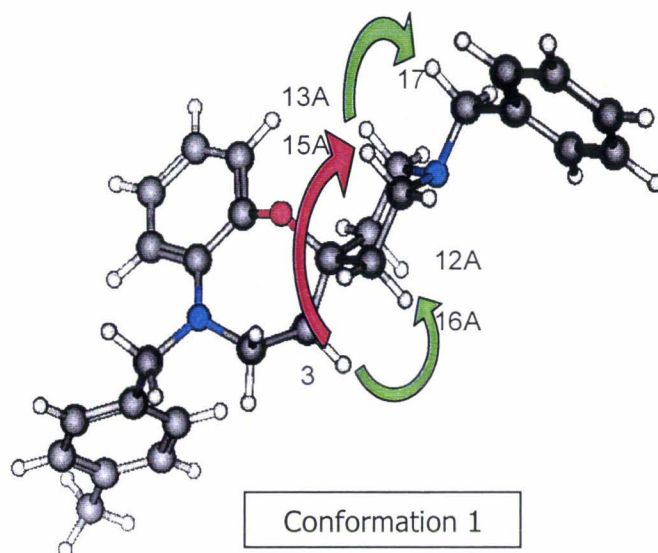


Figure 108. Distances théoriques calculées avec un logiciel de modélisation moléculaire et distances observées pour les deux conformations envisageables (texte = valeurs calculées, couleur = corrélations observées).

On confirme grâce à ces études que notre molécule possède une seule conformation chaise au niveau de la pipéridine, présentant l'atome d'oxygène de la benzoxazépine en position axiale à la fois dans le cristal et en solution. Cette conformation maintient les trois groupes hydrophobes séparés les uns des autres évitant ainsi l'agrégation (figure 109).

Ces molécules rigides remplissent donc bien les critères énoncés de structures privilégiées.

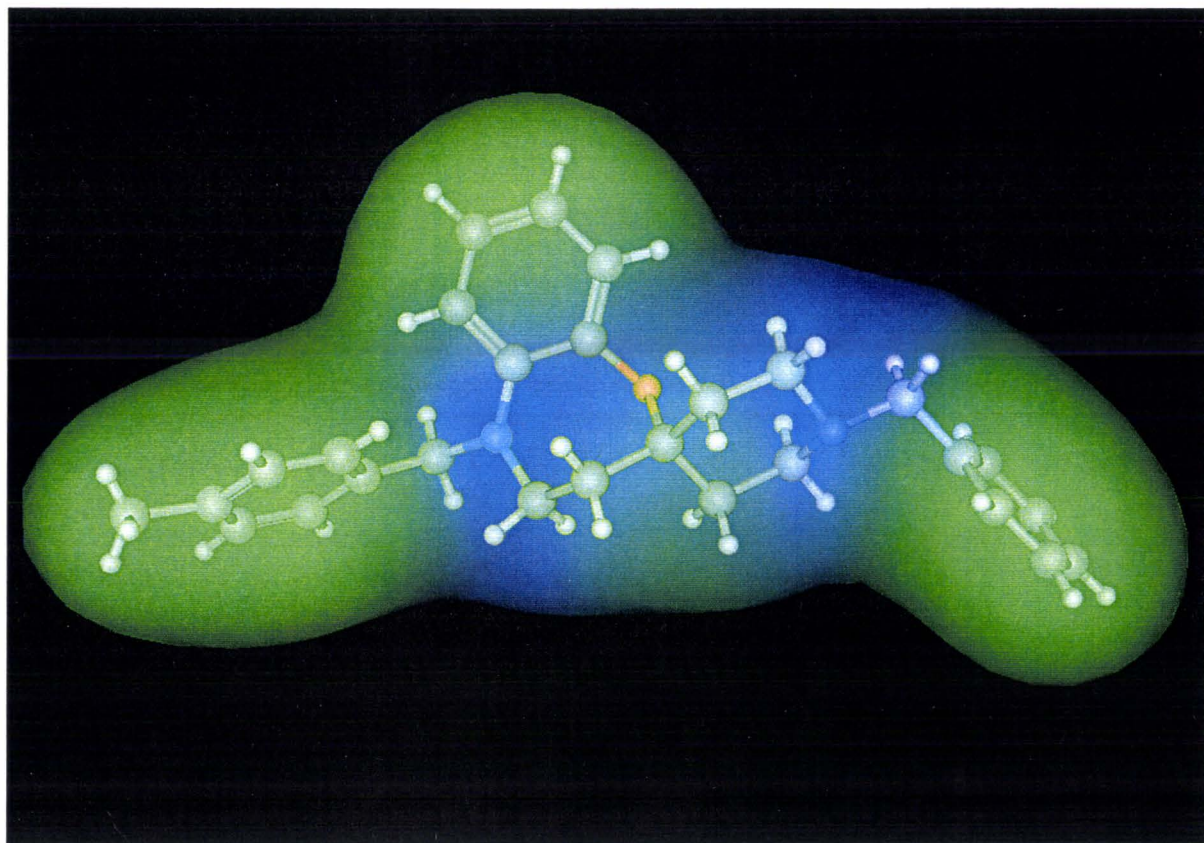


Figure 109. Représentation de la molécule dans l'espace avec en vert les surfaces hydrophobes, et en bleu les surfaces hydrophiles.

5. CONCEPTION, SYNTHÈSE ET CRIBLAGE D'UNE CHIMIOTHEQUE BASEE SUR LA STRUCTURE SPIRO[BENZOXAZEPINE-PIPERIDINE].

Dans le but de vérifier l'activité potentielle des molécules possédant un squelette spiro[benzoxazépine-pipéridine], une chimiothèque de 480 composés a été synthétisée et testée sur un récepteur membranaire couplé à une protéine G. Les résultats de ce travail sont présentés dans cette partie.

5.1. Conception de la chimiothèque.

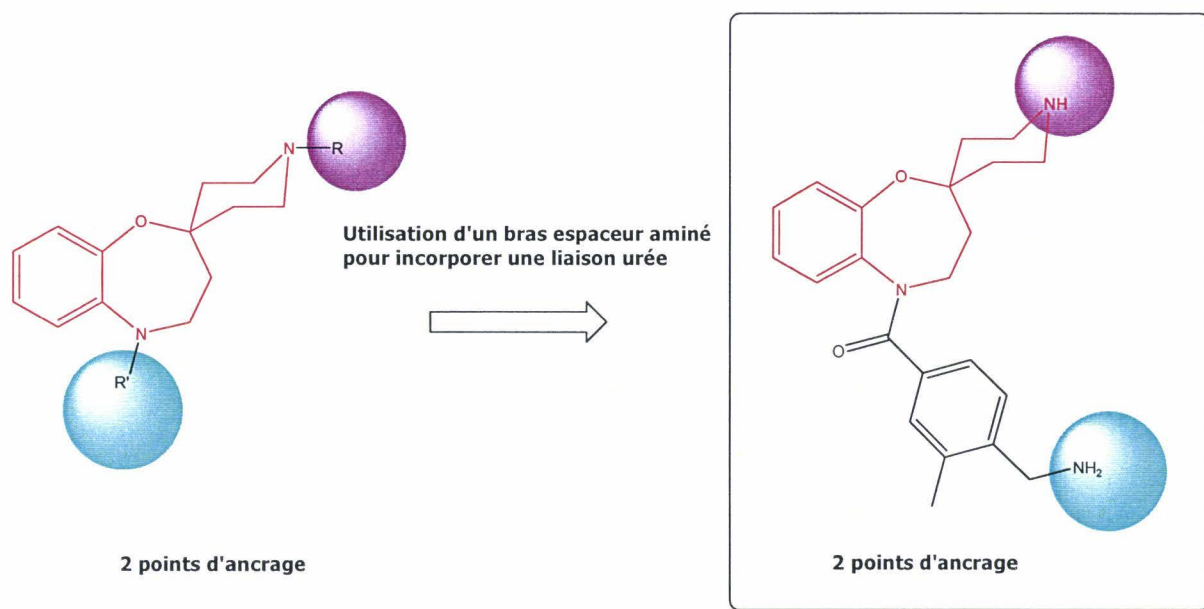


Figure 110. Schéma du squelette utilisé pour le développement de la chimiothèque.

La structure spiro[benzoxazépine-pipéridine] présente deux points d'ancrages (figure 110) :

- L'azote de type aniline du cycle benzoxazépinique
- L'azote de la pipéridine

Ces deux fonctions peuvent être utilisées dans une éventuelle diversification comme cela a été démontré dans les parties précédentes.

Dans la conception d'une chimiothèque focalisée à partir de ce type de structure, synthétisée en chimie combinatoire robotisée, nous avons opté pour l'incorporation d'un bras espaceur aromatique possédant une fonction aminée primaire aliphatique, fonctionnalisable par liaison urée (figure 110).

5.2. Synthèse parallèle de la banque.

5.2.1. Synthèse du précurseur.

La synthèse du précurseur est schématisée à la figure 111. La fonction aminée du *tert*-butyl-4,5-dihydro-1*H*,3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine]-1'-carboxylate est acylée par le chlorure de 4-cyano-3-méthylbenzoïque, obtenu à partir de l'acide 4-cyano-3-méthylbenzoïque. La fonction nitrile est réduite en présence de chlorure de cobalt et de borohydrure de sodium pour donner le dérivé 133.⁸³

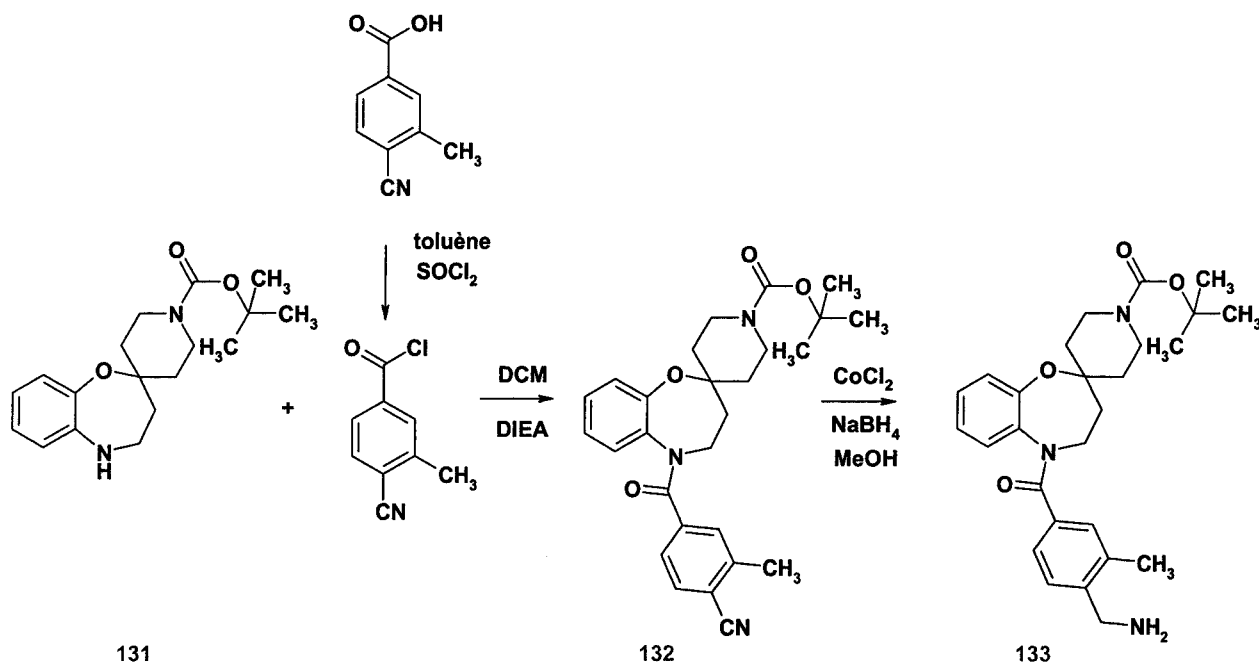


Figure 111. Schéma synthétique du précurseur.

5.2.2. Fonctionnalisation de la fonction aminée en plaques 96 puits.

Six plaques de 96 puits ont été construites selon le schéma synthétique présenté en figure 112. Une solution du composé 133 est préparée et déposée dans les 96 puits de chaque plaque. Une solution de carbonyldiimidazole dans le DMF est disposée également dans chaque puits. Une solution d'une des huit amines est alors disposée dans tous les puits de chacune des lignes de chaque plaque (figure 112).

⁸³ Dallaire C. and Arya P.; Synthesis of New Building Blocks: Towards the Analogs of Peptide Nucleic Acids; *Tet. Lett.*, **1998**, 39, pp 5129-5132.

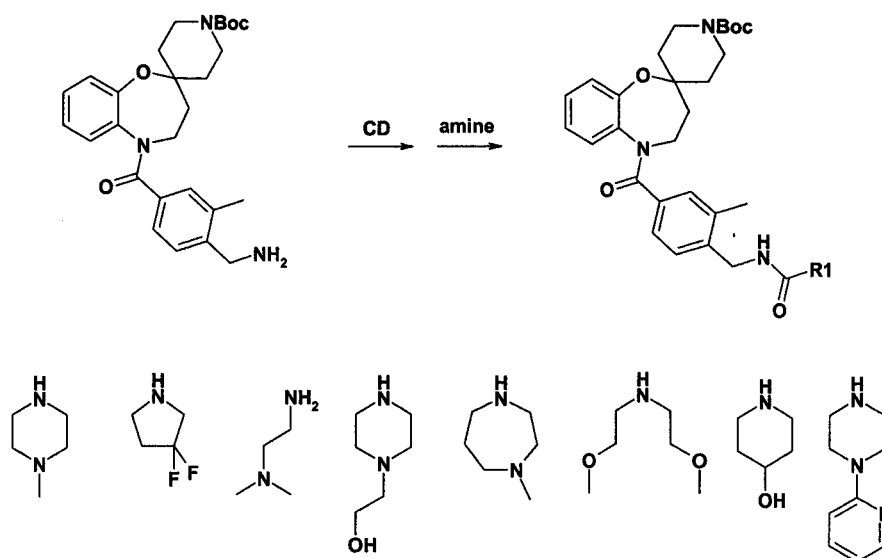


Figure 112. Fonctionnalisation de l'amine du précurseur par formation de liaison urée avec huit amines différentes.

5.2.3. Déprotection et fonctionnalisation de l'azote pipéridinique.

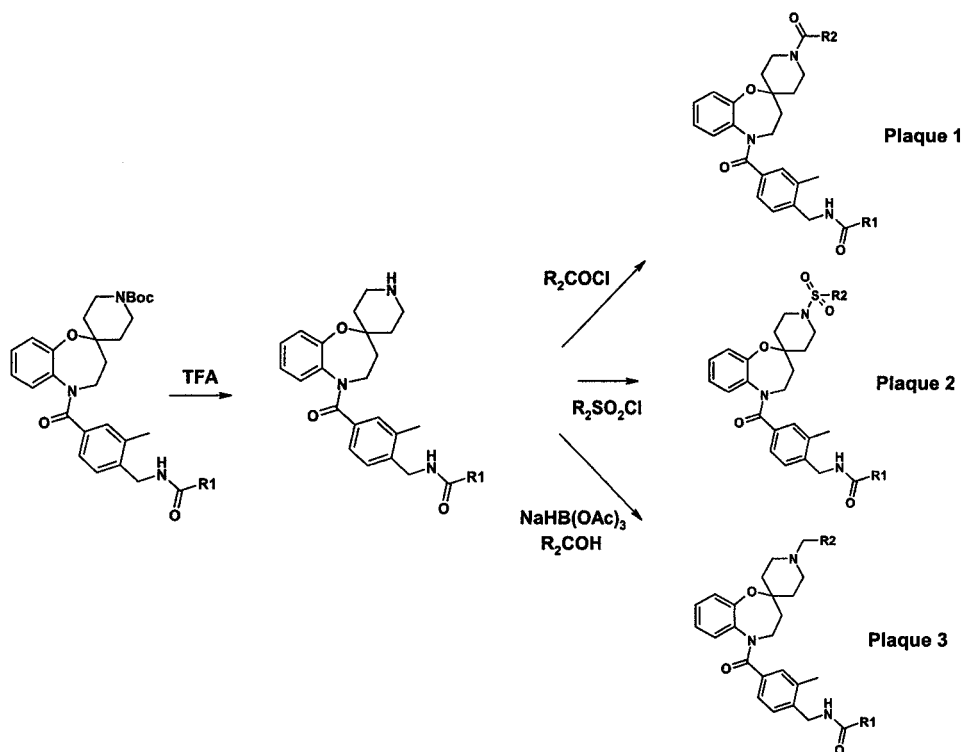


Figure 113. Etapes de déprotection et de fonctionnalisation de l'azote pipéridinique en plaques 96 puits.

Les deux dernières étapes consistent à libérer l'amine de la pipéridine par ajout d'une solution de TFA dans le DCM, mise sous agitation de la plaque et évaporation des solvants, puis à fonctionnaliser cette amine par différents réactifs tels que les chlorures d'acyle (10), les chlorures de sulfonyle (10) et les aldéhydes en présence d'un réducteur spécifique : le triacétoxyborohydrure de sodium (10).

Ceci afin d'obtenir des plaques filles possédant l'architecture présentée en figure 114.

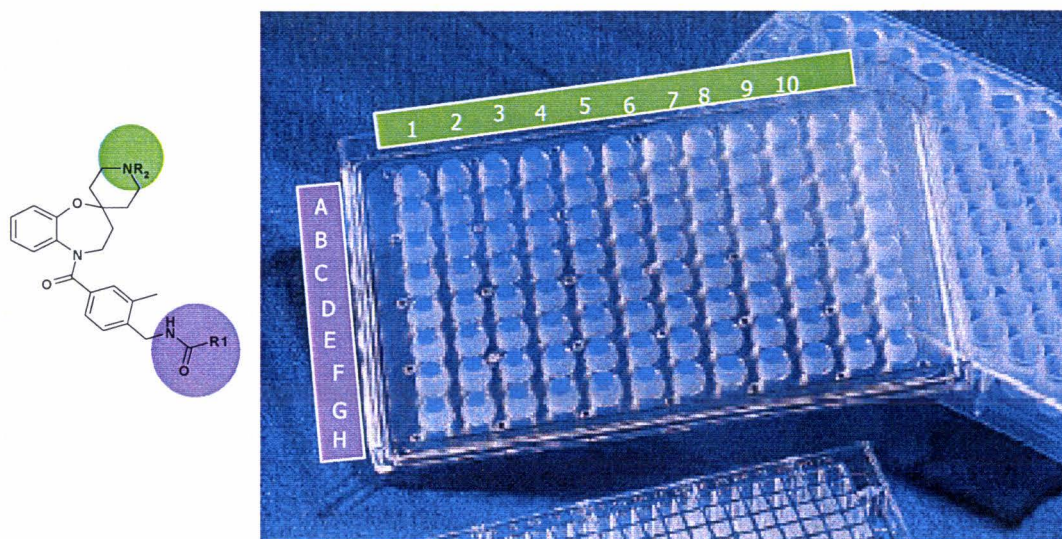


Figure 114. Architecture des plaques : (2 X 8 urées) (violet) X 10 amides, ou 10 sulfonamides ou 10 amines (vert) = 6 X 80 produits = 480 composés.

5.3. Criblage et résultats biologiques.

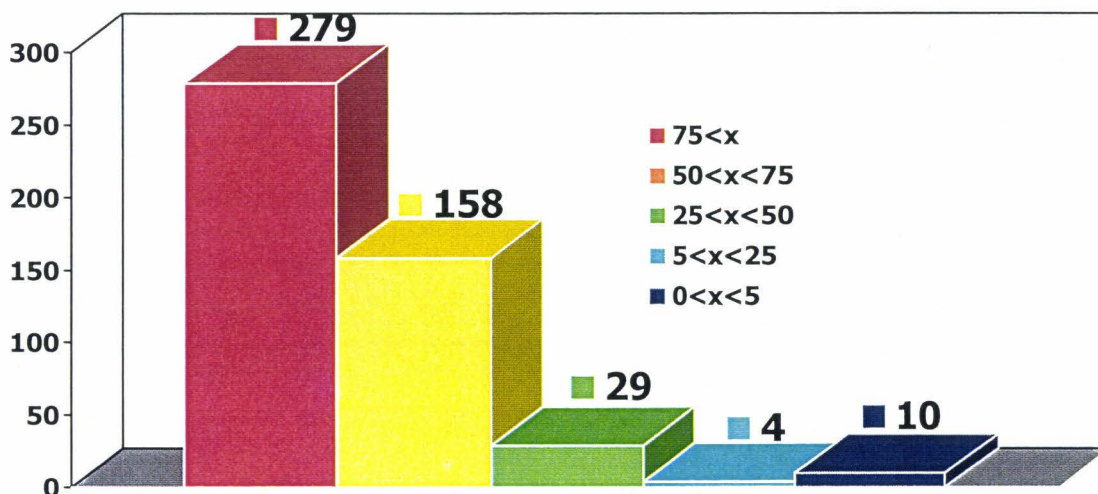


Figure 115. Diagramme de répartition des activités des 480 composés (C=3 µM) testés vis-à-vis de la réponse du récepteur à son ligand endogène (C=100 pM) (exprimée comme % d'activité résiduelle).

5.3.1. Résultats biologiques.

Dans un test fonctionnel, sur 480 composés testés, 43 inhibent à plus de 50% l'activité du ligand endogène sur le récepteur à sept domaines transmembranaires, dont dix l'inhibent presque totalement à une concentration de 3 µM (figure 115).

5.3.2. Paramètres physicochimiques.

D'autre part, les paramètres structuraux du composé le plus actif, hormis la masse moléculaire, remplissent les critères énumérés dans la première partie de ce chapitre. La violation d'un seul de ces critères n'est pas source d'exclusion dans un développement pharmaceutique.

Paramètre	Valeur	Valeur Limite	Validation
Nombre de donneurs de liaison H	1	5	✓
Nombre d'accepteurs de liaison H	10	10	✓
Masse molaire	500 < x < 600	500	✗
ClogP	4.7	5	✓
Nombre de rotules	10	10	✓
PTSA (Å²)	111.1	140	✓

5.3.3. Paramètres pharmacocinétiques.

La solubilité de ce composé est supérieure à 154 µg/mL. Il est d'autre part stable en microsomes de rat, car métabolisé à hauteur de 10%. Par contre, sa stabilité chez l'homme est inférieure, il est métabolisé à 77% chez l'homme au bout de 60 minutes.

Ce composé présente donc les critères de « drugabilité » nécessaires à son optimisation future.

6. CONCLUSION.

Un premier criblage sur un récepteur à sept domaines transmembranaires, couplé à une protéine G, a permis de mettre en avant une molécule d'activité submicromolaire, qui présente des paramètres de biodisponibilité orale respectant les règles proposées par Lipinski et Veber.

Ce premier travail démontre bien la capacité des molécules présentant un squelette original spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] de se lier à un récepteur membranaire. Il démontre également qu'il est possible, par un changement mineur de la nature des substituants, de moduler l'activité de tels composés.

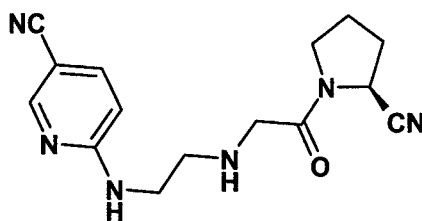
L'étude prochaine consistera à tester ce type de chimiothèque, basée autour d'une structure spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine], sur un panel plus large de cibles pharmacologiques (récepteurs, enzymes) afin de vérifier la capacité de telles molécules à fournir des ligands, et afin de vérifier également la spécificité de ces structures pour chaque cible par la modulation des pharmacophores présentés.

Conclusion générale et perspectives.

L'objet de cette thèse a été de concevoir et de synthétiser des chimiothèques focalisées ou généralistes. Dans une première approche, basée sur des hypothèses de pharmacophores, nous avons conçu des inhibiteurs d'une enzyme et des antagonistes d'un récepteur à sept domaines transmembranaires. Dans une seconde approche, la synthèse de chimiothèques, basées cette fois sur une structure dite privilégiée, a eu pour objectif, la découverte de nouveaux ligands pour un panel plus large de cibles.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont permis, dans une première partie, de concevoir et de valider de nouveaux inhibiteurs de la Dipeptidyl Peptidase IV.

1) La première étape de ce projet a consisté en la synthèse du composé NVP-DPP-728, développé par la société Novartis, et reconnu comme référence dans l'inhibition de la DPP-IV. La synthèse de ce composé, telle qu'elle a été publiée, s'est avérée être difficilement reproductible.



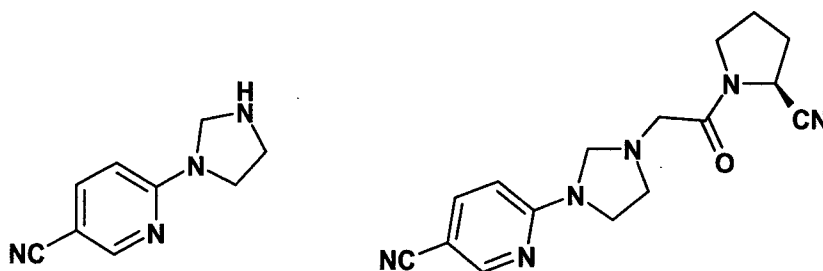
NVP-DPP-728

C'est donc dans la perspective d'utiliser ce composé comme référence, dans la conception de nouveaux inhibiteurs, que nous avons envisagé deux nouvelles voies de synthèse :

- Une synthèse en phase homogène.
- Une synthèse sur billes de résine.

a) Synthèse en phase homogène de NVP-DPP-728 :

Cette synthèse s'est appuyée sur l'utilisation d'une protection originale de type imidazolidine, par l'intermédiaire du formaldéhyde, des chaînes 1,4 diaminées présentes dans la structure des intermédiaires synthétiques. Cela a permis d'éviter la formation indésirable de produits d'alkylation et d'arylation.



Intermédiaires imidazolidines.

Lors de ce travail, nous avons également pu étudier deux voies de déprotection de ces intermédiaires imidazolidines, dont une fait intervenir une résine piègeuse d'électrophiles. Ce schéma synthétique a permis l'obtention du composé souhaité à l'échelle du gramme, avec un minimum d'étapes et des rendements globaux compris entre 12 et 17%. Les analyses (^1H , ^{13}C , P_f , IC_{50}) ont vérifié les données publiées par Novartis.⁹

b) Synthèse sur support solide :

La synthèse de NVP-DPP-728 a été également réalisée sur billes de résine rink amide. Cette synthèse a été conduite en optimisant :

- ✓ La synthèse des intermédiaires supportés.
- ✓ L'utilisation d'une protection orthogonale Dde/Boc fournissant l'intermédiaire supporté **21** dont seule l'amine primaire est réactive.

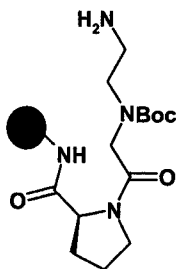


Figure. Structure de l'intermédiaire supporté 21.

- ✓ La réaction de substitution nucléophile aromatique sur le 6-chloronicotinonitrile, sur support solide.
- ✓ La déshydratation du dérivé carboxamide après décrochage de la résine.

En suivant ce schéma synthétique, le composé NVP-DPP-728 a été obtenu à l'échelle du milligramme, avec un rendement global de 72%. Les données analytiques ont également confirmées celles du composé publié par Novartis.

Outre la présentation d'un protocole applicable à la synthèse rapide de NVP-DPP-728 à l'échelle du milligramme, cette synthèse sur billes de résine permet d'ouvrir le champ des investigations à la découverte de nouveaux inhibiteurs. En effet, l'intermédiaire **21** permet la synthèse sur support solide d'une chimiothèque de composés, de diversité introduite sur le bras aminé. Cette stratégie a été exemplifiée par l'incorporation de la 4,6-dichloro-*N*-(4-méthoxyphényl)-1,3,5-triazin-2-amine **31** pour donner le composé **26**.

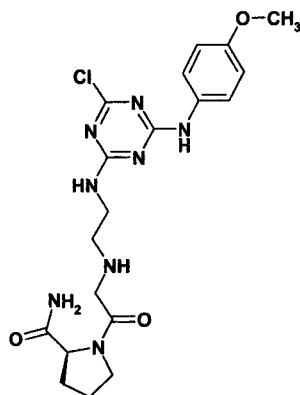
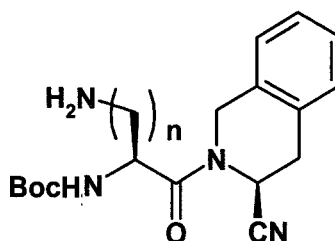


Figure. Composé 26.

2) A la suite de ce travail, la mise au point de nouveaux inhibiteurs a été réalisée à partir des travaux réalisés par Yamada et al., publiés en 1998. La conception de ces inhibiteurs, réalisée autour du motif tétrahydroisoquinoléine, a conduit à la synthèse de quatre intermédiaires originaux et d'une chimiothèque de 384 composés. La diversité de cette chimiothèque a été apportée en position P2, par l'incorporation en synthèse parallèle robotisée soit de réactifs commerciaux, soit de composés synthétiques obtenus à partir du motif 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine. Cette étude a permis non seulement l'optimisation de nouveaux inhibiteurs de la DPP-IV, mais également de mieux comprendre, grâce à la structure cristallographique de l'enzyme, publiée en janvier 2003, les résultats des activités des dérivés Tic.



Intermédiaires de motif tétrahydroisoquinoléine.

3) La seconde partie de ce travail a consisté à concevoir une chimiothèque de 480 composés, destinée à l'optimisation d'un hit obtenu par criblage systématique sur le récepteur GnRH.

Ce travail a nécessité :

- ✓ La synthèse de huit structures benzazépiniques, présentant des diversités structurales à la fois sur le noyau aromatique et sur la chaîne aliphatique, à partir de huit dérivés cétone oxime. Cette synthèse a été réalisée par l'extrapolation d'un protocole publié par Cho et al. en 1998.
- ✓ La mise au point d'un protocole de couplage entre les dérivés benzazépiniques et différents acides aminés, permettant l'accès à 19 structures originales avec des rendements compris entre 12 et 86%.
- ✓ La synthèse de 23 dérivés acylisothiocyanates.

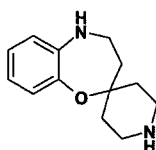
La synthèse parallèle et robotisée de la chimiothèque a conduit à 480 acylthiourées, présentant des puretés supérieures à 70% dans chaque puits.

Les criblages de cette chimiothèque sur le récepteur, dans un test fonctionnel et un test d'inhibition de la liaison du ligand à son récepteur, ont permis d'émettre des relations entre la structure et l'activité de chaque composé, nécessaires à l'élaboration d'une molécule tête de série.

4) Enfin, dans une troisième partie, nous nous sommes attachés à valider un nouveau concept basé sur la conception de chimiothèques à partir de structures privilégiées.

Le travail a consisté à construire, à partir de données bibliographiques, un squelette spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] original, présentant les caractéristiques d'une structure privilégiée :

- ✓ Une mobilité conformationnelle limitée.
- ✓ Une présentation dans les trois dimensions de l'espace de groupements de nature aromatique, donneurs ou accepteurs de liaison hydrogène.



Squelette spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine]

Dans une première étape, nous avons vérifié qu'il était possible d'apporter à ce type de structure des modulations sur trois domaines :

- ✓ Le noyau aromatique benzoxazépinique.
- ✓ L'azote du cycle azépinique.
- ✓ L'azote de la pipéridine.

Dans une seconde étape, nous avons vérifié par études RMN et radiocristallographiques sur la structure du composé **126**, le critère de semi-rigidité, supposé pour cette architecture centrée autour d'un carbone spiranique.

Enfin, dans une troisième étape, une chimiothèque de 480 composés, construite autour du squelette spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] a permis, lors d'un criblage sur un récepteur membranaire, de mettre en avant un composé présentant une activité submicromolaire et des caractéristiques physicochimiques et pharmacocinétiques d'un candidat médicament.

Cette stratégie nécessite désormais l'étude du criblage de telles chimiothèques sur un panel plus large de cibles thérapeutiques, afin de valider définitivement cette approche autour de la structure [1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine], en montrant que la modulation des groupements pharmacophores, présentés par la structure privilégiée, permet de rendre la molécule spécifique du récepteur choisi.

Matériel et méthodes.

Matériel et méthodes

Les composés synthétisés et décrits dans ce travail ont été identifiés suivant les techniques classiques d'analyse : RMN (^1H , ^{13}C) et par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse.

Les spectres de masse ont été réalisés sur deux appareils différents selon les produits:

- **LC-MS_1**: WATERS/MicroMass, détecteur de masse quadripolaire type ZQ (0-2000 UMA), Module de séparation 2795 : Colonne TOSOHAAS TSK Gel (4.6x50 mm) phase stationnaire silice greffée C_{18} , granulométrie $2\mu\text{m}$. Gradient d'élution 0 à 80% tampon B (acétonitrile/acide formique 0.064%) en 3 minutes, plateau 1 minute (Tampon A : eau/acide formique 0.1%), détection à barrette de diode type 2996 (200-400 nm).
- **LC-MS_2**: FINNIGAN/MicroMass, colonne POLARIS (3.0x50 mm) phase stationnaire silice greffée C_{18} , granulométrie $3\mu\text{m}$. Gradient d'élution 10 à 95% tampon B (acétonitrile/acide formique 0,1%) en 8 minutes, plateau 1 minute Tampon A : eau/acide formique 0,1%).

Les spectres RMN ont été effectués sur un spectromètre Brüker DRX 300MHz, les déplacements chimiques δ sont donnés en ppm. Les abréviations suivantes ont été utilisées : s pour singulet, sd pour singulet dédoublé, d pour doublet, dd pour doublet dédoublé, t pour triplet, td pour triplet dédoublé, q pour quartet, qt pour quintuplet, m pour multiplet non résolu et br pour broad. Les pics sont décrits selon le modèle suivant : δ (nature du massif, nombre de protons, constante de couplage si présente).

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil Büchi, et sont non corrigés.

Chromatographie et purification :

La chromatographie sur couche mince de silice a été réalisée soit sur plaques d'aluminium recouvertes d'une couche de 0.25 mm d'épaisseur d'un gel de silice 60 PF₂₅₄ Merck, contenant un révélateur fluorescent des groupements chromophores dans l'ultraviolet (254 nm), soit sur plaques d'oxyde d'aluminium neutre 60 PF₂₅₄ Merck contenant un révélateur fluorescent des groupements chromophores dans l'ultraviolet (254 nm).

Les chromatographies de type flash colonne ont été réalisées à l'aide du gel de silice Merck G60 (230-240 mesh), l'élution étant accélérée par air comprimé ou azote.

Les chromatographies sur colonnes prépaquées de la marque Isolute de granulométrie 40 à 60 μm ont été réalisées à l'aide d'une pompe Gilson, réglée sur un débit de 10 mL/min. Les fractions ont été récoltées à l'aide d'un collecteur de la marque Gilson.

La modélisation moléculaire a été réalisée à partir du logiciel MOE Molecular Operating Environment (Chemical Computing Group Inc.).

Les synthèses en phase solide ont été réalisées dans des réacteurs chemisés, agités mécaniquement et dont le fond est un verre fritté muni d'un robinet permettant d'adapter une trompe à eau pour réaliser les filtrations et les lavages.

Les réacteurs ont été préalablement silanisés par le dichlorodiméthylsilane et la fonction réactive chlorosylilée est neutralisée par un rinçage au méthanol.

Test de Kaiser:

Ce test est un test colorimétrique permettant de caractériser les fonctions de type amine primaire. Dans un kimble contenant un aliquote de résine sont ajoutés 100 μL d'une solution de phénol à 0.85 M dans l'éthanol, 100 μL d'une solution de ninhydrine à 45mM dans l'éthanol et 100 μL d'une solution de cyanure de potassium à 20 μM dans la pyridine. Le kimble est placé dans un bain-marie à 110°C pendant 3 min. Le test est positif si la résine prend une coloration bleu foncée (présence d'amine primaire) sinon la résine demeure incolore. La sensibilité de ce test est de l'ordre de 1 μmole par g de résine.

Test de Christensen ou test au chloranil:

Ce test permet de caractériser les fonctions de type amine secondaire. Dans un kimble contenant un aliquote de résine sont ajoutés 200 μL d'acétone, suivis de 50 μL d'une solution saturée de chloranil (2,3,5,6-tétrachloro-1,4-benzoquinone). Le test est positif si la résine prend une coloration bleu foncée (présence d'amine primaire) sinon la résine demeure incolore. La sensibilité de ce test est de l'ordre de 2 à 5 μmoles par g de résine.

Test au bleu de bromophénol:

Ce test permet de caractériser les fonctions de type amine libre. Dans un kimble contenant un aliquote de résine sont ajoutés 3 gouttes d'une solution à 1% de bleu de bromophénol dans le diméthylacétamide. Le mélange hétérogène est agité pendant 1

minute. La présence d'amine dans le milieu est détectée par l'apparition d'une coloration bleue. La sensibilité de ce test est de l'ordre de 3 μ moles par g de résine.

Test à l'isatine :

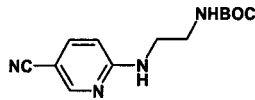
Ce test est un test qualitatif pour la détection de motifs proline. Une solution d'isatine (2 g) dans l'alcool benzylique (60 mL) est agitée pendant 2 heures à température ambiante. Cette solution est filtrée et Boc-Phe-OH (2.5 g) est ajouté au filtrat. Le test est réalisé en ajoutant 3 gouttes de cette solution à un aliquote de résine et en portant le kimble à une température de 100°C pendant 5 minutes. La présence de proline non substituée sur l'azote est détectée par l'apparition d'une coloration bleue.

Données cristallographiques :**Table 1. Crystal data and structure refinement for tbfcM.**

Identification code	tbfcM
Empirical formula	C ₂₈ H ₃₂ N ₂ O
Formula weight	412.56
Temperature	100(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system	monoclinic
Space group	P 2(1)/c
Unit cell dimensions	a = 18.051(3) Å α = 90°. b = 10.5444(17) Å β = 101.499(3)°. c = 12.0715(19) Å γ = 90°.
Volume	2251.5(6) Å ³
Z	4
Density (calculated)	1.217 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.073 mm ⁻¹
F(000)	888
Crystal size	0.4 x 0.3 x 0.15 mm ³
Theta range for data collection	2.25 to 27.99°.
Index ranges	-23 ≤ h ≤ 23, -13 ≤ k ≤ 13, -15 ≤ l ≤ 15
Reflections collected	16014
Independent reflections	4963 [R(int) = 0.0451]
Completeness to theta = 27.99°	91.5 %
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	4963 / 0 / 404
Goodness-of-fit on F ²	1.063
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0485, wR2 = 0.1162
R indices (all data)	R1 = 0.0723, wR2 = 0.1255
Largest diff. peak and hole	0.257 and -0.233 e.Å ⁻³

Chapitre 1:

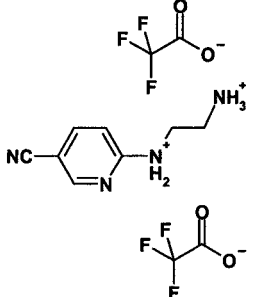
- *Tert*-butyl (2-(5-cyano-2-pyridylamino)éthyl)carbamate **2** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{13}H_{18}N_4O_2$	262,20

Une solution de 6-chloronicotinonitrile **1** (21.7 g, 160 mmoles, 1 éq.), d'hydrogénocarbonate de potassium (17.6 g, 176 mmoles, 1.1 éq.) et de Boc_2O (25.8 g, 160 mmoles, 1 éq.) dans 80 mL de DMF est chauffée à 90°C sous azote pendant 3 h. Le mélange est alors refroidi, une solution saturée de $NaHCO_3$ est ajoutée, et la phase organique est extraite avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée jusqu'à précipitation du produit désiré. De l'éther de pétrole est rajoutée, puis le milieu est filtré et lavé à l'acétate d'éthyle froid pour obtenir le produit désiré sous la forme d'une poudre blanche (27.2 g).

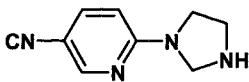
Rendement: 65%; **RMN 1H** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.41 (s, 9H), 3.30-3.42 (m, 2H), 3.44-3.56 (m, 2H), 4.92 (s, 1H), 5.72 (s, 1H), 6.39 (dd, 1H, $J=8.9$ Hz, $J=0.7$ Hz), 7.51 (dd, 1H, $J=8.9$ Hz, $J=2.2$ Hz), 8.30-8.36 (m, 1H).

- Trifluoroacétate de 6-(2-aminoéthylamino)nicotinonitrile **3**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_8H_{12}N_4 \cdot$ $2 C_2F_3O_2$	390,25

L'acide trifluoroacétique (125 mL) est ajouté à une solution de **2** (32.0 g, 120 mmoles) dans le DCM (125 ml), placée dans un bain de glace. Le milieu est alors placé sous agitation. A la fin du dégagement gazeux de CO_2 observé (2 h), la solution est évaporée sous pression réduite et puis 3 fois avec du toluène pour donner le composé désiré avec un rendement quantitatif. Le produit obtenu est aussitôt utilisé dans la synthèse du composé **4**.

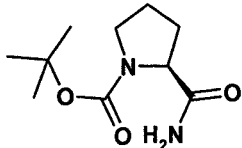
- 6-imidazolidin-1-yl-nicotinonitrile **4**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₉ H ₁₀ N ₄	174,21

Le composé **3** (120 mmoles) est solubilisé dans 1,3 L d'eau distillée. Une solution de formaldéhyde dans l'eau (37%) (15.5 g, 12.5 mL, 168 mmoles, 1.4 éq.) est ajoutée et le milieu est agité pendant 3 jours. Le milieu est alors concentré et l'eau résiduelle est éliminée par azéotropie avec le toluène (2 fois) et avec l'éther de pétrole (1 fois). Le résidu obtenu est solubilisé dans un mélange Et₂O/EtOH (50/50, V/V, 200 mL) et trituré pour initialiser la recristallisation. La solution est alors filtrée pour donner le produit attendu (11.4 g) sous la forme de sel de trifluoroacétate. Le produit est solubilisé dans une solution saturée de NaHCO₃ et extrait à l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée pour donner le produit désiré sous la forme d'une huile (6.7 g).

Rendement: 33%; **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 3.26-3.48 (m, 4H), 4.46 (s, 2H), 6.28 (d, 1H, J=8.7 Hz), 7.57 (dd, 1H, J=2.2 Hz, J=8.7 Hz), 8.37 (d, 1H, J=2.2 Hz).

- (2S)-2-(aminocarbonyl)-1-(*tert*-butyloxycarboxamido)-pyrrolidine (Boc-Pro-NH₂) **5** :

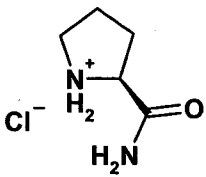
Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₃	214,27

6.458 g (30 mmoles, 1 éq.) de Boc-Pro-OH, 1500 µL de pyridine et 9 g (49 mmoles, 1.3 éq.) de Boc₂O sont solubilisés dans 150 mL de dioxane à température ambiante. 3 g (49 mmoles, 1.3 éq.) d'hydrogénocarbonate d'ammonium sont alors ajoutés et l'agitation est poursuivie pendant 16 h. Le milieu réactionnel est alors évaporé et dissout dans 50 mL d'acétate d'éthyle puis traité par 50 mL d'acide citrique à 20% et 50 mL de saumure. La phase acide citrique est extraite par de l'acétate d'éthyle et la phase organique est lavée par 50 mL d'une solution de NaHCO₃ (1M) puis séchée sur sulfate de magnésium et évaporée. Le produit

attendu est obtenu sous la forme d'une huile incolore qui après trituration dans l'éther de pétrole cristallise pour donner une poudre blanche.

Rendement: 80%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.44 (s, 9H), 1.84-2.21 (m, 4H), 3.20-3.48 (m, 2H), 4.20-4.30 (m, 1H), 6.60 (s, 1H), 6.80 + 6.94 (s, 1H, cis + trans); **LC-MS_1** [M+H]⁺ = 215.1 (%), **P_f**: 104-106°C.

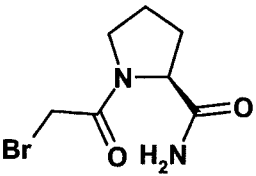
- Chlorure de (2S)-2-(aminocarbonyl)pyrrolidinium **6**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₅ H ₁₁ ClN ₂ O	150,61

Une solution d' HCl (4N) dans le dioxane (10 mL) est ajoutée à une solution de Boc-Pro-NH₂ **5** (5 g, 23 mmoles) dans le dioxane (10 mL). La réaction est laissée sous agitation pendant 1 h. Le produit sous forme de chlorhydrate précipite et il est filtré, lavé avec de l'éther diéthylique froid et séché sous vide pour donner le produit attendu sous la forme d'un solide blanc (4.52 g).

Rendement: 99%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.50-1.75 (m, 3H), 1.90-2.15 (m, 1H), 2.75-3.00 (m, 3H), 3.50 (m, 1H), 6.95 + 7.25 (s, 2H).

- 1-(bromoacétyl)-L-prolinamide **7**:

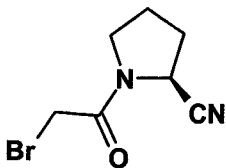
Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₇ H ₁₁ BrN ₂ O ₂	235,08

Une solution de **6** (5 g, 33 mmoles, 1 éq.), de DMAP (7 mg) et de triéthylamine (10.1 mL, 72.6 mmoles, 2.2 éq.) dans le DCM (75 mL) est ajoutée goutte à goutte à une solution de bromure de bromoacétyle (2.85 mL, 36 mmoles, 1.1 éq.) froide dans 30 mL de DCM, sur une

heure. Après 2 h d'agitation, 700 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés et le milieu est filtré et concentré pour donner le produit désiré (7.76 g).

Rendement: 99%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.88-2.42 (m, 4H), 3.48-3.72 (m, 2H), 3.84 (s, 2H), 4.44-4.60 (m, 1H), 5.56-5.88 (s, 2H).

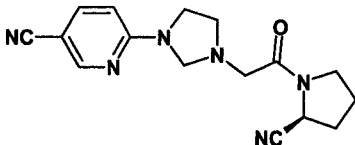
- (2*S*)-1-(bromoacétyl)pyrrolidine-2-carbonitrile **8** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₇ H ₉ BrN ₂ O	217,07

Le composé **7** (5 g, 22 mmoles, 1 éq.) est solubilisé dans le DCM (30 mL) et refroidi dans un bain de glace. Cette solution est ajoutée à une solution froide d'anhydride trifluoroacétique (6.15 mL, 44 mmoles, 2 éq.) sous azote pendant 15 min. Après 2 h d'agitation, le mélange est ajouté lentement à une solution saturée de NaHCO₃. La phase aqueuse est extraite avec du DCM. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec de l'eau distillée, séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Une chromatographie sur gel de silice (AcOEt/éther de pétrole, 75/25, V/V) donne le produit désiré sous la forme d'une huile orange (2.3 g).

Rendement: 50%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 2.00-2.50 (m, 4H), 3.44-4.02 (m, 2H), 3.81 (s, 2H), 4.68-4.80 + 4.82-4.90 (m, 1H).

- 6-{3-[2-(2-*S*-cyano-pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-éthyl]-imidazolidin-1-yl}-nicotinonitrile **9**:

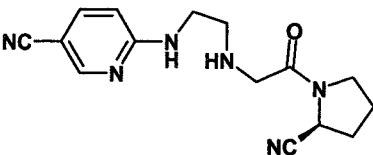
Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₆ H ₁₈ N ₆ O	310,36

Une solution de (2*S*)-1-(bromoacétyl)pyrrolidine-2-carbonitrile **8** (3.94 g, 18.1 mmoles, 1 éq.) dans le THF (20 mL) est additionnée à une solution de 6-imidazolidin-1-yl-nicotinonitrile

4 (3.16 g, 18.1 mmoles, 1 éq.) et de triéthylamine (2.8 mL, 2.0 g, 20 mmoles, 1.1 éq.) dans le THF, placée dans un bain de glace, sur une période de 30 min. La solution est alors agitée 6 h à température ambiante puis diluée dans une solution de NaHCO₃ (10%) et la phase organique est extraite au DCM (2 fois). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant un mélange (DCM/MeOH, 97.5/2.5, V/V) pour donner le composé attendu (3.4 g) sous la forme d'une poudre blanche.

Rendement: 66%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 2.04-2.42 (m, 4H), 3.18 (t, 2H, J=6.7 Hz), 3.34-3.76 (m, 6H) 4.26-4.42 (m, 2H), 4.74-4.80 et 4.95-5.04 (m, 1H, 3:1), 6.30 (d, 1H, J=8.9 Hz), 7.60 (dd, 1H, J=2.0 Hz, J=8.9 Hz), 8.38 (d, 1H, J=2.0 Hz); **LC-MS_2:** T_R = 2.05 min., [M+H]⁺ = 311 (%).

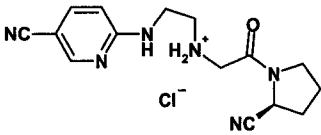
- (6-{2-[2-(2-*S*-cyano-pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-éthylamino]-éthylamino}-nicotinonitrile **10a** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₅ H ₁₈ N ₆ O	298,35

Une solution de 6-{3-[2-(2-*S*-cyano-pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-éthyl]-imidazolidin-1-yl}-nicotinonitrile **9** (3.15 g, 10.2 mmoles, 1 éq.) dans l'acide trifluoroacétique (10%) 250 mL est agitée à température ambiante pendant 24 h. Le milieu est alors refroidi dans un bain de glace et du carbonate de potassium est ajouté jusque la saturation et la phase organique est extraite au DCM. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant un mélange (DCM/MeOH, 90/10, V/V) pour donner le composé désiré (1.53 g) sous la forme d'un solide pâteux incolore.

Rendement: 50%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.84-2.30 (m, 4H), 2.71 (t, 2H, J=6.2Hz), 3.22-3.48 (m, 5H), 3.50-3.66 (m, 1H), 4.73 et 5.13 (dd, 1H, ratio ~85:15, J=4.7 Hz, J=6.4 Hz), 6.56 (d, 1H, J=8.9 Hz), 7.50-7.72 (m, 2H), 8.36 (d, 1H, J=2.0 Hz); **LC-MS_2:** [M+H]⁺ = 299 (100%).

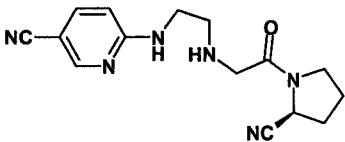
- Chlorhydrate de (6-{2-[2-(2-*S*-cyano-pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-éthylamino]-éthylamino}-nicotinonitrile **11a** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₅ H ₁₈ N ₆ O	334,81

Une solution d' HCl (4N) dans le dioxane (1.3 mL, 5.1 mmoles, 1 éq.) est ajoutée à une solution de (6-{2-[2-(2-*S*-cyano-pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-éthylamino]-éthylamino}-nicotinonitrile **10a** (1.53 g, 5.1 mmoles, 1 éq.) dans le dioxane. Le produit sous forme de sel de chlorhydrate précipite et il est filtré, lavé avec de l'éther diéthylique froid et séché sous vide pour donner un solide blanc du produit attendu (1.40 g).

Rendement: 82%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.88-2.30 (m, 4H), 3.13 (s, 2H), 3.32-3.50 (m, 1H), 3.52-3.98 (m, 4H), 4.00-4.22 (m, 1H), 4.84 (t, 1H, J=5.6 Hz), 6.64 (d, 1H, J=8.9 Hz), 7.76 (dd, 1H, J=8.9 Hz, J=2.1 Hz), 8.00 (br s, 1H), 8.43 (d, 1H, J=2.1 Hz), 9.25 (br s, 2H); **RMN ¹³C** (68 MHz, D₂O): 24.7, 29.6, 38.2, 46.3, 47.0, 47.1, 48.2, 97.3, 111.5, 117.9, 118.7, 141.6, 149.5, 156.8, 165.0; **LC-MS_2**: [M+H]⁺ = 299 (100%) ; **P_f** : 158-163 °C (Littérature : brevet WO98/19998, **P_f** = 155-157°C).

- (6-{2-[2-(2-*S*-cyano-pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-éthylamino]-éthylamino}-nicotinonitrile **10b** :

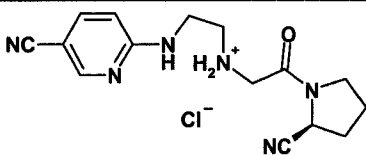
Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₅ H ₁₈ N ₆ O	298,35

6-{3-[2-(2-*S*-cyano-pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-éthyl]-imidazolidin-1-yl}-nicotinonitrile **9** (223 mg, 0.72 mmoles, 1 éq.) et la résine 3-(4-(hydrazinosulfonyl)phényl)propionyl AM (1.3 g, 1.9 mmoles, 2.5 éq.) sont solubilisés dans 20 mL de DCM. L'acide trifluoroacétique (3 mL) est additionné et la réaction est mise sous agitation à température ambiante pendant 1 h. La phase organique est filtrée sur fritté avec 100 mL de DCM et 200 mL d' EtOH. La phase organique est concentrée et le résidu est solubilisé dans 100 mL de DCM. Un lavage avec une solution de carbonate de potassium (30 mL) est effectué et la phase organique est concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant un

mélange DCM/MeOH (90/10, V/V) pour donner le composé désiré (162 mg) sous la forme d'un solide pâteux.

Rendement: 75%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.84-2.30 (m, 4H), 2.71 (t, 2H, J=6.2 Hz), 3.22-3.48 (m, 5H), 3.50-3.66 (m, 1H), 4.73 et 5.13 (dd, 1H, ratio ~85:15, J=4.7 Hz, J=6.4 Hz), 6.56 (d, 1H, J=8.9 Hz), 7.50-7.72 (m, 2H), 8.36 (d, 1H, J=2.0 Hz); **LC-MS_2:** [M+H]⁺ = 299 (100%).

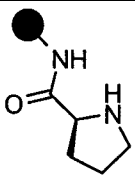
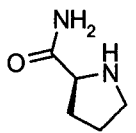
- Chlorhydrate de (6-{2-[2-(2-*S*-cyano-pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-éthylamino]-éthylamino}-nicotinonitrile **11b** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₅ H ₁₈ N ₆ O	334,81

Une solution d' HCl (4N) dans le dioxane (136 μL, 0.53 mmoles) est ajoutée à une solution de (6-{2-[2-(2-*S*-cyano-pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-éthylamino]-éthylamino}-nicotinonitrile **10b** (160 mg, 0.53 mmole) dans le dioxane. Le produit sous forme de sel chlorhydrate précipite et il est filtré, lavé avec de l'éther diéthylique froid et séché sous vide pour donner un solide blanc du produit attendu (140 mg).

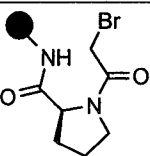
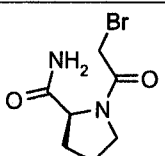
Rendement: 77%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.88-2.30 (m, 4H), 3.13 (s, 2H), 3.32-3.50 (m, 1H), 3.52-3.98 (m, 4H), 4.00-4.22 (m, 1H), 4.84 (t, 1H, J=5.6 Hz), 6.64 (d, 1H, J=8.9 Hz), 7.76 (dd, 1H, J=8.9 Hz, J=2.1 Hz), 8.00 (br s, 1H), 8.43 (d, 1H, J=2.1 Hz), 9.25 (br s, 2H); **RMN ¹³C** (68 MHz, D₂O): 24.7, 29.6, 38.2, 46.3, 47.0, 47.1, 48.2, 97.3, 111.5, 117.9, 118.7, 141.6, 149.5, 156.8, 165.0; **LC-MS_2:** [M+H]⁺ = 299 (100%) ; **P_f** : 158-163 °C (Littérature : brevet WO98/19998, **P_f** = 155-157°C).

- *L*-Pro-Résine **14** :

Structure	Structure décrochée	Formule brute	Masse moléculaire
		C ₅ H ₁₀ N ₂ O	114,15

La résine rink amide (5 g, 0.47 mmole/g, 2.4 mmoles) est déprotégée à température ambiante en mélangeant les billes de résine à une solution de pipéridine (20%) dans le DMF (50 mL) pendant 5 min. La solution est filtrée et l'opération de déprotection est renouvelée une seconde fois pendant 20 min. La résine est alors lavée avec une solution de DMF, suivie par du DCM et enfin du DMF. On obtient alors la résine **12**. TBTU (1.9 g, 5.9 mmoles, 2.5 éq.), HOBT (0.79 g, 5.9 mmoles, 2.5 éq.) et la DIEA (3.0 mL, 17 mmoles) sont additionnés à une solution de Fmoc-*L*-Pro-OH (2.0 g, 5.9 mmoles, 2.5 éq.) dans le DMF (30 mL). La solution jaune résultante est agitée à 0°C pendant 30 min., puis déposée sur la résine **12**. La réaction est alors agitée pendant 3 h à température ambiante jusqu'à ce que le test à la ninhydrine soit négatif. La résine est alors lavée avec une solution de DMF, suivie par du DCM et enfin du DMF, pour donner la Fmoc-*L*-Pro-Résine **13**. Cette résine est alors déprotégée comme précédemment avec une solution de pipéridine dans le DMF puis lavée avec du DMF, du DCM et du DMF à nouveau pour donner la *L*-Pro-Résine **14** qui est utilisée directement dans l'étape suivante. Un aliquote de la résine **14** est placé dans une solution de TFA dans le DCM (1/1) pour donner le (2*S*)-pyrrolidine-2-carboxamide sous la forme d'un sel de trifluoroacétate. **LC-MS_1**: [M+H]⁺ = 115 (100%).

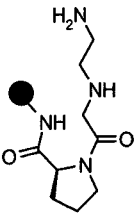
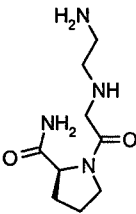
- *N*-bromoacétyl-*L*-Pro-Résine **15** :

Structure	Structure décrochée	Formule brute	Masse moléculaire
		C ₇ H ₁₁ BrN ₂ O ₂	235,08

Une solution d'acide bromoacétique (3.3 g, 24 mmoles, 10 éq.) dans le DMF (30 mL) est ajoutée sur la résine **14** (2.4 mmoles, 1 éq.), suivie par une solution de DIC (4.8 mL, 3.9 g, 31 mmoles, 13 éq.) dans le DMF (5 mL) et le mélange est agité à température ambiante

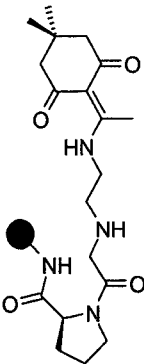
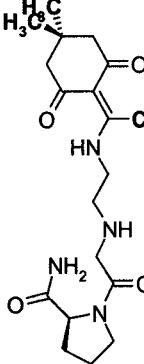
pendant 30 min. La résine est alors filtrée et la procédure est répétée une fois. La résine est de nouveau filtrée et lavée par le DMF, le DCM et le DMF pour donner la *N*-bromoacétyl-*L*-Pro-Résine **15** utilisée directement dans l'étape suivante. Un aliquote de la résine **15** est placé dans une solution de TFA dans le DCM (1/1) pour donner le (2*S*)-1-(bromoacétyl)pyrrolidine-2-carboxamide sous la forme d'un sel de trifluoroacétate. **LC-MS_1**: $[M+H]^+ = 236$ (100%).

- *N*-(2-aminoéthyl)-Gly-*L*-Pro-Résine **16** :

Structure	Structure décrochée	Formule brute	Masse moléculaire
		$C_9H_{18}N_4O_2$	214,27

Une solution d'éthylènediamine (2.3 mL, 2.1 g, 35 mmoles, 14 éq.) dans le DMSO (30 mL) est ajoutée à la résine **15** (2.4 mmoles, 1 éq.) et le mélange est agité pendant 2 h. Un lavage au DMF, suivi du DCM et enfin du DMF fournit la résine désirée: la résine *N*-(2-aminoéthyl)-Gly-*L*-Pro-Résine **16** qui est séchée sous vide en présence de P_2O_5 . Un aliquote de la résine **16** est placé dans une solution de TFA dans le DCM (1/1, V/V) pour donner le (2*S*)-1-[[2-(2-aminoéthyl)amino]acétyl]pyrrolidine-2-carboxamide. **LC-MS_1**: $[M+H]^+ = 215$ (100%).

- *N*-(*N*-[1-{{4,4-diméthyl-2,6-dioxo-cyclohexylidène}}-éthylamino]-2-aminoéthyl)-Gly-*L*-Pro-Résine **19** :

Structure	Structure décrochée	Formule brute	Masse moléculaire
		$C_{19}H_{30}N_4O_4$	378,48

Une solution de 2-acétyldimédone (0.69 g, 3.8 mmoles, 2 éq.) dans le DMF (10 mL) est ajoutée à la résine **16** (5.1 g, 1.9 mmoles, 1 éq.) dans le DMF (20 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 3 h à température ambiante jusqu'à avoir un test à la ninhydrine négatif. Un lavage au DMF, suivi du DCM et enfin du DMF fournit la résine désirée: *N*-(*N*-[1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-éthylamino]-2-aminoéthyl)-Gly-*L*-Pro-Résine **19** qui est utilisée directement dans l'étape suivante. Un aliquote de la résine **19** est placé dans une solution de TFA dans le DCM (1/1) pour donner le 1-(2-{2-[1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-éthylamino]-éthylamino}-acétyl)-pyrrolidine-2-carboxamide **19'** sous la forme d'un sel de trifluoroacétate.

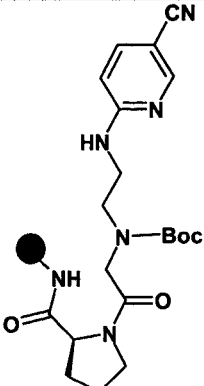
RMN ¹H (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 0.99 (s, 6H), 1.82-2.06 (m, 4H), 2.29 (s, 4H), 2.50 (s, 3H), 3.15-3.23 (m, 2H), 3.40-3.50 (m, 2H), 3.73-3.81 (m, 2H), 4.03 (s, 2H), 4.26 (m, 1H), 4.50 (s, 2H), 9.00 (s, 2H), 13.13-13.21 (m, 1H); **LC-MS_1**: [M+H]⁺ = 379 (100%).

- *N*-(2-aminoéthyl)-Boc-Gly-*L*-Pro-Résine **21** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	/	/

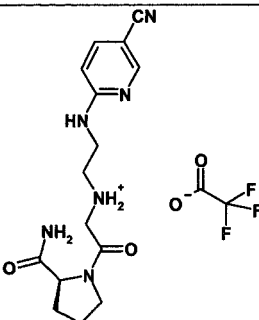
Une solution de di-*tert*-butyl dicarbonate (2.0 g, 9.2 mmoles, 5 éq.) et de DIEA (0.65 mL, 3.8 mmoles, 2 éq.) dans le dioxane (30 mL) est ajoutée à la résine **19** (1.9 mmoles, 1 éq.) en solution dans le dioxane (10 mL). La réaction est agitée à température ambiante pendant 2 h. Un lavage au DMF, suivi du DCM et enfin du DMF est réalisé. La résine **20**, précédemment obtenue, est traitée avec une solution d'hydrazine (2%) dans le DMF par flot continu (3mL/min.) pendant 20 min. Un lavage au DMF, suivi du DCM et enfin du DMF fournit la résine désirée: la *N*-(2-aminoéthyl)-Boc-Gly-*L*-Pro-Résine **21** qui est utilisée directement dans l'étape suivante après avoir été séchée sous vide en présence de P₂O₅.

- *N*-(*N*-[5-cyanopyridin-2-yl]-2-aminoéthyl)-Boc-Gly-*L*-Pro-Résine **22**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{15}H_{20}N_6O_2$	316,27

Le 6-chloronicotinonitrile (1.3 g, 9.5 mmoles, 1 éq.) et la DIEA (1.6 mL, 1.2 g, 9.5 mmoles, 1 éq.) sont ajoutés à la résine **21** (1.9 mmoles, 5 éq.) dans la *N*-méthylpyrrolidinone (30 mL). Le mélange est chauffé à 80°C dans un réacteur chemisé 80°C et mis sous agitation mécanique pendant 48 h. Un lavage au DMF, suivi du DCM et enfin du DMF fournit la résine désirée: la résine *N*-(*N*-[5-cyanopyridin-2-yl]-2-aminoéthyl)-Boc-Gly-*L*-Pro-Résine **22** qui est utilisée directement dans l'étape suivante après avoir été séchée sous vide en présence de P_2O_5 .

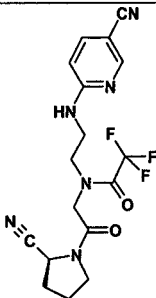
- *N*-[2-(5-cyano-pyridin-2-ylamino)-éthyl]-*N*-[2-(2-*S*-cyano-pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-éthyl]-acétamide **23** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{15}H_{21}N_6O_2 \cdot C_2F_3O_2$	430,39

La résine **22** (1.9 mmoles) est placée dans une solution d'acide trifluoroacétique dans le DCM (1/1) et le mélange est agité pendant 2 h à température ambiante. La solution est évaporée et le résidu est trituré dans l'éther diéthylique froid pour précipiter et donner le trifluoroacétate de 1-{2-[2-(5-cyano-pyridin-2-ylamino)-éthylamino]-acétyl}-pyrrolidine-2-*S*-carboxamide (0.70 g).

Rendement: 87%; **RMN ^1H** (300 MHz, d_6 DMSO) δ : 1.82-2.05 (m, 4H), 3.08-3.16 (m, 2H), 3.40-3.50 (m, 2H), 3.59-3.67 (m, 2H), 4.02 (s, 2H), 4.22-4.30 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 6.60 (d, 1H, $J=8.8$ Hz), 7.74 (dd, 1H, $J=8.8$ Hz, $J=2.1$ Hz), 7.81 (s, 1H), 8.42 (d, 1H, $J=2.1$ Hz), 9.00 (s, 2H); **LC-MS_1:** $[\text{M}+\text{H}]^+ = 317$ (100%).


- *N*-{2-[(5-cyanopyridin-2-yl)amino]éthyl}-*N*-{2-[(2*S*)-2-cyanopyrrolidin-1-yl]-2-oxoéthyl}-2,2,2-trifluoroacétamide **23a** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_2$	394,36

Le carboxamide **23** (0.54 g, 1.3 mmoles, 1 éq.) est solubilisé dans le THF anhydre (25 mL) à 0°C. L'anhydride trifluoroacétique (0.88 mL, 6.3 mmoles) est ajouté goutte à goutte à la solution. Le milieu réactionnel est alors mis sous agitation à 0°C pendant 2 h. La solution est alors évaporée et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant un mélange d'éluion (DCM/MeOH, 98/2, V/V puis 95/5, V/V) pour obtenir le *N*-{2-[(5-cyanopyridin-2-yl)amino]éthyl}-*N*-{2-[(2*S*)-2-cyanopyrrolidin-1-yl]-2-oxoéthyl}-2,2,2-trifluoroacétamide (0.35 g) sous la forme d'une poudre blanche.

Rendement: 70%; **RMN ^1H** (d_6 DMSO, 300 MHz) δ : 1.82-2.05 (m, 4H), 3.40-3.50 (m, 2H), 3.59-3.67 (m, 2H), 4.06-4.14 (m, 2H), 4.29 (s, 2H), 4.68-4.76 (m, 1H), 6.60 (d, 1H, $J=8.8$ Hz), 7.74 (dd, 1H, $J=8.8$ Hz, $J=2.1$ Hz), 7.81 (s, 1H), 8.42 (d, 1H, $J=2.1$ Hz); **LC-MS_1:** $[\text{M}+\text{H}]^+ = 395$ (100%).

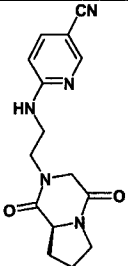
- *N*-(5-cyanopyridin-2-yl)-*N*-{2-[[2-[(2*S*)-2-cyanopyrrolidin-1-yl]-2-oxoéthyl]} (trifluoroacétyl)amino]éthyl}-2,2,2-trifluoroacétamide **23b** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₉ H ₁₆ F ₆ N ₆ O ₃	490,37

Le carboxamide **23** (0.10 g, 0.2 mmole) est solubilisé dans le THF anhydre (5 mL) à 0°C. L'anhydride trifluoroacétique (0.14 mL, 1 mmole, 5 éq.) est ajouté goutte à goutte à la solution. Le milieu réactionnel est alors mis sous agitation à 0°C pendant 2 h. La solution est alors évaporée. Le résidu est chromatographié sur gel de silice en utilisant un mélange d'élution (DCM/MeOH, 98/2, V/V puis 95/5, V/V). Dans ces conditions il n'a pas été possible d'isoler le composé désiré, l'unique composé obtenu après cette purification est le composé **23a**.

Rendement: 85% (conversion); **LC-MS_1** : [M+H]⁺ = 491 (100%).

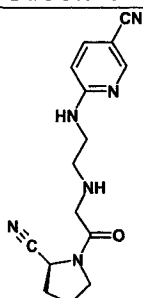
- 6-({2-[(8*aS*)-1,4-dioxohexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-2(1*H*)-yl]éthyl}amino)nicotinonitrile **24**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₅ H ₁₇ N ₅ O ₂	299,34

Le carboxamide **23** (0.010 g, 0.02 mmole) est solubilisé dans 1 mL de THF. La solution est portée à reflux et 2 mg d'oxyde de dibutylétain (0.3 éq.) sont alors ajoutés au milieu réactionnel. L'agitation, à reflux, est poursuivie pendant 3 h. Après conversion totale, le solvant est évaporé sous pression réduite, et le résidu est purifié par chromatographie sur couche épaisse en utilisant un mélange d'élution (DCM/MeOH, 98/2, V/V puis 95/5, V/V).

Rendement: 95% (conversion); **RMN ^1H** (d_6 DMSO, 300 MHz) δ : 1.70-1.76 (m, 1H), 1.91-1.99 (m, 1H), 1.99-2.15 (m, 1H), 2.38-2.50 (m, 1H), 3.15-3.25 (m, 1H), 3.48-3.62 (m, 2H), 3.72-3.90 (m, 3H), 4.05 (m, 1H), 4.97-4.69 (m, 1H), 6.60 (d, 1H, $J=8.8$ Hz), 7.74 (dd, 1H, $J=8.8$ Hz, $J=2.1$ Hz), 7.81 (s, 1H), 8.42 (d, 1H, $J=2.1$ Hz); **LC-MS $_1$** : $T_R = 0.97$ min., $[\text{M}+\text{H}]^+ = 300$ (100%).

- (6-{2-[2-(2-*S*-cyano-pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-éthylamino]-éthylamino}-nicotinonitrile **25** :

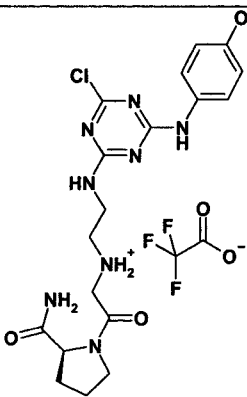
Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}$	298,35

Une solution aqueuse d'ammoniaque (33%, 0.50 mL) est ajoutée à une solution de **23a** (20 mg, 0.05 mmole) dans le DCM (2 mL). La réaction est agitée pendant 3 h à température ambiante. La solution est concentrée sous vide pour donner le composé (6-{2-[2-(2-*S*-cyano-pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-éthylamino]-éthylamino}-nicotinonitrile **25** sous la forme d'un solide pâteux (12 mg, 80%).

Une solution d' HCl (4N) dans le dioxane (10 μL , 0.04 mmole) est ajoutée à une solution de (6-{2-[2-(2-*S*-cyano-pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-éthylamino]-éthylamino}-nicotinonitrile (12 mg, 0.04 mmole) dans le dioxane. Le produit sous forme de sel chlorhydrate précipite et il est filtré, lavé avec de l'éther diéthylique froid et séché sous vide pour donner un solide blanc du produit attendu.

RMN ^1H (300 MHz, d_6 DMSO) δ : 1.88-2.30 (m, 4H), 3.13 (s, 2H), 3.32-3.50 (m, 1H), 3.52-3.98 (m, 4H), 4.00-4.22 (m, 1H), 4.84 (t, 1H, $J=5.6$ Hz), 6.64 (d, 1H, $J=8.9$ Hz), 7.76 (dd, 1H, $J=8.9$ Hz, $J=2.1$ Hz), 8.00 (s, 1H), 8.43 (d, 1H, $J=2.1$ Hz), 9.25 (s, 2H); **RMN ^{13}C** (68 MHz, D_2O): 24.7, 29.6, 38.2, 46.3, 47.0, 47.1, 48.2, 97.3, 111.5, 117.9, 118.7, 141.6, 149.5, 156.8, 165.0; **LC-MS $_2$** : $[\text{M}+\text{H}]^+ = 299$ (100%); **P $_f$** : 158-163 °C (Littérature : brevet WO98/19998, **P $_f$** = 155-157°C).

- Trifluoroacétate de *N*-[2-({4-chloro-6-[(4-méthoxyphényl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl}amino)éthyl]glycyl-*L*-prolinamide **26** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{19}H_{26}ClN_8O_3 \cdot C_2F_3O_2$	562,94

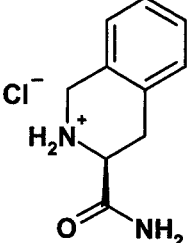
Un large excès du dérivé triazine **31** (1.274 g, 4.7 mmoles, 5 éq.) dans le DCM (15 mL) est ajouté à la résine **21** (0.94 mmole), suivie par la DIEA (821 μ L, 4.7 mmoles, 5 éq.). La réaction de substitution est agitée mécaniquement à température ambiante jusqu'à avoir un test de Kaiser négatif (3 h). La résine est alors lavée par du DMF, du DCM et du DMF et séchée sous vide.

Coupage acidolytique :

La résine est disposée dans un ballon de 250 mL, 40 mL d'une solution (50% TFA, 50% DCM) est alors ajoutée dans le milieu. L'agitation à température ambiante de cette solution est effectuée au moyen d'un barreau magnétique et pour une période de 2 h. La résine est filtrée sur fritté et la solution récupérée est évaporée sous vide. Le filtrat ainsi obtenu est déposé goutte à goutte dans 40 mL de diéthyl éther préalablement refroidi afin d'obtenir un précipité. Celui-ci est isolé par centrifugation, puis lyophilisé pour donner 423 mg d'une poudre beige.

Rendement: 80%; **RMN ¹H** (300 MHz, *d*₆ DMSO) δ : 1.82-2.05 (m, 4H), 3.08-3.16 (m, 2H), 3.40-3.50 (m, 2H), 3.59-3.67 (m, 4H), 3.75 (s, 3H), 4.02 (s, 2H), 4.22-4.30 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 6.85 (m, 2H), 7.43 (m, 2H), 7.81 (s, 1H), 9.05 (s, 1H); **LC-MS_1**: $T_R = 1.56$ min., $[M+H]^+ = 449$ (80%).

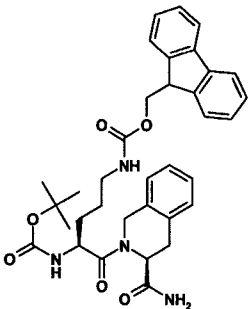
- Chlorure de (3S)-3-(aminocarbonyl)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinolinium **27**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O	212,68

Une solution de Boc-Tic-OH (3 g, 10.8 mmoles, 1 éq.) dans 30 mL de DCM/DMF (9/1, V/V) est mise sous agitation à température ambiante. HOBt (2.92 g, 21.6 mmoles, 2 éq.) et EDCI (2.49 g, 13 mmoles, 1.2 éq.) sont ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange est alors agité 2 h. Les solvants sont alors éliminés par évaporation sous pression réduite, le résidu est solubilisé dans 200 mL d'acétate d'éthyle et la phase organique est lavée avec 100 mL de saumure. La phase aqueuse est extraite 3 fois à l'acétate d'éthyle (30 mL) et les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium et évaporées sous pression réduite. Le résidu obtenu est solubilisé dans 30 mL de dioxane et 10 mL d'une solution d'ammoniaque aqueux (25%) sont additionnés. Le milieu réactionnel est alors mis sous agitation à température ambiante 18 h. La solution est évaporée sous vide, le résidu est purifié par chromatographie en utilisant un mélange CHCl₃/MeOH (9/1) comme éluant pour donner une huile incolore. Cette huile est solubilisée dans 30 mL d'une solution d'HCl dans le dioxane (4N) et le milieu est mis sous agitation 1 h. La solution est alors évaporée pour donner 1.25 g d'une poudre blanche.

Rendement: 65% (3 étapes); **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 2.9-3.1 (m, 1H), 3.3-3.4 (m, 1H), 3.8-4.4 (m, 5H), 7.25 (s, 4H), 9.3-10.1 (m, 2H); **LC-MS_2:** [M+H]⁺ = 178 (90%).

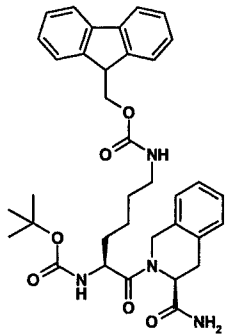
- Boc-Orn(Fmoc)-Tic-NH₂ **28a** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₃₅ H ₄₀ N ₄ O ₆	612,73

Une solution de Boc-Orn(Fmoc)-OH (1.18 g, 2.4 mmoles, 1.1 éq.) et de DIEA (1.28 mL, 7.2 mmoles, 3 éq.) dans un mélange DCM/DMF (9/1) est mise sous agitation à température ambiante. Le composé **27** (500 mg, 2.3 mmoles, 1 éq.) est ajouté à la solution, suivi de PyBroP (1.21 g, 2.4 mmoles, 1.1 éq.). L'agitation est poursuivie toute une nuit. La solution est évaporée, le résidu est solubilisé dans 100 mL d'acétate d'éthyle et lavé 3 fois avec une solution de KHSO₄ (5%), 1 fois avec de la saumure, 3 fois avec une solution de NaHCO₃, 1 fois avec une solution de saumure, la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée pour donner une poudre jaune. Le composé final est obtenu par purification sur colonne de silice en utilisant un mélange DCM/MeOH (98/2 puis 9/1, V/V) pour donner 800 mg d'une poudre blanche.

Rendement: 70%; **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.0-2.0 (m, 13H), 2.8-3.44 (m, 4H), 4.1-5.1 (m, 6H), 5.2-5.7 (m, 4H), 6.09 (s, 1H), 6.99-7.73 (m, 12H); **LC-MS** **2**: T_R = 5.33 min. , [M+H]⁺ = 613.2 (100%).

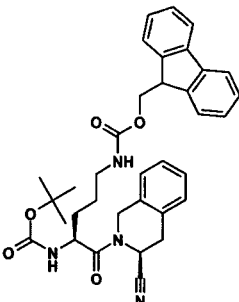
- Boc-Lys(Fmoc)-Tic-NH₂ **28b** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₃₆ H ₄₂ N ₄ O ₆	626,76

Le protocole opératoire est identique au protocole de la synthèse du composé **28a** en partant de 1.3 g de Boc-Lys-OH (2.4 mmoles) pour donner 1.2 g du composé **28b**.

Rendement: 82%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.21-2.00 (m, 15H), 3.00-3.31 (m, 4H), 4.05-5.15 (m, 6H), 5.27-5.54 (m, 4H), 6.11 (s, 1H), 7.01-7.83 (m, 12H) ; **LC-MS_2:** T_R = 5.44 min., [M+H]⁺ = 627.3 (100%).

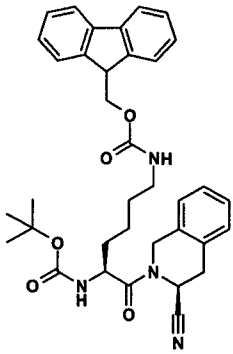
- Boc-Orn(Fmoc)-Tic-CN **29a** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₃₅ H ₃₈ N ₄ O ₅	594,72

Le composé **28a** (800 mg, 1.3 mmoles, 1 éq.) est solubilisé dans 20 mL de THF et la solution est placée à 0°C dans un bain de glace. 200 µL de triéthylamine (1.1 éq.) et 206 µL d'anhydride trifluoroacétique sont ajoutés. La solution est alors agitée 10 min. et 200 µL de triéthylamine (1.1 éq.) sont de nouveau ajoutés. L'agitation est maintenue pendant 30 min. à 0°C. La solution est alors diluée par l'ajout de 100 mL d'acétate d'éthyle, puis lavée avec 50 mL d'eau déminéralisée, 50 mL de saumure, et séchée sur sulfate de magnésium pour être concentrée sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice avec comme éluant un mélange DCM/EtOH (98/2 à 95/5, V/V) pour donner 500 mg d'une poudre blanche.

Rendement: 65%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.0-2.0 (m, 13H), 3.0-3.4 (m, 4H), 4.1-5.2 (m, 6H), 5.28 (m, 2H), 5.99 (s, 1H), 7.01-7.85 (m, 12H); **LC-MS_2:** T_R = 6.14 min., [M+H]⁺ = 595.2 (60%).

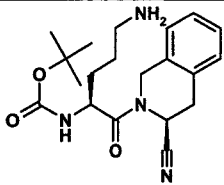
- Boc-Lys(Fmoc)-Tic-NH₂ **29b** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₃₆ H ₄₀ N ₄ O ₅	608,74

Le protocole opératoire est identique au protocole de la synthèse du composé **29a** en partant de 800 mg du composé **28b** (1.28 mmoles) pour donner 700 mg du composé **29b**.

Rendement: 90%; **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.11-2.00 (m, 15H), 3.00-3.31 (m, 4H), 4.05-5.15 (m, 6H), 5.27 (m, 2H), 5.94 (s, 1H), 7.01-7.83 (m, 12H); **LC-MS_2:** T_R = 6.26 min., [M+H]⁺ = 609.5 (60%).

- Boc-Orn-CN **30a** :

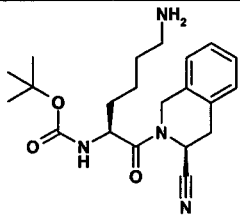
Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₀ H ₂₈ N ₄ O ₃	372,47

Le composé **29a** (400 mg, 0.67 mmole, 1 éq.) est solubilisé dans 20 mL de THF. 4 mL de diéthylamine sont alors additionnés au milieu réactionnel qui est placé sous agitation pendant 3 h à température ambiante. La solution est alors évaporée pour donner une huile jaune. Le produit désiré **30a** est obtenu, sous la forme d'une huile incolore (213 mg), par purification sur gel de silice en utilisant comme éluant un mélange DCM/EtOH/Et₃N (400/40/0 à 400/40/5, V/V/V).

Rendement: 85%; **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.20-2.05 (m, 13H), 2.10-2.40 (s, 2H), 2.70-2.90 (t, 2H, J=6.1 Hz), 3.00-3.30 (m, 2H), 4.60-4.80 (d, 2H, J = 15.6 Hz), 4.90-5.05 (d,

1H, J=15.6 Hz), 5.35-5.50 (d, 1H, J=7.6 Hz), 5.85-5.95 (m, 1H), 7.10-7.30 (m, 4H); **LC-MS_2**: $T_R = 2.94$ min., $[M+H]^+ = 373.4$ (100%).

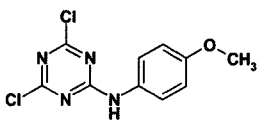
- Boc-Lys-CN **30b** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{21}H_{30}N_4O_3$	386,50

Le protocole opératoire est identique au protocole de la synthèse du composé **30a** en partant de 600 mg du composé **29b** (0.98 mmole) pour donner 361 mg du composé **30b**.

Rendement: 86%; **RMN 1H** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.20-2.05 (m, 17H), 2.65-2.80 (t, 2H, J=6.1 Hz), 3.00-3.30 (m, 2H), 4.60-4.80 (d, 2H, J = 15.6 Hz), 4.90-5.05 (d, 1H, J=15.6 Hz), 5.25-5.35 (d, 1H, J=7.6 Hz), 5.90-6.00 (m, 1H), 7.10-7.30 (m, 4H); **LC-MS_2**: $T_R = 3.07$ min., $[M+H]^+ = 387.4$ (100%).

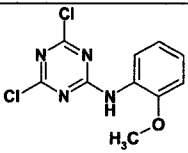
- 4,6-dichloro-*N*-(4-méthoxyphényl)-1,3,5-triazin-2-amine **31**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{10}H_8Cl_2N_4O$	271,11

La 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine (1.84 g, 10 mmoles, 1 éq.), disposée dans chaque tube du carousel, est solubilisée dans 20 mL d'acétonitrile. La solution est placée à $-30^\circ C$ (carboglace+acétone) et agitée pendant 30 minutes. La 4-méthoxyaniline (1.23 g, 10 mmoles, 1 éq.) est additionnée et l'agitation est maintenue à $-30^\circ C$ pendant 1 h. 5 mL d'eau sont alors ajoutés à la solution, le précipité est filtré et séché pour donner 2.45 g d'une poudre marron.

Rendement: 80%; **RMN 1H** (300 MHz, d_6 DMSO) δ : 3.75 (s, 3H), 6.85 (m, 2H), 7.43 (m, 2H); **LC-MS_1**: $T_R = 2.32$ min., $[M+H]^+ = 271$ (100%).

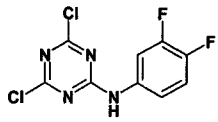
- 4,6-dichloro-*N*-(2-méthoxyphényl)-1,3,5-triazin-2-amine **32**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₀ H ₈ Cl ₂ N ₄ O	271,11

Le protocole opératoire est identique au protocole utilisé pour la synthèse du composé **31**, appliqué à la 2-méthoxyaniline (1.23 g, 10 mmoles, 1 éq.) pour obtenir 2.22 g d'une poudre marron.

Rendement: 74%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 3.75 (s, 3H), 6.88 (dd, 1H, J=8.11 Hz, J=1.31 Hz), 6.97 (td, 1H, J=8.07 Hz, J=1.36 Hz), 7.09 (td, 1H, J=8.07 Hz, J=1.46 Hz), 8.16 (s, 1H), 8.23 (dd, 1H, J=8.09 Hz, J=1.61 Hz); **LC-MS_1:** T_R = 2.45 min., [M+H]⁺ = 271 (100%).

- 4,6-dichloro-*N*-(3,4-difluorophényl)-1,3,5-triazin-2-amine **33**:

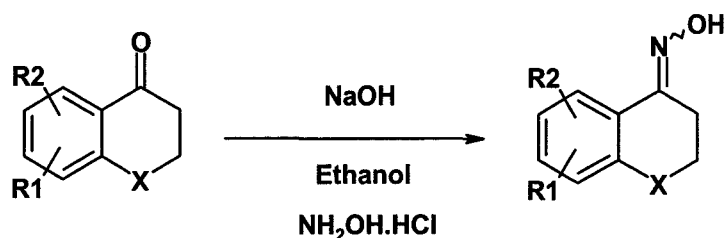
Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₉ H ₄ Cl ₂ F ₂ N ₄	277,06

Le protocole opératoire est identique au protocole utilisé pour la synthèse du composé **31**, appliqué à la 3,4-difluoroaniline (1.29 g, 10 mmoles, 1 éq.) pour obtenir 2.70 g d'une poudre blanche.

Rendement: 98%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 7.05 (q, 1H, J=8.9 Hz), 7.40 (dm, 1H, J=9.03 Hz), 7.72 (dd, 1H, J=9.03 Hz, J=2.66 Hz); **LC-MS_1:** T_R = 2.5 min., [M+H]⁺ = 278 (80%).

Chapitre 2 :

Procédure générale pour la formation des cétones oximes : Méthode a.



Une solution d'hydroxyde de sodium (54.72 g, 1.368 moles, 5 éq.) dans 25 mL d'eau distillée est ajoutée lentement à une solution de chlorure d'hydroxylamine (31.69 g, 0.456 mole, 1.7 éq.) et de cétone (0.274 mole, 1 éq.), le tout dissout dans 100 mL d'éthanol. Le mélange est mis sous agitation, puis chauffé à reflux pendant 1 h. Une fois refroidie, la solution est introduite dans 1L d'eau contenant 150 mL d'acide chlorhydrique concentré. Ce mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 30 min.

Le solide ainsi obtenu est collecté par filtration, puis lavé à l'eau et séché sous vide, pour donner une poudre beige. Cette poudre obtenue est recristallisée dans un mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole (10/90, V/V) pour donner une poudre beige clair.

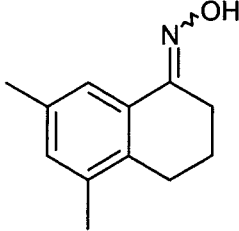
Cette méthode a été appliquée aux composés **34**, **35**, **36**, **37**, **38**.

- 3,4-dihydro-2*H*-naphthalèn-1-one oxime **34**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₀ H ₁₁ NO	161,21

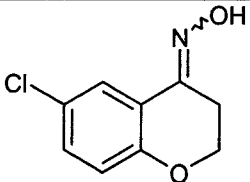
Rendement: 85%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: (E) 1.87 (q, 2H, J = 5.21 Hz); 2.76 (t, 2H, J = 6.01 Hz), 2.84 (t, 2H, J = 6.63 Hz); 7.10-7.30 (m, 3H); 7.88 (dd, 1H, J = 7.55 Hz, J = 1.21 Hz), 8.75 (s, 1H); **LC-MS₁**: Tr = 2.25 min, [M+H]⁺=162.

- 5,7-diméthyl-3,4-dihydro-2H-naphthalèn-1-one oxime **35**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₂ H ₁₅ NO	189,26

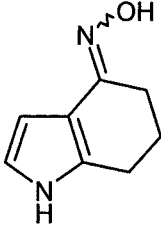
Rendement: 85%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) (E) δ: 1.87 (q, 2H, J = 6.78 Hz); 2.24 (s, 3H); 2.29 (s, 3H); 2.65 (t, 2H, J = 6.10 Hz); 2.79 (t, 2H, J = 6.44 Hz); 7.00 (s, 1H); 7.60 (s, 1H); 8.25 (s, 1H); **LC-MS_1**: Tr = 2.33 min, [M+H+CH₃CN]⁺=231, [M+H]⁺=190.

- 6-chloro-chroman-4-one oxime **36**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₉ H ₈ ClNO ₂	197,62

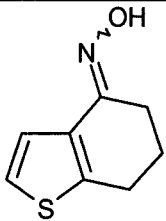
Rendement: 14%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) (E/Z: 5/1) (E): δ: 2.98 (t, 2H, J = 6.26 Hz); 4.24 (t, 2H, J = 6.11 Hz); 6.87 (d, 1H, J=8.78 Hz); 7.22 (dd, 1H, J=8.80 Hz, J=2.61 Hz); 7.80 (sd, 1H, J=2.57 Hz), 8.26 (s, 1H); (Z): 2.80 (t, 2H, J=6.20 Hz); 4.54 (t, 2H, J=6.01 Hz); 6.95 (d, 1H, J=8.78 Hz); 7.35 (dd, 1H, J=8.65 Hz, J=2.40 Hz); 7.90 (sd, 1H, J=2.40 Hz), 8.28 (s, 1H); (Z) : **LC-MS_1**: T_R = 2.38 min, [M+H]⁺=198 (70%).

- 1,5,6,7-tétrahydro-indol-4-one oxime **37**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₈ H ₁₀ N ₂ O	150,18

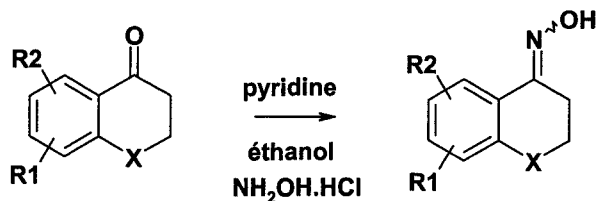
Rendement: 80%; **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3) (E) δ : 2.03 (m, 2H); 2.51 (m, 2H); 2.75 (m, 2H); 6.65 (sd, 1H, $J=2.01$ Hz); 7.18 (sd, 1H, $J=1.93$ Hz); 9.25 (s, 1H); 11.25 (s, 1H); **LC-MS_1**: $T_R = 0.82$ min, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 151$ (50%).

- 6,7-dihydro-5H-benzothiophèn-4-one oxime **38**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$\text{C}_8\text{H}_9\text{NOS}$	167,23

Rendement: 52%; **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3) (E) δ : 2.03 (m, 2H); 2.51 (m, 2H); 2.75 (m, 2H); 6.83 (m, 1H); 7.35 (m, 1H); 9.25 (s, 1H); **LC-MS_1**: $T_R = 1.91$ min., $[\text{M}+\text{H}]^+ = 168$ (100%).

Procédure générale pour la formation des cétones oximes : Méthode b.

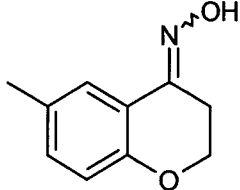


La cétone (1 éq., 25 mmoles), le chlorure d'hydroxylamine (2 éq., 3.48 g, 50 mmoles), la pyridine (2 éq., 4.08 mL, 50 mmoles) sont introduits dans 30 mL d'éthanol 95%. Le mélange est mis sous agitation et chauffé à reflux dans un bain d'huile pendant 1 h. Le suivi de la réaction est réalisé par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant comme éluant un mélange DCM/EtOH (99/1, V/V). Lorsque la réaction est totale (après 1h), la phase organique est évaporée, de l'eau distillée est ajoutée au résidu obtenu, le précipité formé est filtré sur fritté puis lavé à l'eau distillée et séché au dessiccateur.

La recristallisation du produit est obtenue en utilisant un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (99/1, V/V). Le produit est alors filtré, lavé au cyclohexane et séché sous vide.

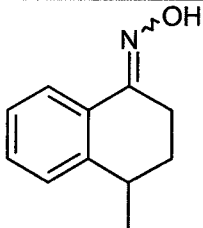
Ce protocole a été utilisé pour les composés **39, 40, 41, 42, 43, 44, 45**.

- 6-méthyl-chroman-4-one oxime **39**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₀ H ₁₁ NO ₂	177,20

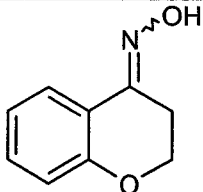
Rendement: 70%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) (E): δ: 2.28 (s, 3H); 2.99 (t, 2H, J=6.31 Hz); 4.23 (t, 2H, J=6.18 Hz); 6.81 (d, 1H, J=8.47 Hz); 7.08 (dd, 1H, J=8.45, J=2.24 Hz); 7.61 (sd, 1H, J=2.24 Hz), 8.75 (s, 1H); **LC-MS_1**: T_R = 2.03 min., [M+H]⁺=178 (40%).

- 4-méthyl-3,4-dihydro-2H-naphthalèn-1-one oxime **40**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₁ H ₁₃ NO	175,23

Rendement: 66%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) (E) δ: 1.30 (d, 3H, J=7.01 Hz); 1.70 (m, 1H); 1.95 (m, 1H); 2.88 (m, 3H); 7.18-7.24 (m, 2H); 7.31 (m, 1H); 7.86 (sd, 1H, J=8 Hz), 8.66 (s, 1H); **LC-MS_1**: T_R = 2.29 min., [M+H]⁺=176 (100%).

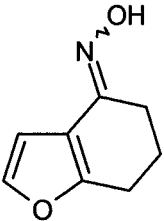
- Chroman-4-one oxime **41**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₉ H ₉ NO ₂	163,18

Rendement: 84%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) (E) δ: 3.02 (t, 2H, J=6.35 Hz); 4.25 (t, 2H, J=6.24 Hz); 6.80-7.00 (m, 2H); 7.27 (td, 1H, J=7.42 Hz, J=1.69 Hz); 7.81 (dd, 1H,

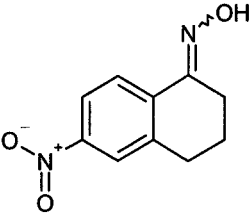
$J=7.91$ Hz, $J=1.69$ Hz), 8.32 (s, 1H); **LC-MS_1**: $T_R = 1.76$ min., $[M+H+CH_3CN]^+ = 205$ (5%), $[M+H]^+ = 164$ (90%).

- 6,7-dihydro-5H-benzofuran-4-one oxime **42**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_8H_9NO_2$	151,17

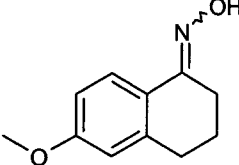
Rendement: 70%; **RMN 1H** (300 MHz, $CDCl_3$) (E/Z = 1/1) (E) δ : 2.03 (m, 2H); 2.51 (m, 2H); 2.75 (m, 2H); 6.65 (sd, 1H, $J=2.01$ Hz); 7.27 (sd, 1H, $J=1.93$ Hz); 9.25 (s, 1H); (Z) δ : 2.03 (m, 2H); 2.51 (m, 2H); 2.75 (m, 2H); 7.13 (sd, 1H, $J=1.98$ Hz); 7.32 (sd, 1H, $J=1.65$ Hz), 9.25 (s, 1H); **LC-MS_1**: (E) $T_R = 1.6$ min., $[M+H]^+ = 152$ (50%), (Z) $T_R = 1.54$ min., $[M+H]^+ = 152$ (50%).

- 6-nitro-3,4-dihydro-2H-naphthalèn-1-one oxime **43**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{10}H_{10}N_2O_3$	206,20

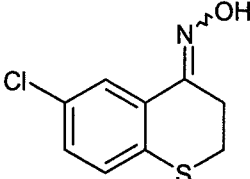
Rendement: 86%; **RMN 1H** (300 MHz, $CDCl_3$) (E) δ : 1.78 (q, 2H, $J=6.14$ Hz), 2.68 (t, 2H, $J=6.56$ Hz), 2.83 (t, 2H, $J=5.96$ Hz), 3.34 (s, 1H), 7.47 (d, 1H, $J=8.47$ Hz), 8.05 (dd, 1H, $J=8.44$ Hz, $J=1.23$ Hz), 8.59 (sd, 1H, $J=1.23$ Hz); **LC-MS_1**: $T_R = 2.22$ min., $[M+H]^+ = 207$ (100%).

- 6-méthoxy-3,4-dihydro-2*H*-naphthalèn-1-one oxime **44**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₁ H ₁₃ NO ₂	191.23

Rendement: 90%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) (E) δ: 1.65 (q, 2H, J=6.5 Hz), 2.55 (t, 2H, J=6.5 Hz), 2.60 (t, 2H, J=6 Hz), 3.65 (s, 3H), 6.65-6.70 (m, 2H), 7.70 (d, 1H, J=8.6 Hz), 10.75 (s, 1H); **LC-MS_1**: T_R = 2.12 min., [M+H]⁺=192 (100%).

- 6-chloro-thiochroman-4-one oxime **45**:

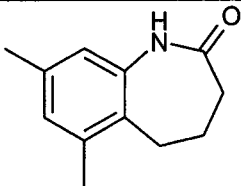
Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₉ H ₈ ClNOS	213,69

Rendement: 82%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) (E) δ: 2.96 (t, 2H, J=5.41 Hz); 3.15 (t, 2H, J=5.41 Hz); 7.18 (m, 2H); 7.89 (m, 1H); 9.25 (s, 1H); **LC-MS_1**: T_R = 2.41 min., [M+H]⁺=214 (20%), [M+H+CH₃CN]⁺=255 (15%).

Extension de cycle par transposition de Beckmann :

Le pentoxyde de phosphore (5 g, 35.2 mmoles, 1.6 équ.) est additionné par petites portions à une solution d'acide méthane sulfonique (40 mL) et le mélange est mis sous agitation et chauffé à 100°C pendant 3 h. NW 1908 (4 g, 21.1 mmoles, 1 équ.) est alors additionné au milieu réactionnel. Le milieu est alors agité à reflux toute la nuit. Après refroidissement, 300 mL d'une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium sont ajoutés au milieu. La phase organique est extraite par 2x100 mL de dichlorométhane, lavée par une solution d'hydrogénocarbonate de sodium, par une solution saturée de chlorure de sodium, séchée et concentrée sous vide. Le résidu obtenu est recristallisé dans une solution d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole pour donner l'amide désiré sous la forme d'un solide marron clair.

- 6,8-diméthyl-1,3,4,5-tétrahydro-2H-1-benzazépin-2-one **46**:

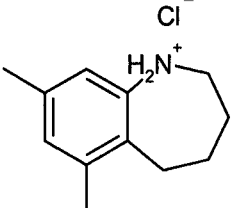
Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₂ H ₁₅ NO	189.26

Rendement: 60%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) (E) δ: 1.87 (q, 2H, J=6.2 Hz); 2.24 (s, 3H); 2.29 (s, 3H); 2.65 (t, 2H, J=6.12 Hz); 2.79 (t, 2H, J=7.00 Hz); 7.00 (s, 1H); 7.59 (s, 1H); 8.25 (s, 1H); **LC-MS_1:** T_R = 2.16 min., [M+H]⁺=190 (100%).

Réduction :

Une solution du composé **46** (1 g, 5.3 mmoles) dans 20 mL de THF anhydre est ajoutée lentement à une suspension de LiAlH₄ (1 g) dans 40 mL de THF anhydre agitée à 0°C. Le mélange est agité et laissé revenir à température ambiante, puis il est chauffé à reflux pendant 1 h. Le milieu est de nouveau refroidit, la réaction est arrêtée par addition goutte à goutte d'une solution concentrée d'ammoniaque (10 mL) dans 40 mL de THF. La suspension ainsi formée est agitée pendant 1 h à température ambiante. Le tout est filtré sur célite et la phase organique est concentrée pour donner une huile jaune pâle. Cette huile est traitée par une solution concentrée d'acide chlorhydrique (20 mL), la solution obtenue est mise sous agitation pendant une nuit. La phase aqueuse est alors évaporée et le sel est lavé par l'éther diéthylique pour donner une poudre blanche.

- Chlorure de 6,8-diméthyl-2,3,4,5-tétrahydro-1H-1-benzazépinium **47**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₂ H ₁₈ ClN	211,73

Rendement: 60%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.66 (m, 2H); 2.09 (m, 2H); 2.30 (s, 3H); 2.33 (s, 3H); 3.00 (t, 2H, J=5.10 Hz); 3.26 (m, 2H); 7.14 (s, 1H); 7.34 (s, 1H); **LC-MS_1:** T_R = 1.49 min., [M+H]⁺=176 (45%).

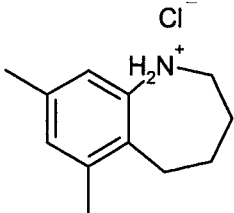
Procédure d'extension de cycle par le DIBALH:

La cétone oxime (15.9 mmoles, 1 éq.) est introduite dans un bicol de 250 mL. 25 mL de dichlorométhane anhydre sont alors ajoutés au solide. Le mélange est alors mis sous agitation à 0°C. 65 mL de DIBALH (solution 1M dans le dichlorométhane, 4.5 éq.) sont additionnés lentement au milieu réactionnel. La solution est alors agitée à 0°C pendant 2 h. 19.23 g de fluorure de potassium (331 mmoles) sont alors ajoutés lentement et par petites fractions à la solution, suivis de 6 mL d'eau distillée goutte à goutte tout en maintenant l'agitation. L'agitation est maintenue pendant 20 min. supplémentaires. Le milieu est filtré sur célite, séché sur sulfate de magnésium et évaporé pour donner une huile jaune pâle.

Cette huile est solubilisée dans 20 mL d'éther diéthylique et 5 mL d'une solution d'acide chlorhydrique dans le dioxane (4N) sont additionnés. Le précipité obtenu est filtré et lavé à l'éther diéthylique froid et au dioxane, puis séché sous vide.

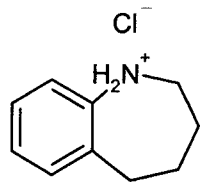
Ce protocole opératoire a été appliqué à la synthèse des composés **47'**, **48**, **49**, **50**, **51**, **52**, **53**, **54** à partir des cétones oximes correspondantes.

- Chlorure de 6,8-diméthyl-2,3,4,5-tétrahydro-1H-1-benzazépinium **47'**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₂ H ₁₈ ClN	211,73

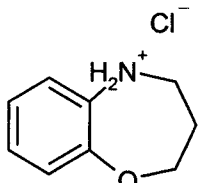
Rendement: 80%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.66 (m, 2H); 2.09 (m, 2H); 2.30 (s, 3H); 2.33 (s, 3H); 3.00 (t, 2H, J=5.10 Hz); 3.26 (m, 2H); 7.14 (s, 1H); 7.34 (s, 1H); **LC-MS_1**: T_R = 1.48 min., [M+H]⁺=176 (50%).

- Chlorure de 2,3,4,5-tétrahydro-1H-1-benzazépinium **48**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₀ H ₁₄ ClN	183,68

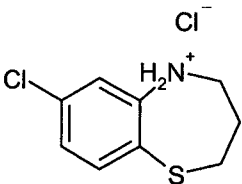
Rendement: 50%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.73 (m, 2H); 2.22 (m, 2H); 3.07 (t, 2H, J=6.72 Hz); 3.30 (t, 2H, J=6.40 Hz); 7.40 (m, 3H); 7.72 (dd, 1H, J=5.56 Hz, J=2.51 Hz); 11.6 (s, 2H); **LC-MS_1**: T_R = 1.09 min., [M+H]⁺=148 (40%).

- Chlorure de 2,3,4,5-tétrahydro-1,5-benzoxazépin-5-ium **49**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₉ H ₁₂ ClNO	185,66

Rendement: 42%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 2.24 (q, 2H, J=5.39 Hz); 3.39 (t, 2H, J=5.58 Hz); 4.16 (t, 2H, J=4.95 Hz); 7.20-7.27 (m, 2H); 7.40 (td, 1H, J=7.73 Hz, J=1.59 Hz); 7.73 (dd, 1H, J=8.40 Hz, J=1.76 Hz); , 10.8 (s, 2H); **LC-MS_1**: T_R = 0.97 min., [M+H]⁺=150 (20%).

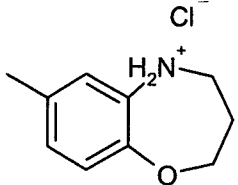
- Chlorure de 7-chloro-2,3,4,5-tétrahydro-1,5-benzothiazépin-5-ium **50**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ NS	236,16

Rendement: 52%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 2.05 (m, 2H); 2.90 (t, 2H, J=5.72 Hz); 3.29 (t, 2H, J=5.46 Hz); 6.96 (dd, 1H, J=8.28 Hz, J=2.06 Hz); 7.30 (m, 2H); **LC-MS_1**: T_R = 2.43 min., [M+H]⁺=200 (50%).

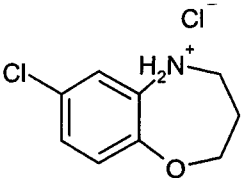


- Chlorure de 7-méthyl-2,3,4,5-tétrahydro-1,5-benzoxazépin-5-ium **51**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₀ H ₁₄ ClNO	199,68

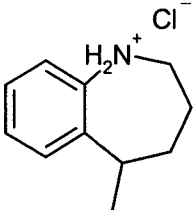
Rendement: 85%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 2.16 (m, 2H); 2.25 (s, 3H); 3.29 (t, 2H, J=5.54 Hz); 4.04 (t, 2H, J=5.00 Hz); 7.04 (d, 1H, J=8.1 Hz); 7.14 (dd, 1H, J=8.01 Hz, J=1.90 Hz); 7.51 (sd, 1H, J=1.90 Hz); **LC-MS₁**: T_R = 1.22 min., [M+H]⁺=164 (25%).

- Chlorure de 7-chloro-2,3,4,5-tétrahydro-1,5-benzoxazépin-5-ium **52**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ NO	220,10

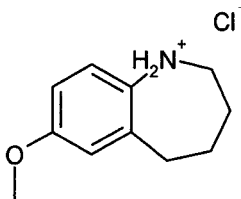
Rendement: 44%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 2.00 (q, 2H, J=5.64 Hz); 3.20 (t, 2H, J=5.64 Hz); 4.02 (t, 2H, J=5.20 Hz); 6.98 (m, 2H); 7.33 (s, 1H); **LC-MS₁**: T_R = 2.02 min., [M+H]⁺=184 (20%).

- Chlorure de 5-méthyl-2,3,4,5-tétrahydro-1H-1-benzazépinium **53**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₁ H ₁₆ ClN	197,71

Rendement: 54%; **RMN ^1H** (300 MHz, d_6 DMSO) δ : 1.30 (m, 4H); 1.84 (m, 2H); 2.13 (m, 1H); 2.87 (m, 1H); 3.44 (m, 2H); 7.29-7.44 (m, 3H); 7.67 (dd, 1H, $J=7.2$ Hz, $J=0.9$ Hz); **LC-MS_1:** $T_R = 1.32$ min., $[\text{M}+\text{H}]^+ = 162$ (50%).

- Chlorure de 7-méthoxy-2,3,4,5-tétrahydro-1*H*-1-benzazépinium **54**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{ClNO}$	213,71

Rendement: 70%; **RMN ^1H** (300 MHz, d_6 DMSO) δ : 1.62 (m, 2H), 2.00 (m, 2H), 2.91 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 6.75 (dd, 1H, $J=8.7$ Hz, $J=2.8$ Hz), 6.80 (sd, 1H, $J=2.8$ Hz), 7.53 (d, 1H, $J=8.7$ Hz); **LC-MS_1:** $T_R = 1.28$ min., $[\text{M}+\text{H}]^+ = 178$ (80%).

Réaction d'acylation:

Procédure DCC :

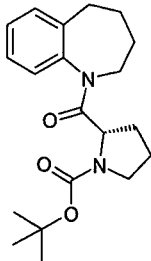
Une solution de Boc-L-Pro-OH (7.749 g, 4 éq.) et de DCC (3.714 g, 2 éq.) dans 50 mL de DCM est agitée à 4°C pendant 20 min. La DCU formée est filtrée et la phase organique est évaporée. 6 mL de DCM sont alors ajoutés au résidu obtenu pour donner un volume total de 9 mL.

Dans un ballon de 5 mL, le chlorure de benzazépine (1 éq., 1.5 mmoles), la DIEA (406 μL , 1.5 éq.) sont introduits avec 500 μL de DCM. 1.5 mL de la solution préalablement préparée sont alors ajoutés au mélange (2 éq. d'anhydride de Boc-L-Pro-OH) qui est mis sous agitation à température ambiante pendant 48 h. La solution est alors évaporée, le résidu est solubilisé dans 10 mL d'acétate d'éthyle, lavé 2 fois avec 10 mL d'une solution de NaHCO_3 saturée, puis par une solution saturée de chlorure de sodium, lavée 2 fois avec 10 mL d'une solution de KHSO_4 5%, puis par une solution saturée de chlorure de sodium enfin la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et évaporée.

Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne prépaquée (10 g) en utilisant un mélange d'éther de pétrole et d'acétate d'éthyle (85/15, V/V) comme éluant.

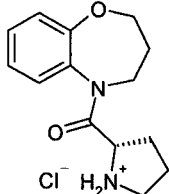
Les composés **56**, **57**, **58**, **59**, **60**, **61**, **62**, **63**, **64**, **65**, **66**, **67**, **68**, **69**, **70**, **71** ont été synthétisés selon le protocole énuméré ci-dessus à partir de Boc-Pro-OH ou Boc-Thz-OH et de l'amine correspondante. L'huile obtenue est solubilisée dans 20 mL d'éther diéthylique et 5 mL d'une solution d'acide chlorhydrique dans le dioxane (4N) sont additionnés. La solution est évaporée et lyophilisée pour donner un solide.

- *tert*-butyl(2*S*)-2-(3,4-dihydro-1,5-benzoxazépin-5(2*H*)-ylcarbonyl)pyrrolidine-1-carboxylate **55**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₉ H ₂₆ N ₂ O ₄	346,43

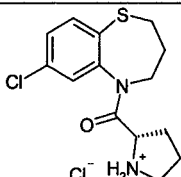
Rendement: 65%; **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.39-1.45 (m, 9H), 1.49-2.32 (m, 4H), 2.5-2.8 (m, 2H), 3.3-3.6 (m, 5H), 4.20-4.80 (m, 2H), 7.10-7.25 (m, 4H); **LC-MS**₁: T_R = 2.53 min., [M+Na]⁺=369 (5%), [M+H-Boc]⁺=247 (100%).

- Chlorure de (2*S*)-2-(3,4-dihydro-1,5-benzoxazépin-5(2*H*)-ylcarbonyl)pyrrolidinium **56**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₄ H ₁₉ ClN ₂ O ₂	282,77

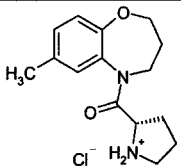
Rendement: 62%; **RMN** ¹H (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.20-1.40 (m, 2H); 1.40-2.00 (m, 4H); 2.80 (m, 1H); 3.00-3.20 (m, 2H); 3.40-3.60 (m, 3H); 4.20-4.65 (m, 3H); 7.09-7.20 (m, 4H); **LC-MS**₂: T_R = 1.95 min., [M+H]⁺ = 247 (100%).

- Chlorure de (2*S*)-2-[(7-chloro-3,4-dihydro-1,5-benzothiazépin-5(2*H*)-yl)carbonyl]pyrrolidinium **57** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{14}H_{18}Cl_2N_2OS$	333,28

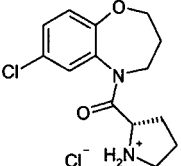
Rendement: 42%; **RMN 1H** (300 MHz, d_6 DMSO) δ : 1.38 (m, 1H); 1.60-2.20 (m, 5H), 2.60-3.60 (m, 5H); 4.23 (s, 1H); 4.52 (sd, 1H, $J=13.75$ Hz); 7.50 (d, 1H, $J=8.44$ Hz); 7.73 (dd, 1H, $J=8.44$ Hz, $J=2.55$ Hz); 7.80 (sd, 1H, $J=2.55$ Hz), 8.75 (s, 1H), 9.80 (s, 1H); **LC-MS₂**: $T_R = 2.62$ min., $[M+H]^+ = 297$ (70%).

- Chlorure de (2*S*)-2-[(7-méthyl-3,4-dihydro-1,5-benzoxazépin-5(2*H*)-yl)carbonyl]pyrrolidinium **58** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{15}H_{21}ClN_2O_2$	296,80

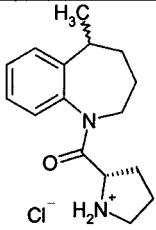
Rendement: 67%; **RMN 1H** (300 MHz, d_6 DMSO) δ : 1.20-1.40 (m, 2H); 1.40-2.00 (m, 4H); 2.30 (s, 3H); 2.80 (t, 1H, $J=11.5$ Hz); 3.00-3.20 (m, 2H); 3.60 (t, 1H, $J=11.25$ Hz); 4.20-4.65 (m, 3H); 7.09 (d, 1H, $J=8.25$ Hz); 7.18 (dd, 1H, $J=8.25$ Hz, $J=2.35$ Hz); 7.31 (sd, 1H, $J=2.35$); **LC-MS₂**: $T_R = 2.09$ min., $[M+H]^+ = 261$ (100%).

- Chlorure de (2*S*)-2-[(7-chloro-3,4-dihydro-1,5-benzoxazépin-5(2*H*)-yl)carbonyl]pyrrolidinium **59** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{14}H_{18}Cl_2N_2O_2$	317,21

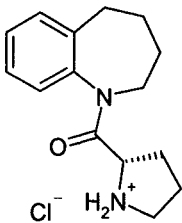
Rendement: 39%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.20-1.40 (m, 2H); 1.40-2.00 (m, 4H); 2.30 (s, 3H); 3.00-3.20 (m, 2H); 3.60 (m, 1H); 4.20-4.65 (m, 3H); 6.92 (d, 1H, J=8.62 Hz); 7.18 (dd, 1H, J=8.62 Hz, J=2.26 Hz); 7.31 (sd, 1H, J=2.26 Hz); **LC-MS₂**: T_R = 2.20 min., [M+H]⁺ = 281 (%).

- Chlorure de (2*S*)-2-[(5-méthyl-2,3,4,5-tétrahydro-1*H*-1-benzazépin-1-yl)carbonyl]pyrrolidinium **60** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₆ H ₂₃ ClN ₂ O	294,82

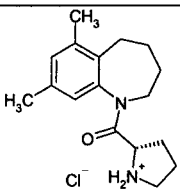
Rendement: 68%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.20-1.40 (m, 4H); 1.60-2.00 (m, 2H); 2.60-2.80 (m, 2H); 3.10-3.80 (m, 5H); 4.05-4.60 (m, 3H); 7.30-7.50 (m, 4H); **LC-MS₂**: T_R = 3.3 et 3.4 min. (isomères), [M+H]⁺ = 259 (100%).

- Chlorure de (2*S*)-2-(2,3,4,5-tétrahydro-1*H*-1-benzazépin-1-ylcarbonyl)pyrrolidinium **61** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₅ H ₂₁ ClN ₂ O	280,80

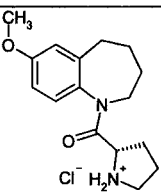
Rendement: 86%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.20-2.00 (m, 6H); 2.50-2.80 (m, 1H); 2.90-3.30 (m, 3H); 3.60-4.51 (m, 7H); 7.10-7.30 (m, 4H); **LC-MS₂**: T_R = 2.25 min., [M+H]⁺ = 245 (100%).

- Chlorure de (2*S*)-2-[(6,8-diméthyl-2,3,4,5-tétrahydro-1*H*-benzazépin-1-yl)carbonyl]pyrrolidinium **62** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₇ H ₂₅ ClN ₂ O	308,85

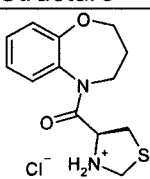
Rendement: 78%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.20-2.00 (m, 6H); 2.21 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.50-2.80 (m, 1H); 2.90-3.30 (m, 3H); 3.60-4.51 (m, 7H); 6.92 (s, 1H); 7.06 (s, 1H); **LC-MS₂**: T_R = 3.06 min., [M+H]⁺ = 273 (100%).

- Chlorure de (2*S*)-2-[(7-méthoxy-2,3,4,5-tétrahydro-1*H*-benzazépin-1-yl)carbonyl]pyrrolidinium **63** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₆ H ₂₃ ClN ₂ O ₂	310,82

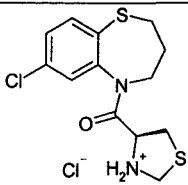
Rendement: 65%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.20-2.00 (m, 6H); 2.50-2.90 (m, 3H); 3.00-3.30 (m, 2H); 3.40-3.90 (m, 7H); 4.20-4.50 (m, 2H); 6.80 (m, 2H); 7.20 (m, 1H); **LC-MS₂**: T_R = 2.52 min., [M+H]⁺ = 275 (100%).

- Chlorure de (4*S*)-4-(3,4-dihydro-1,5-benzoxazépin-5(2*H*)-ylcarbonyl)-1,3-thiazolidin-3-ium **64** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₃ H ₁₇ ClN ₂ O ₂ S	300,81

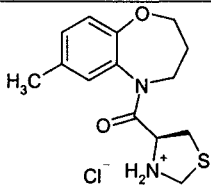
Rendement: 64%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.20-1.40 (m, 1H); 1.40-2.00 (m, 3H); 2.80 (m, 1H); 3.00-3.20 (m, 2H); 3.60 (m, 1H); 4.20-4.65 (m, 3H); 7.09-7.30 (m, 4H); **LC-MS_2:** T_R = 1.75 min., [M+H]⁺ = 265 (100%).

- Chlorure de (4*S*)-4-[(7-chloro-3,4-dihydro-1,5-benzothiazépin-5(2*H*)-yl)carbonyl]-1,3-thiazolidin-3-ium **65** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₃ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ OS ₂	351,32

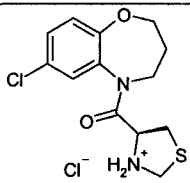
Rendement: 50%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.60-1.80 (m, 2H), 2.60-3.00 (m, 3H), 3.25-3.75 (m, 3H), 4.10-4.50 (m, 3H), 5.2 (s, 2H), 7.47 (dd, 1H, J=8.34 Hz, J=2.24 Hz), 7.66 (d, 1H, J=8.34 Hz), 7.76 (sd, 1H, J=2.24 Hz); **LC-MS_2:** T_R = 3.33 min., [M+H]⁺ = 297 (100%).

- Chlorure de (4*S*)-4-[(7-méthyl-3,4-dihydro-1,5-benzoxazépin-5(2*H*)-yl)carbonyl]-1,3-thiazolidin-3-ium **66** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₄ H ₁₉ ClN ₂ O ₂ S	314,83

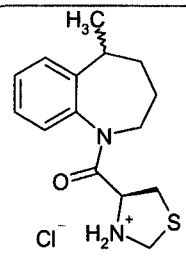
Rendement: 46%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.20-1.40 (m, 1H); 1.40-2.00 (m, 3H); 2.30 (s, 3H); 2.70-2.80 (m, 2H); 3.20-3.80 (m, 4H); 4.20-4.65 (m, 3H); 7.09 (d, 1H, J=8.25 Hz); 7.18 (dd, 1H, J=8.25 Hz, J=2.35 Hz); 7.31 (sd, 1H, J=2.35 Hz); **LC-MS_2:** T_R = 2.23 min., [M+H]⁺ = 279 (100%).

- Chlorure de (4S)-4-[(7-chloro-3,4-dihydro-1,5-benzoxazépin-5(2H)-yl)carbonyl]-1,3-thiazolidin-3-ium **67** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₃ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ O ₂ S	335,25

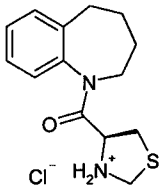
Rendement: 55%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.20-1.40 (m, 1H); 1.40-2.00 (m, 3H); 2.70-2.80 (m, 2H); 3.20-3.80 (m, 4H); 4.20-4.65 (m, 3H); 6.95 (d, 1H, J=8.57 Hz); 7.18 (dd, 1H, J=8.57 Hz, J=2.25 Hz); 7.25 (sd, 1H, J=2.25 Hz); **LC-MS_2**: T_R = 2.26 min., [M+H]⁺ = 299 (100%).

- Chlorure de (4S)-4-[(5-méthyl-2,3,4,5-tétrahydro-1H-1-benzazépin-1-yl)carbonyl]-1,3-thiazolidin-3-ium **68** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₅ H ₂₁ ClN ₂ OS	312,86

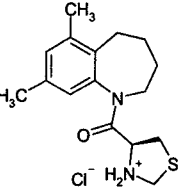
Rendement: 46%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.20-1.40 (m, 4H); 1.60-2.00 (m, 3H); 2.60-2.80 (m, 2H); 3.10-3.80 (m, 5H); 4.05-4.60 (m, 3H); 7.30-7.50 (m, 4H); **LC-MS_2**: T_R = 2.48 et 2.60 min. (diastéréoisomères), [M+H]⁺ = 277 (100%).

- Chlorure de (4S)-4-[(2,3,4,5-tétrahydro-1H-1-benzazépin-1-yl)carbonyl]-1,3-thiazolidin-3-ium **69** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{14}H_{19}ClN_2OS$	298,83

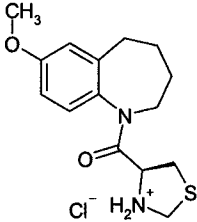
Rendement: 52%; **RMN 1H** (300 MHz, d_6 DMSO) δ : 1.20-1.40 (m, 1H); 1.60-2.00 (m, 3H); 2.60-3.10 (m, 3H); 3.10-3.80 (m, 4H); 4.05-4.60 (m, 4H); 7.30-7.50 (m, 4H); **LC-MS_2:** T_R = 2.32 min., $[M+H]^+$ = 263 (100%).

- Chlorure de (4S)-4-[(6,8-diméthyl-2,3,4,5-tétrahydro-1H-1-benzazépin-1-yl)carbonyl]-1,3-thiazolidin-3-ium **70** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{16}H_{23}ClN_2OS$	386,89

Rendement: 80%; **RMN 1H** (300 MHz, d_6 DMSO) δ : 1.20-1.40 (m, 1H); 1.60-2.00 (m, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.50-2.80 (m, 1H); 2.90-3.30 (m, 3H); 3.35-3.90 (m, 3H); 4.10-4.59 (m, 4H), 6.92 (s, 1H); 7.06 (s, 1H); **LC-MS_2:** T_R = 3.12 min., $[M+H]^+$ = 291 (100%).

- Chlorure de (4S)-4-[(7-méthoxy-2,3,4,5-tétrahydro-1H-1-benzazépin-1-yl)carbonyl]-1,3-thiazolidin-3-ium **71** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{15}H_{21}ClN_2O_2S$	328,86

Rendement: 58%; **RMN ^1H** (300 MHz, d_6 DMSO) δ : 1.20-1.40 (m, 1H); 1.40-2.00 (m, 3H); 2.40-3.00 (m, 4H); 3.78 (s, 3H); 2.90-5.60 (m, 5H), 4.00 (s, 2H); 6.80-7.00 (m, 2H); 7.20-7.40 (m, 1H); **LC-MS_2:** $T_R = 2.6$ min., $[\text{M}+\text{H}]^+ = 293$ (100%).

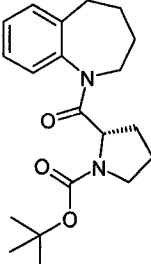
Procédure EDCI :

La carbodiimide soluble (EDCI) (287.55 mg, 1.5 mmoles, 1 équ.) et la Boc-L-Thia-Pro-OH (700 mg, 3 mmoles, 2 équ.) sont solubilisés dans 10 mL de DCM. La DIEA (262 μL , 1.5 mmoles, 1 équ.) est additionnée à la réaction et le milieu est agité à température ambiante pendant 30 min. Le composé **61** (320 mg, 1.5 mmoles, 1 équ.) est ajouté, suivi par 262 μL de DIEA. La réaction est ensuite agitée une nuit à température ambiante. Après 26 h, la phase organique est évaporée, le résidu est placé dans l'acétate d'éthyle, lavé (x2) avec une solution de KHSO_4 à 5%, puis avec une solution saturée de NaHCO_3 (x2), avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchée sur sulfate de magnésium, évaporée pour donner une huile jaune.

Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne prépaquée Isolute (10 g) en utilisant un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle (85/15, V/V) comme éluant.

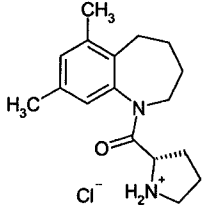
Les composés **73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80** ont été synthétisés selon le protocole énuméré ci-dessus à partir de Boc-Pro-OH ou Boc-Thz-OH et de l'amine correspondante. L'huile obtenue est solubilisée dans 20 mL d'éther diéthylique et 5 mL d'une solution d'acide chlorhydrique dans le dioxane (4N) sont additionnés. La solution est évaporée et lyophilisée pour donner un solide.

- *tert*-butyl(2*S*)-2-(3,4-dihydro-1,5-benzoxazépin-5(2*H*)-ylcarbonyl)pyrrolidine-1-carboxylate **72**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$	346,43

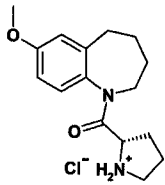
Rendement: 42%; **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.39-1.45 (m, 9H), 1.49-2.32 (m, 4H), 2.5-2.8 (m, 2H), 3.3-3.6 (m, 5H), 4.20-4.80 (m, 2H), 7.10-7.25 (m, 4H); **LC-MS_1:** $T_R = 2.53$ min., $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 369$ (5%), $[\text{M}+\text{H}-\text{Boc}]^+ = 247$ (100%).

- Chlorure de (2*S*)-2-[(6,8-diméthyl-2,3,4,5-tétrahydro-1*H*-1-benzazépin-1-yl)carbonyl]pyrrolidinium **73** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{ClN}_2\text{O}$	308,85

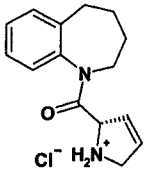
Rendement: 27%; **RMN ^1H** (300 MHz, d_6 DMSO) δ : 1.20-2.00 (m, 6H); 2.21 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.50-2.80 (m, 1H); 2.90-3.30 (m, 3H); 3.60-4.51 (m, 7H); 6.92 (s, 1H); 7.06 (s, 1H); **LC-MS-2:** $T_R = 3.06$ min., $[\text{M}+\text{H}]^+ = 273$ (100%).

- Chlorure de (2*S*)-2-[(7-méthoxy-2,3,4,5-tétrahydro-1*H*-1-benzazépin-1-yl)carbonyl]pyrrolidinium **74**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_2$	310,82

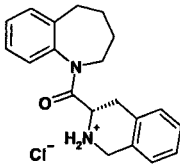
Rendement: 32%; **RMN ^1H** (300 MHz, d_6 DMSO) δ : 1.20-2.00 (m, 6H); 2.50-2.90 (m, 3H); 3.00-3.30 (m, 2H); 3.40-3.90 (m, 7H); 4.20-4.50 (m, 2H); 6.80 (m, 2H); 7.20 (m, 1H); **LC-MS_2:** $T_R = 2.11$ min., $[\text{M}+\text{H}]^+ = 276$ (60%).

- Chlorure de (2*S*)-2-(2,3,4,5-tétrahydro-1*H*-1-benzazépin-1-ylcarbonyl)-2,5-dihydro-1*H*-pyrrolium **75**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₅ H ₁₉ ClN ₂ O	278,78

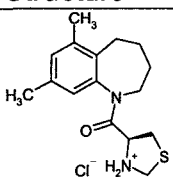
Rendement: 26%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.20-1.40 (m, 1H); 1.50-2.00 (m, 3H); 2.30-3.00 (m, 2H); 3.20-3.50 (m, 1H); 3.80-4.10 (m, 2H); 4.30-4.60 (m, 2H); 4.87 (s, 1H), 5.18 (s, 1H); 5.90 (s, 1H), 6.10 (s, 1H), 7.20-7.40 (m, 3H), 7.55 (m, 1H); **LC-MS_2**: T_R = 2.93 min., [M+H]⁺ = 243 (100%).

- Chlorure de (3*S*)-3-(2,3,4,5-tétrahydro-1*H*-1-benzazépin-1-ylcarbonyl)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinolinium **76**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₀ H ₂₃ ClN ₂ O	342,87

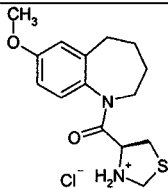
Rendement: 16%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.33 (m, 1H); 1.60-2.00 (m, 3H); 2.30-3.00 (m, 3H); 3.00-3.50 (m, 4H); 4.10-4.70 (m, 3H), 4.59 et 4.64 (m, 1H); 6.90-7.50 (m, 8H); **LC-MS_2**: T_R = 3.46 min., [M+H]⁺ = 307 (100%).

- Chlorure de (4*S*)-4-[(6,8-diméthyl-2,3,4,5-tétrahydro-1*H*-1-benzazépin-1-yl)carbonyl]-1,3-thiazolidin-3-ium **77** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₆ H ₂₃ ClN ₂ OS	386,89

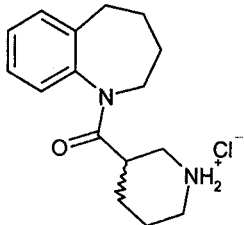
Rendement: 43%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.20-1.40 (m, 1H); 1.60-2.00 (m, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.50-2.80 (m, 1H); 2.90-3.30 (m, 3H); 3.35-3.90 (m, 3H); 4.10-4.59 (m, 4H), 6.92 (s, 1H); 7.06 (s, 1H); **LC-MS_2:** T_R = 3.12 min., [M+H]⁺ = 291 (100%).

- Chlorure de (4S)-4-[(7-méthoxy-2,3,4,5-tétrahydro-1H-1-benzazépin-1-yl)carbonyl]-1,3-thiazolidin-3-ium **78** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₅ H ₂₁ ClN ₂ O ₂ S	328,86

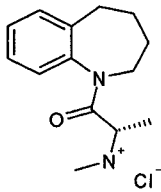
Rendement: 38%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.20-1.40 (m, 1H); 1.40-2.00 (m, 3H); 2.40-3.00 (m, 4H); 3.78 (s, 3H); 2.90-5.60 (m, 5H), 4.00 (s, 2H); 6.80-7.00 (m, 2H); 7.20-7.40 (m, 1H); **LC-MS_2:** T_R = 2.6 min., [M+H]⁺ = 293 (100%).

- Chlorure de 3-(2,3,4,5-tétrahydro-benzazépine-1-carbonyl)-pipéridinium **79** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₆ H ₂₃ ClN ₂ O	294,83

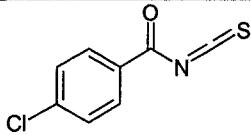
Rendement: 41%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.20-1.40 (m, 3H); 1.50-2.00 (m, 5H); 2.50-3.10 (m, 7H); 3.10-3.40 (m, 3H); 4.51 (m, 1H); 7.20-7.40 (m, 4H); **LC-MS_2:** T_R = 3.82 min., [M+H]⁺ = 259 (100%).

- Chlorure de (2*S*)-*N*-méthyl-1-oxo-1-(2,3,4,5-tétrahydro-1*H*-1-benzazépin-1-yl)propan-2-aminium **80**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₄ H ₂₁ ClN ₂ O	268,79

Rendement: 12%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.20-1.40 (m, 1H), 1.50-2.00 (m, 6H), 2.50-3.00 (m, 5H), 3.70-3.90 (m, 4H), 4.40-4.50 (m, 1H), 7.10-7.30 (m, 4H); **LC-MS_2:** T_R = 2.81 min., [M+H]⁺ = 233 (100%).

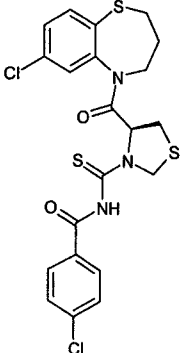
- 4-chlorobenzoyl acylisothiocyanate **81**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₈ H ₄ ClNOS	197,64

Le chlorure de 4-chlorobenzoyl (873 mg, 5 mmoles, 1 éq.) est solubilisé dans 20 mL d'acétone. Le milieu réactionnel est mis sous agitation à température ambiante et NH₄NCS (456 mg, 5 mmoles, 1 éq.) est additionné. Une couleur jaune apparaît au bout de 30 min. La réaction est arrêtée après 1 h d'agitation et l'acétone est évaporée. Le résidu obtenu est solubilisé dans 50 mL d'éther diéthylique et lavé 2 fois avec 25 mL d'eau distillée, puis une fois avec 25 mL d'une solution saturée de chlorure de sodium. La phase étherée est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous vide pour donner un solide pâteux de couleur jaune (694 mg). Le composé synthétisé est utilisé sans purification dans la synthèse du composé **82**.

Rendement: 70%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.55 (d, 2H, J=8.23 Hz), 8.05 (d, 2H, J=8.23 Hz).

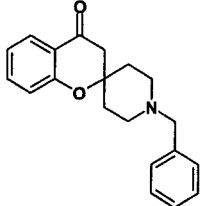
- 4-chloro-*N*-({(4*S*)-4-[(7-chloro-3,4-dihydro-1,5-benzothiazépin-5(2*H*)-yl)carbonyl]-1,3-thiazolidin-3-yl}carbonothioyl)benzamide **82** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₁ H ₁₉ Cl ₂ N ₃ O ₂ S ₃	512,50

Rendement: 52%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.99 –2.22 (m, 2H), 2.50-2.66 (m, 3H), 2.81 (m, 1H), 3.24 (dd, 1H, J=12.1 Hz, J=7.17 Hz), 4.60-4.91 (m, 3H), 5.28 (m, 1H), 7.20 (d, 1H, J=8.3 Hz), 7.4 (m, 2H), 7.54 (d, 1H, J=8.3 Hz), 7.67-7.76 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 8.41 (s, 1H) ; **RMN ¹³C** δ: 28.92, 31.71, 46.70, 46.71, 56.12, 63.25, 128.4, 128.41, 134;

Chapitre 3:

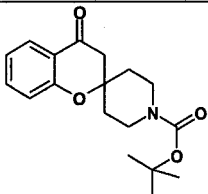
- 1'-benzylspiro[chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one **83**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₀ H ₂₁ NO ₂	307,40

La *N*-Benzyl-4-pipéridone (6.8 g, 36 mmoles, 1.2 éq.) et la 2-hydroxyacétophénone (30 mmoles, 1 éq.) sont solubilisées dans 30 mL de méthanol sous agitation et 1.25 mL de pyrrolidine (15 mmoles, 0.5 éq.) sont alors additionnés. Le milieu réactionnel est chauffé une nuit à reflux (100°C). Le méthanol est évaporé à la pompe à membrane et la pyrrolidine à la pompe à palette. Le résidu est repris dans 200 mL d'une solution de Na₂CO₃ (1M) et extrait avec 3 x 50 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée 2 fois par une solution de Na₂CO₃ (1M), 1 fois à l'eau distillée puis 1 fois avec une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée pour obtenir un solide jaune clair (10.5 g).

Rendement: 95%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.70 (td, 2H, J=12.45 Hz, J= 12.11 Hz, J=4.5 Hz); 2.00 (d, 2H, J=12.45 Hz); 2.45 (td, 2H, J=11.72 Hz, J=2.74 Hz); 2.61 (dt, 2H, J=11.72 Hz, J=2.74 Hz); 2.70 (s, 2H); 3.54 (s, 2H); 6.96 (m, 2H); 7.27-7.30 (m, 5H); 7.48 (td, 1H, J=7.4 Hz, J=1.8 Hz); 7.86 (dd, 1H, J=6.4 Hz, J=1.8 Hz).; **LC-MS_1:** T_R = 1.67 min., [M+H]⁺ = 308 (100%); **P_f** : 99.6-100.9 °C.

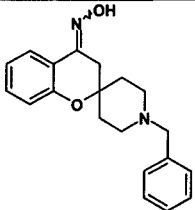
- tert*-butyl 4-oxo-3,4-dihydro-1'*H*-spiro[chromène-2,4'-pipéridine]-1'-carboxylate **84**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₈ H ₂₃ NO ₄	317,39

Le protocole opératoire utilisé pour la synthèse du composé **84** est identique à celui du composé **83**, en utilisant 7.2 g de *N*-Boc-pipéridone.

Rendement: 98%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.4 (s, 9H), 1.55 (td, 2H, J=7.2 Hz, J=1.81 Hz), 1.95 (m, 2H), 2.73 (s, 2H), 3.18 (t, 2H, J=5.26 Hz), 3.85 (s, 2H), 6.9 (t, 2H, J=5.45 Hz), 7.4 (td, 1H, J=7.59 Hz, J=1.75 Hz), 7.75 (dd, 1H, J=8.83 Hz, J=1.83 Hz); **RMN ¹³C** δ: 27, 33, 40, 47, 77, 79, 117, 119.5, 120, 126, 135, 154, 159, 191; **LC-MS_1:** T_R = 3.36 min., [M+H]⁺ = 318 (20%); **P_f:** 82.0-82.6°C.

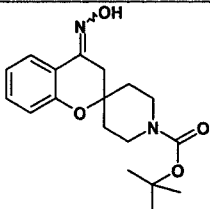
- (4*E*)-1'-benzylspiro[chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one oxime **85**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	322,41

Le composé **83** (8.33 g, 27.1 mmoles, 1 éq.), le chlorhydrate d'hydroxylamine (3.77 g, 54.2 mmoles, 2 éq.), la pyridine 4.38 mL (54.2 mmoles, 2 éq.) sont introduits dans 25 mL d'éthanol à 95°. Le mélange est mis sous agitation et porté à reflux. Après 2 h, le milieu réactionnel est filtré et lavé à l'eau. On obtient après recristallisation dans le méthanol, 5.6 g d'un solide blanc.

Rendement: 64%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.6 (td, 2H, J=13.88 Hz, J=13.05 Hz, J=3.86 Hz), 1.73 (d, 2H, J=13.88 Hz), 2.3 (t, 2H, J=12.36 Hz), 2.5 (m, 2H), 2.75 (s, 2H), 3.45 (s, 2H), 6.85 (m, 2H), 7.2-7.3 (m, 6H), 7.75 (dd, 1H, J=7.85 Hz, J=1.56 Hz); **RMN ¹³C** δ: 32, 35, 40, 49, 63, 75, 119, 122, 124, 128, 129, 130, 132, 146, 155, 164; **LC-MS:** T_R = 1.58 min., [M+H]⁺ = 323 (100%); **P_f:** 229-231 °C.

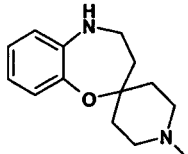
- *tert*-butyl-(4*E*)-4-(hydroxyimino)-3,4-dihydro-1'*H*-spiro[chromène-2,4'-pipéridine]-1'-carboxylate **86**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₄	332,40

Le protocole expérimental utilisé est identique à celui du composé **85**. On obtient une poudre blanche.

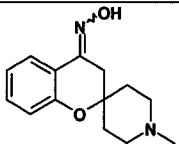
Rendement: 44%; **RMN** ¹H (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.46 (m, 9H); 1.59 (m, 2H); 1.95 (m, 2H); 2.87 (s, 2H); 3.22 (m, 2H); 3.85 (m, 2H); 6.95 (m, 2H); 7.28 (td, 1H, J=6.9 Hz, J=1.6 Hz); 7.77 (dd, 1H, J=7.8 Hz, J=1.6 Hz); 9.53 (m, 1H); **LC-MS_1**: T_R = 2.68 min., [M+H]⁺ = 333 (5%), [M+H-Boc]⁺ = 233 (30%); **P_f**: 149.8-150.0°C.

- 1'-méthyl-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **87**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	232,33

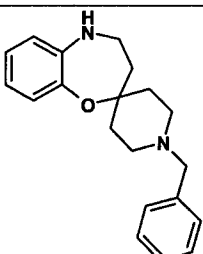
Rendement: 45%; **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.56 (td, 2H, J=12.25 Hz, J=11.80 Hz, J=4.67 Hz), 1.85 (t, 2H, J=3.1 Hz); 1.94 (d, 2H, J=12.25 Hz), 2.25 (s, 3H), 2.37 (td, 2H, J=11.53 Hz, J=11.80 Hz, J=2.71 Hz), 2.5 (d, 2H, J=11.53 Hz), 3.21 (t, 2H, J=3.1 Hz), 3.6 (m, 1H), 6.55 (dd, 1H, J=7.74 Hz, J=1.62 Hz), 6.65 (td, 1H, J=7.74 Hz, J=1.70 Hz), 6.8 (td, 1H, J=7.81 Hz, J=1.62 Hz), 6.9 (dd, 1H, J=7.81 Hz, J=1.54 Hz); **LC-MS_1**: T_R = 0.76 min., [M+H]⁺ = 233 (60%); **P_f**: 100-101.3°C.

- (4*E*)-1'-méthylspiro[chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one oxime **88**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₂	246,31

Rendement: 45%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.95-2.00 (m, 4H), 2.70 (s, 3H), 2.80 (m, 2H), 2.95-3.30 (m, 4H), 6.80-6.90 (m, 2H), 7.15-7.25 (t, 1H, J=6.9 Hz), 7.65 (d, 1H, J=6.4 Hz), 11.5 (s, 1H); **LC-MS_1**: T_R = 1.26 min., [M+H]⁺ = 247 (100%).

- 1'-benzyl-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **89**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O	308,43

Le composé **83**, 3 g (9.3 mmoles, 1 éq.) est introduit dans un bicol de 250 mL. 20 mL de dichlorométhane préalablement séchés sur sulfate de magnésium sont alors ajoutés au solide. Le mélange est alors mis sous agitation à 0°C. Une fois la solution bien refroidie, 54 mL de la solution molaire d'hydrure de diisobutylaluminium (54 mmoles, 5.8 éq.) sont additionnés lentement au milieu réactionnel. La solution est ensuite agitée à 0°C et sous azote pendant 2 h. 9 mL de MeOH sont alors ajoutés lentement à la solution, suivis de 9 mL d'eau distillée et enfin 50 mL d'une solution d'acide sulfurique à 20% tout en maintenant l'agitation qui est ensuite maintenue 20 min. supplémentaires. Le milieu est ajusté alors à un pH 9 en ajoutant 30 mL d'une solution de soude à 30%. La phase organique est alors extraite à l'acétate d'éthyle (2 X 100 mL). La phase organique est évaporée pour donner une huile jaune. La purification est réalisée par chromatographie du résidu obtenu sur alumine basique en utilisant une solution de cyclohexane et d'acétate d'éthyle (1/1, V/V) pour donner 1.5 g d'une huile jaune qui cristallise.

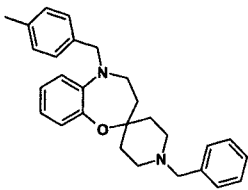
Rendement: 52%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.54 (td, 2H, J=12.60 Hz, J=4.62 Hz); 1.82 (t, 2H, J=5.16 Hz); 1.86 (d, 2H, 12.60 Hz); 2.40 (td, 2H, J=11.41 Hz); 2.51 (d, 2H, J=11.41 Hz); 3.18 (t, 2H, J=5.16 Hz), 3.47 (s, 2H); 6.53 (dd, 1H, J=7.73 Hz, J=1.62 Hz); 6.63 (td, 1H, J=7.55 Hz, J=1.59 Hz); 6.77 (td, 1H, J=7.45 Hz, J=1.52 Hz); 6.87 (dd, 1H, J=7.78 Hz, J=1.55 Hz); 7.15-7.30 (m, 5H); **RMN ¹³C** δ: 34.33, 40.17, 40.94, 48.66, 62.57, 117.71, 119.12, 123.03, 123.77, 126.17, 127.37, 127.38, 128.46, 137.69, 141.83 ; **LC-MS_1:** T_R = 1.36 min., [M+H]⁺ = 309 (100%) ; P_f: 99.0-101°C.

Réaction d'amination réductrice :

L'amine **89** (0.97 mmole, 1 équ.) et l'aldéhyde (1.07 mmoles, 1.1 équ.) sont solubilisés dans 6 mL de dichlorométhane anhydre. Le borohydrure de sodium (412 mg, 1.95 mmoles, 2 équ.) est ajouté par petites fractions et le milieu est mis sous agitation, sous atmosphère d'azote, pendant 1 nuit à température ambiante. 9 mL d'une solution saturée de NaHCO₃ sont additionnés. La phase organique est alors extraite au dichlorométhane, puis lavée une nouvelle fois au carbonate de sodium, puis séchée sur MgSO₄. Après évaporation, le résidu obtenu est purifié sur colonne prépaquée de 10 g, en utilisant un mélange DCM/MeOH (98/2, V/V) .

Ce protocole opératoire est répété pour les composés **91**, **92**, **93**.

- 1'-benzyl-5-(4-méthylbenzyl)-4,5-dihydro-3H-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **90**:

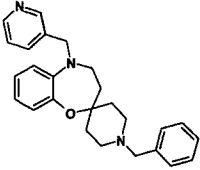
Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₈ H ₃₂ N ₂ O	412,58

Amine (300 mg), 4-méthyl-benzaldéhyde (117 mg).

Rendement: 70%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.6 (td, 2H, J=11.65 Hz, J=12.04 Hz, J=4.71 Hz), 1.8 (t, 2H, J=5.39 Hz), 1.9 (d, 2H, J=12.65 Hz), 2.3 (s, 3H), 2.5 (m, 4H), 3.2 (t,

2H, J=5.39 Hz), 3.5 (s, 2H), 4.3 (s, 2H), 6.63 (td, 1H, J=6.61 Hz, J=1.60 Hz), 6.68 (dd, 1H, J=8.01 Hz, J=1.38 Hz), 6.84 (dd, 1H, J=8.01 Hz), 6.86 (td, 1H, J=6.61 Hz, J=1.60 Hz), 7.06 (d, 2H, J=8.00 Hz), 7.12 (d, 2H, J=8.00 Hz) ; 7.20-7.30 (m, 5H); 22.0, 35.7, 37.8, 46.4, 50.1, 57.6, 63.7, 118.1, 119.7, 124.8, 125.0, 127.5, 127.7, 128.6, 129.6, 129.7 ; **LC-MS_1**: $T_R = 2.24$ min., $[M+H]^+ = 413$ (90%).

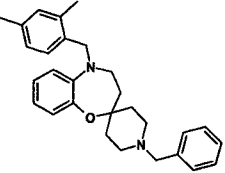
- 1'-benzyl-5-(pyridin-3-ylméthyl)-4,5-dihydro-3H-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **91**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{26}H_{29}N_3O$	399,54

Amine (300 mg), pyridine-3-carboxaldéhyde (92 μ L)

Rendement: %; **RMN 1H** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.64 (td, 2H, J=12.18 Hz, J=4.70 Hz); 1.82 (t, 2H, J=5.36 Hz), 1.98 (d, 2H, J=12.85 Hz), 2.55-2.72 (m, 4H), 3.22 (t, 2H, J=5.36 Hz), 3.62 (s, 2H), 4.38 (s, 2H), 6.7-6.8 (m, 2H), 6.9-7.0 (m, 2H), 7.25-7.35 (m, 6H), 7.65 (d, 1H, 7.85 Hz), 8.53 (m, 2H); **LC-MS_1**: $T_R = 1.44$ min., $[M+H]^+ = 400$ (80%).

- 1'-benzyl-5-(2,4-diméthylbenzyl)-4,5-dihydro-3H-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **92**:

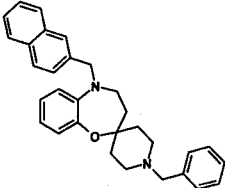
Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{29}H_{34}N_2O$	426,60

Amine (300 mg), 2,4-diméthyl-benzaldéhyde (130 mg). Le produit obtenu est recristallisé dans l'éthanol.

Rendement: 68%; **RMN 1H** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.53 (td, 2H, J=12.25 Hz, J=4.82 Hz); 1.77 (t, 2H, J=5.35 Hz), 1.91 (d, 2H, J=12.25 Hz), 2.18 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.45-2.59 (m, 4H), 3.21 (t, 2H, J=5.35 Hz), 3.5 (s, 2H), 4.21 (s, 2H), 6.67 (d, 1H, J=7.82 Hz), 6.7 (td, 1H,

J=7.61 Hz, J=1.48 Hz), 6.89 (td, 1H, J=7.79 Hz, J=1.47 Hz), 6.93 (dd, 1H, J=7.75 Hz), 6.99 (m, 2H), 7.10 (d, 1H, J=7.64 Hz) ; 7.25-7.35 (m, 5H) ; 17.8, 19.8, 34.1, 36.9, 44.7, 48.5, 54.3, 62.2, 117.9, 119.1, 123.2, 123.5, 125.3, 125.8, 126.2, 127.1, 128.1, 130.2, 132, 135.2, 135.3, 142.8, 143.3, 165.8 ; **LC-MS_1**: $T_R = 2.48$ min., $[M+H]^+ = 427$ (60%).

- 1'-benzyl-10-(1-naphthylméthyl)-4,5-dihydro-3H-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **93**:

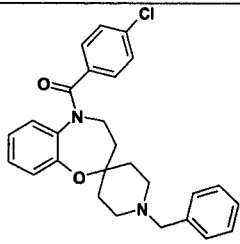
Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{31}H_{32}N_2O$	448,61

Rendement: 70%; **RMN 1H** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.62 (td, 2H, J=12.21 Hz, J=4.88 Hz); 1.85 (t, 2H, J=5.36 Hz), 2.05 (d, 2H, J=12.52 Hz), 2.55-2.72 (m, 4H), 3.30 (t, 2H, J=5.36 Hz), 3.58 (s, 2H), 4.53 (s, 2H), 6.73 (td, 1H, J=7.25 Hz, J=1.45 Hz), 6.82 (dd, 1H, J=8.10 Hz, J=1.45 Hz), 6.9-7.0 (m, 2H), 7.25-7.40 (m, 5H), 7.41-7.50 (m, 3H), 7.73 (s, 1H), 7.75-7.85 (m, 3H); **LC-MS_1**: $T_R = 2.43$ min., $[M+H]^+ = 449$ (100%).

Réaction d'acylation :

L'amine **89** (500 mg, 1.6 mmoles, 1 éq.) est solubilisée dans 5 mL de DCM. La triéthylamine (245 μ L, 1.8 mmoles, 1.1 éq.), suivie du chlorure d'acyle (1.8 mmoles, 1.1 éq.) sont ajoutés au milieu réactionnel qui est ensuite mis sous agitation à température ambiante pendant 4 h. La phase organique est évaporée, le résidu obtenu est solubilisé dans 50 mL d'acétate d'éthyle, lavé à l'eau distillée, puis la phase organique collectée est séchée sur sulfate de magnésium et évaporée. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant comme éluant un mélange DCM/MeOH (99/1, V/V).

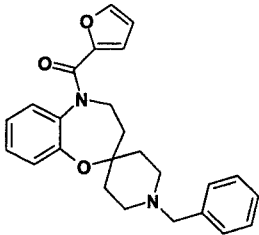
- 1'-benzyl-5-(4-chlorobenzoyl)-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **94**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₇ H ₂₇ ClN ₂ O ₂	446,98

Chlorure de 4-chlorobenzoyle (227 µL)

Rendement: 78%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.6-1.9 (m, 6H), 2.5-2.8 (m, 6H), 3.59 (s, 2H), 6.56 (d, 1H, J=7.61 Hz), 6.76 (td, 1H, J=7.20 Hz, J=1.87 Hz), 7.15-7.23 (m, 6H), 7.25-7.35 (m, 5H); **LC-MS_1**: T_R = 1.82 min., [M+H]⁺ = 448 (100%).

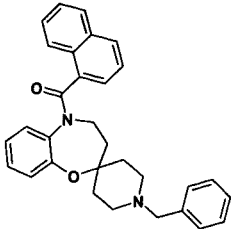
- 1'-benzyl-5-(2-furoyl)-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **95**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₅ H ₂₆ N ₂ O ₃	402,50

Chlorure de 2-furoyle (176 µL)

Rendement: 65%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.6-1.9 (m, 6H), 2.5-2.8 (m, 6H), 3.59 (s, 2H), 5.83 (m, 1H), 6.19 (m, 1H), 6.58 (d, 1H, J=7.61 Hz), 6.99 (m, 2H), 7.16 (d, 1H, J=7.61 Hz), 7.25-7.31 (m, 6H); **LC-MS_1**: T_R = 1.74 min., [M+H]⁺ = 403 (100%).

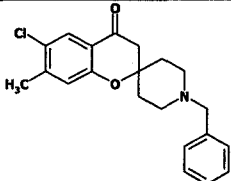
- 1'-benzyl-5-(1-naphtoyl)-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **96**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₃₁ H ₃₀ N ₂ O ₂	462,59

Chlorure de 1-naphtoyle (269 µL)

Rendement: 80%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.6-1.9 (m, 6H), 2.5-2.8 (m, 6H), 3.61 (s, 2H), 6.49-6.52 (m, 2H), 6.83-6.95 (m, 2H), 7.15-7.23 (m, 2H), 7.25-7.35 (m, 5H), 7.42-7.55 (m, 2H), 7.66 (m, 1H), 7.74 (d, 1H, J=8.01 Hz), 8.14 (d, 1H, J=7.55 Hz); **LC-MS_1**: T_R = 2.08 min., [M+H]⁺ = 403 (100%).

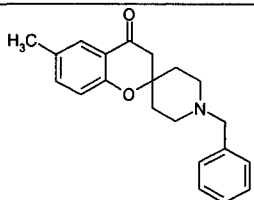
- 1'-benzyl-6-chloro-7-méthylspiro[chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one **97**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₂	355,87

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **83**.

Rendement: 82%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.6 (td, 2H, J=13.85 Hz, J=11.83 Hz, J=4.21 Hz), 1.90 (d, 2H, J=12.77 Hz), 2.30 (s, 3H), 2.35 (td, 2H, J=11.38 Hz, J=5.45 Hz), 2.59 (s, 2H), 2.6 (m, 2H), 3.45 (s, 2H), 6.81 (s, 1H), 7.2-7.3 (m, 5H), 7.72 (s, 1H); **LC-MS_1**: T_R = 1.74 min., [M+H]⁺ = 356 (100%).

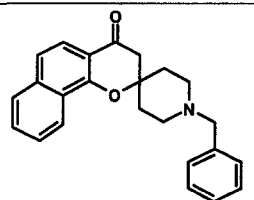
- 1'-benzyl-6-méthylspiro[chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one **98** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₁ H ₂₃ NO ₂	321,42

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **83**.

Rendement: 65%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.6 (td, 2H, J=13.25 Hz, J=11.68 Hz, J=4.5 Hz), 1.94 (d, 2H, J=12.55 Hz), 2.2 (s, 3H), 2.35 (t, 2H, J=11.51), 2.53 (m, 2H), 2.60 (s, 2H), 3.45 (s, 2H), 6.8 (d, 1H, J=8.39 Hz), 7.2-7.3 (m, 5H), 7.7 (d, 1H, J=8.77 Hz), 7.56 (sd, 1H, J=1.55 Hz) ; **LC-MS_1**: T_R = 1.82 min., [M+H]⁺ = 322 (100%) ; P_f : 96.1-97 °C.

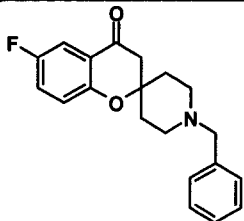
- 1'-benzylspiro[benzo[*h*]chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one **99** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₄ H ₂₃ NO ₂	357,46

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **83**.

Rendement: 95%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.76 (td, 2H, J=13.83 Hz, J=12.68 Hz, J=4.53 Hz), 2.10 (d, 2H, J=13.92 Hz), 2.55 (t, 2H, J=11.61 Hz), 2.65 (m, 2H), 2.73 (s, 2H), 3.52 (s, 2H), 7.2-7.3 (m, 5H), 7.3 (d, 1H, J=8.69 Hz), 7.47 (td, 1H, J=6.94 Hz, J=1.35 Hz), 7.55 (td, 1H, J=6.94 Hz, J=1.35 Hz), 7.71 (d, 1H, J=7.81 Hz), 7.75 (d, 1H, J=8.6 Hz), 8.23 (dd, 1H, J=8.02 Hz, J=2.5 Hz); **LC-MS_1**: T_R = 1.72 min., [M+H]⁺ = 358 (100%).

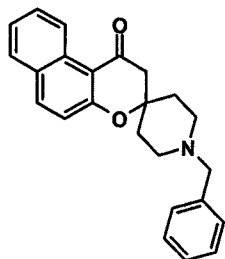
- 1'-benzyl-6-fluorospiro[chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one **100**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₀ H ₂₀ FNO ₂	325,39

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **83**.

Rendement: 38%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.65 (td, 2H, J=13.25 Hz, J=11.50 Hz, J=4.3 Hz), 1.95 (d, 2H, J=12.55 Hz), 2.35 (t, 2H, J=11.51 Hz), 2.53 (m, 2H), 2.62 (s, 2H), 3.46 (s, 2H), 6.88 (dd, 1H, J=9.04 Hz, J=4.24 Hz), 7.13 (m, 1H), 7.2-7.3 (m, 5H), 7.4 (dd, 1H, J=8.8 Hz, J=2.6 Hz); **LC-MS_1**: T_R = 1.68 min. ; [M+H]⁺ = 326 (100%) ; P_f: 88.6-88 °C.

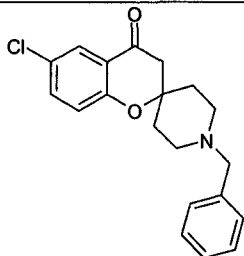
- 1'-benzylspiro[benzo[*f*]chromène-3,4'-pipéridin]-1(2*H*)-one **101** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₄ H ₂₃ NO ₂	357,46

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **83**.

Rendement: 95%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.76 (td, 2H, J=14.6 Hz, J=12.68 Hz, J=4.5 Hz), 2.10 (d, 2H, J=13.92 Hz), 2.30-2.65 (m, 4H), 2.75 (s, 2H), 3.52 (s, 2H), 7-9.4 (m, 11H); **LC-MS_1**: T_R = 1.75 min., [M+H]⁺ = 358 (100%); P_f: 84.6-85.2°C.

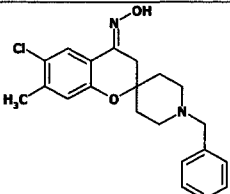
- 1'-benzyl-6-chlorospiro[chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one **102**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₀ H ₂₀ ClNO ₂	341,84

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **83**.

Rendement: 95%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.76 (td, 2H, J=13.25 Hz, J=11.68 Hz, J=4.5 Hz), 2.00 (d, 2H, J=12.45 Hz), 2.44 (td, 2H, J=11.51 Hz, J=2.7 Hz), 2.58 (m, 2H), 2.69 (s, 2H), 3.53 (s, 2H), 6.95 (d, 1H, J=8.39 Hz), 7.2-7.3 (m, 5H), 7.4 (dd, 1H, J=8.74 Hz, J=2.74 Hz), 7.85 (sd, 1H, J=2.74 Hz); **LC-MS_1**: T_R = 1.78 min., [M+H]⁺ = 342 (100%).

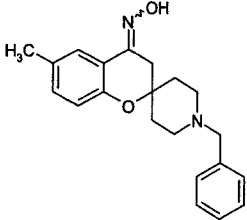
- (4*E*)-1'-benzyl-6-chloro-7-méthylspiro[chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one oxime **103**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₁ H ₂₃ ClN ₂ O ₂	370,88

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **85**, appliqué au composé **97**.

Rendement: 95%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.97 (m, 4H), 2.18 (s, 3H), 2.42 (m, 2H), 2.68 (s, 2H), 3.01 (m, 2H), 3.27 (s, 2H), 6.92 (s, 1H), 7.36 (m, 3H), 7.58 (m, 3H), 11.29 (s, 1H); **LC-MS_1**: T_R = 1.72 min., [M+H]⁺ = 371 (100%).

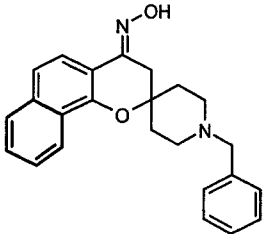
- (4*E*)-1'-benzyl-6-méthylspiro[chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one oxime **104** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₂	336,44

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **85**, appliqué au composé **98**.

Rendement: 95%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.97 (m, 4H), 2.16 (s, 3H), 2.42 (m, 2H), 2.68 (s, 2H), 3.01 (m, 4H), 6.77 (d, 1H, J=8.3 Hz), 7.04 (dd, 1H, J=8.49 Hz, J=1.95 Hz), 7.36 (m, 3H), 7.48 (m, 1H), 7.58 (m, 2H), 11.29 (s, 1H) ; **LC-MS_1**: T_R = 1.71 min., [M+H]⁺ = 337 (100%); **P_f** : 268-269°C.

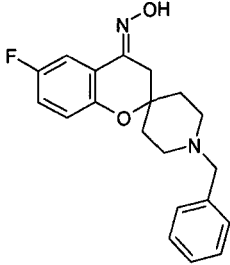
- (4*E*)-1'-benzylspiro[benzo[*h*]chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one oxime **105** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₂	372,47

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **85**, appliqué au composé **99**.

Rendement: %; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 2.15 (m, 4H), 2.89 (s, 2H), 3.15 (m, 2H), 3.29 (m, 2H), 4.37 (m, 2H), 7.20-7.30 (m, 7H), 7.53-7.93 (m, 4H), 11.47 (s, 1H); **LC-MS_1**: T_R = 1.83 min., [M+H]⁺ = 373 (100%) ; **P_f** : 281-283 °C.

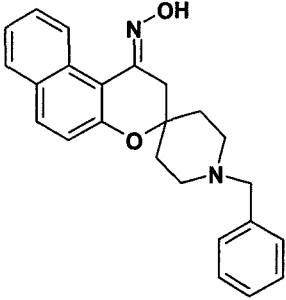
- (4*E*)-1'-benzyl-6-fluorospiro[chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one oxime **106**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O ₂	340,40

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **85**, appliqué au composé **100**.

Rendement: 29%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.7-1.95 (m, 4H), 2.37 (m, 2H), 2.65 (m, 4H), 3.46 (s, 2H), 7.10-7.55 (m, 8H), 9.25 (s, 1H); **LC-MS_1**: T_R = 1.76 min., [M+H]⁺ = 341 (100%); **P_f**: 212.9-213.6°C.

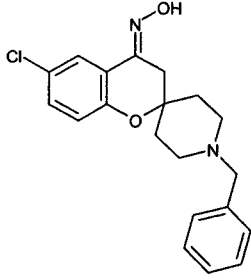
- (4*E*)-1'-benzylspiro[benzo[*f*]chromène-3,4'-pipéridin]-1(2*H*)-one oxime **107** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₂	372,47

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **85**, appliqué au composé **101**.

Rendement: 98%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 2.15 (m, 4H), 3.00 (s, 2H), 3.20-3.29 (m, 4H), 4.37 (m, 2H), 7.00-7.93 (m, 11H), 11.25 (s, 1H); **P_f**: 212.9-213.6°C.

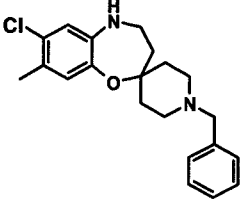
- (4*E*)-1'-benzyl-6-chlorospiro[chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one oxime **108**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{20}H_{21}ClN_2O_2$	356,86

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **85**, appliqué au composé **102**.

Rendement: 76%; **RMN 1H** (300 MHz, d_6 DMSO) δ : 2.00 (m, 4H), 2.75 (s, 2H), 3.1 (s, 4H), 4.3 (s, 2H), 6.75-7.75 (m, 8H), 9.05 (s, 1H); **P_f**: 259.8-260.4°C.

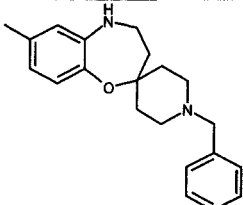
- 1'-benzyl-7-chloro-8-méthyl-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **109**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{21}H_{25}ClN_2O$	356,90

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **89**, appliqué au composé **103**.

Rendement: 45%; **RMN 1H** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.55 (td, 2H, $J=12.85$ Hz, $J=4.23$ Hz); 1.83 (t, 2H, $J=6.16$ Hz); 1.90 (d, 2H, $J=12.25$ Hz); 2.14 (s, 3H), 2.38 (m, 2H), 2.54 (m, 2H); 3.16 (m, 2H), 3.50 (s, 2H); 6.55 (s, 1H); 6.68 (s, 1H); 7.15-7.30 (m, 5H); **LC-MS₁**: $T_R = 1.75$ min., $[M+H]^+ = 357$ (100%); **P_f**: 77.4-79 °C.

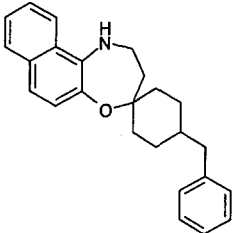
- 1'-benzyl-7-méthyl-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **110**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O	322,45

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **89**, appliqué au composé **104**.

Rendement: 16%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.55 (m, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.9 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.38 (m, 2H), 2.53 (m, 2H), 3.19 (m, 2H), 3.49 (s, 2H), 6.37 (sd, 1H, J=1.68 Hz), 6.45 (dd, 1H, J=8.04 Hz, J=1.68 Hz); 6.74 (d, 1H, J=8.04 Hz), 7.2-7.3 (m, 5H); **LC-MS_1**: T_R = 1.47 min., [M+H]⁺ = 323 (100%); P_f: 64-65.8 °C.

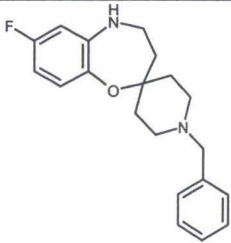
- 4-benzyl-2',3'-dihydro-1'*H*-spiro[cyclohexane-1,4'-naphtho[2,1-*b*][1,4]oxazépine] **111**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O	358,50

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **89**, appliqué au composé **105**.

Rendement: 34%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.5-2.15 (m, 6H), 3.00 (m, 2H), 3.20-3.29 (m, 4H), 4.37 (s, 2H), 7.00-7.93 (m, 11H); **LC-MS_1**: T_R = 2.05 min., [M+H]⁺ = 359 (100%).

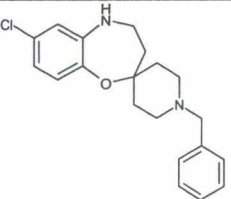
- 1'-benzyl-7-fluoro-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **112**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₀ H ₂₃ FN ₂ O	326,42

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **89**, appliqué au composé **106**.

Rendement: 40%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.7 (m, 6H), 2.35 (t, 2H, J=8.55 Hz), 2.5 (m, 4H), 3.25 (m, 2H), 3.48 (s, 2H), 6.95 (dd, 1H, J=8.64 Hz, J=4.80 Hz), 7.15 (td, 1H, J=8.64 Hz, J=2.88 Hz), 7.2-7.3 (m, 5H), 7.42 (dd, 1H, J=9.6 Hz, J=2.88 Hz), 11.49 (s, 1H); **LC-MS₁**: T_R = 1.64 min., [M+H]⁺=327 (100%).

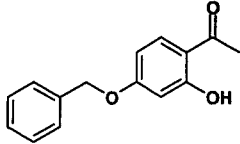
- 1'-benzyl-7-chloro-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **113**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₀ H ₂₃ ClN ₂ O	342,87

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **89**, appliqué au composé **107**.

Rendement: 32%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.54 (td, 2H, J=12.60 Hz, J=4.62 Hz); 1.82 (t, 2H, J=5.16 Hz); 1.86 (d, 2H, J=12.45 Hz); 2.38 (m, 2H), 2.5 (m, 2H); 3.25 (m, 2H), 3.48 (s, 2H); 6.53 (sd, 1H, J=1.73 Hz); 6.57 (dd, 1H, J=7.55 Hz, J=1.59 Hz); 6.87 (d, 1H, J=7.78 Hz); 7.15-7.30 (m, 5H); **LC-MS₁**: T_R = 1.82 min., [M+H]⁺= 343 (100%).

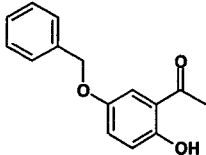
- 1-(4-benzyloxy-2-hydroxy-phényl)-éthanone **114**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	242,28

La 2',4'-dihydroxyacétophénone (10 g, 66 mmoles) est solubilisée dans 50 mL d'acétone préalablement séchée sur sulfate de magnésium. Le carbonate de potassium anhydre (8 g) est ajouté suivi par le bromure de benzyle (9.4 mL, 79 mmoles). La solution est portée à reflux pendant 3 h. Le mélange est refroidi et l'acétone est évaporée sous pression réduite. On ajoute alors 150 mL d'eau distillée, le milieu est acidifié puis extrait par du dichlorométhane, séché sur sulfate de magnésium puis évaporé sous pression réduite pour donner une poudre rose. Le solide obtenu est recristallisé dans un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle (90/10, V/V).

Rendement: 90%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 2.53 (s, 3H); 5.06 (s, 2H); 6.49-6.53 (m, 2H); 7.37 (m, 5H), 7.61 (d, 1H, J=7.8 Hz), 12.74 (s, 1H); **LC-MS_1:** T_R = 2.64 min., [M+H]⁺ = 243 (100%).

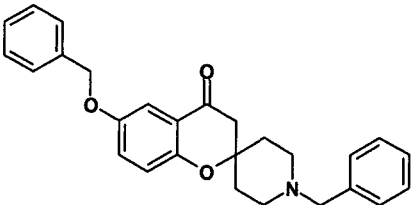
- 1-(5-benzyloxy-2-hydroxy-phényl)-éthanone **115**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	242,28

La 2',5'-dihydroxyacétophénone (10 g, 66 mmoles, 1 éq.) est solubilisée dans 50 mL d'acétone préalablement séchée sur sulfate de magnésium. Le carbonate de potassium anhydre (8 g) est ajouté suivi par le bromure de benzyle (9.4 mL, 79 mmoles, 1.2 éq.). La solution est portée à reflux pendant 3 h. Le mélange est refroidi et l'acétone est évaporée sous pression réduite. On ajoute alors 150 mL d'eau distillée, le milieu est acidifié puis extrait par du dichlorométhane, séché sur sulfate de magnésium puis évaporé sous pression réduite pour donner une poudre rose. Le solide obtenu est recristallisé dans le méthanol.

Rendement: 80%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 2.56 (s, 3H); 5.03 (s, 2H); 6.91 (d, 1H, J=9.04 Hz); 7.16 (dd, 1H, J=3.01 Hz, J= 9.02 Hz); 7.23 (sd, 1H, J=3.01 Hz); 7.30-7.45 (m, 5H); 11.86 (s, 1H) ; **RMN ¹³C** δ: 27.64, 72.01, 116.19, 120.10, 125.92, 128.44, 129.07, 129.56, 137.58, 151.65, 157.79.

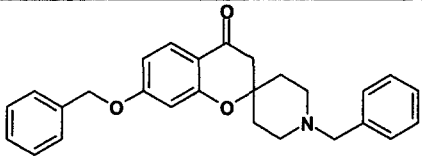
- 1'-benzyl-6-(benzyloxy)-spiro[chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one **116**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₇ H ₂₇ NO ₃	413,52

Le protocole opératoire utilisé est le protocole du composé **83**, à partir de 9.374 g (49.5 mmoles, 1.2 équ.) de *N*-benzyl-4-pipéridone et du composé **115** (10 g, 41.3 mmoles, 1 équ.).

Rendement: 90%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.73 (m, 2H); 2.00 (m, 2H); 2.43 (m, 2H); 2.65 (m, 2H); 2.70 (s, 2H), 3.52 (s, 2H); 5.01 (s, 2H); 6.92 (d, 1H, J=9.0 Hz); 7.16 (dd, 1H, J=9.0 Hz, J=3.2 Hz); 7.25-7.45 (m, 11H); **LC-MS_1**: T_R = 2.02 min., [M+H]⁺ = 414 (100%) ; P_f: 133.6-134.5°C.

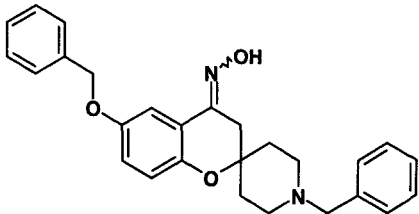
- 1'-benzyl-7-(benzyloxy)-spiro[chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one **117**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₇ H ₂₇ NO ₃	413,52

Le protocole opératoire utilisé est le protocole du composé **83**, à partir de 9.374 g (49.5 mmoles, 1.2 équ.) de *N*-benzyl-4-pipéridone et du composé **114** (10 g, 41.3 mmoles, 1 équ.).

Rendement: 88%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.73 (m, 2H); 2.00 (m, 2H); 2.45 (m, 2H); 2.60-2.70 (m, 4H); 3.45 (s, 2H); 3.54 (s, 2H); 6.52 (sd, 1H, J=2.3 Hz); 6.61 (dd, 1H, J=7.7 Hz, J=2.3 Hz); 7.25-7.45 (m, 10H); 7.80 (s, 1H, J=7.7 Hz); **LC-MS_1**: T_R = 2.04 min., [M+H]⁺ = 414 (100%) ; P_f: 105.2-106.2°C.

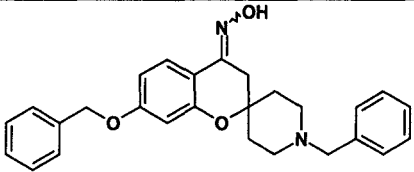
- (4*E*)-1'-benzyl-6-(benzyloxy)-spiro[chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one oxime **118**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₃	428,54

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **85**, appliqué au composé **116**.

Rendement: 95%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.91-2.11 (m, 4H); 2.71 (s, 2H); 3.13 (m, 4H); 3.33 (s, 2H); 4.30 (s, 2H); 5.02 (s, 2H); 6.89 (d, 1H, J=8.97 Hz); 7.00 (dd, 1H, J=2.69 Hz, J=8.97 Hz); 7.26-7.42 (m, 9H); 7.60-7.68 (m, 2H), 11.05 (s, 1H); **LC-MS_1:** T_R = 2.08 min., [M+H]⁺ = 429 (100%) ; **P_f**: 245.3-245.6 °C.

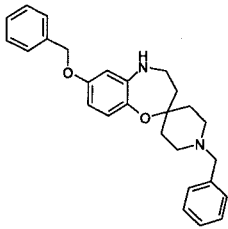
- (4*E*)-1'-benzyl-7-(benzyloxy)-spiro[chromène-2,4'-pipéridin]-4(3*H*)-one oxime **119**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₃	428,54

Le protocole utilisé est identique au protocole du composé **85**, appliqué au composé **117**.

Rendement: 95%; **RMN ¹H** (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 1.87-2.73 (m, 4H); 2.37-2.50 (m, 4H); 2.72 (s, 2H); 3.48 (s, 2H); 5.07 (s, 2H); 6.52 (sd, 1H, J=0.7 Hz); 6.60 (dd, 1H, J=3.0 Hz, J=0.7 Hz); 7.22-7.44 (m, 10H); 7.63 (d, 1H, J=3.0 Hz); 12.05 (s, 1H); **LC-MS_1:** T_R = 2.16 min., [M+H]⁺ = 429 (100%) ; **P_f**: 203-205°C.

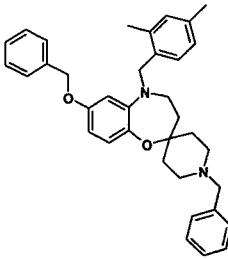
- 1'-benzyl-7-(benzyloxy)-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **120**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₇ H ₃₀ N ₂ O ₂	414,55

Le composé **120** est obtenu en reproduisant le protocole expérimental du composé **89**, à partir du composé **118**.

Rendement: 52%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.73 (m, 2H); 2.00 (m, 2H); 2.48 (m, 2H); 2.60 (m, 2H); 3.27 (m, 4H); 3.52 (s, 2H); 5.01 (s, 2H); 6.23 (sd, 1H, J=2.86 Hz); 6.32 (dd, 1H, J=8.62 Hz, J=2.86 Hz); 6.84 (d, 1H, J=8.62 Hz); 7.25-7.45 (m, 10H) ; **RMN ¹³C** δ: 35.00, 40.83, 40.53, 49.51, 63.38, 70.23, 104.83, 105.13, 124.97, 127.00, 127.52, 127.86, 128.20, 128.53, 128.85, 129.28, 137.29, 137.86, 138.46, 143.28, 155.41; **LC-MS_1:** T_R = 2.00 min., [M+H]⁺ = 415 (100%) ; P_f: 101.0-103°C.

- 1'-benzyl-7-(benzyloxy)-5-(2,4-diméthylbenzyl)-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **121**:

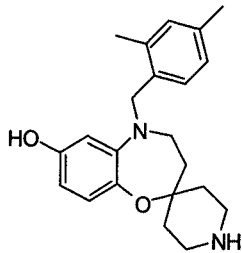
Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₃₆ H ₄₀ N ₂ O ₂	532,73

Dans un ballon préalablement muni d'un barreau aimanté, le composé **120** (800 mg, 1.93 mmoles, 1 éq.) et le 2,4-diméthylbenzaldéhyde (260 mg, 1.93 mmoles, 1 éq.) sont solubilisés dans 5 mL de dichlorométhane préalablement séché sur sulfate de magnésium. Le triacétoxyborohydrure de sodium (824 mg, 3.86 mmoles, 2 éq.) est alors additionné. Le milieu réactionnel est alors agité à température ambiante sous azote pendant une nuit.

Le milieu réactionnel est alors évaporé, le résidu obtenu est solubilisé dans 50 mL d'éther diéthylique puis lavé par une solution saturée de NaHCO₃, par de l'eau distillée et enfin par une solution saturée de chlorure de sodium, la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, évaporée puis lyophilisée. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie avec un mélange DCM/MeOH (98/2) comme éluant pour donner 500 mg d'une huile jaune pâle.

Rendement: 50%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.58 (m, 2H); 1.84 (m, 2H); 1.96 (m, 2H); 2.23 (s, 3H); 2.30 (s, 3H); 2.60 (m, 4H); 3.28 (m, 2H); 3.52 (s, 2H); 4.24 (s, 2H); 4.91 (s, 2H); 6.27 (m, 2H); 6.81 (d, 1H, J=8.02 Hz); 6.95 (m, 2H); 7.08 (d, 1H, J=7.65 Hz); 7.25-7.45 (m, 10H); **RMN ¹³C** δ: 19.04, 21.07, 35.18, 38.32, 49.78, 55.43, 63.42, 70.31, 103.36, 104.82, 124.59, 126.59, 127.11, 127.17, 128.31, 128.59, 129.37, 131.44, 132.93, 136.50, 138.33, 138.63, 144.90, 156.23.; **LC-MS_1:** T_R = 2.88 min., [M+H]⁺ = 534 (100%).

- 5-(2,4-diméthylbenzyl)-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridin]-7-ol **122**:

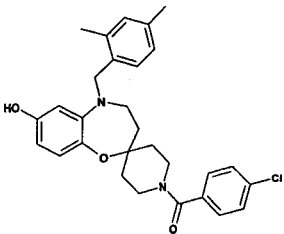
Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂	352,48

Le composé **121** (500 mg, 0.94 mmoles) est solubilisé dans 10 ml d'éthanol puis mis sous agitation. Le palladium sur charbon (10%) (50 mg, 0.1 éq. massique) est alors ajouté à la solution et enfin le milieu réactionnel est placé sous atmosphère de dihydrogène. La réaction est laissée sous agitation une nuit. Le milieu est alors centrifugé et la phase organique récupérée est évaporée sous vide pour donner 300 mg une poudre jaune pâle.

Rendement: 91%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.61 (m, 2H); 1.84 (m, 2H); 1.96 (m, 2H); 2.23 (s, 3H); 2.30 (s, 3H); 2.96 (m, 2H); 3.22 (m, 2H); 3.27 (m, 2H); 4.24 (s, 2H); 4.66 (s, 1H); 6.11 (m, 2H); 6.66 (d, 1H, J=8.52 Hz); 6.95 (m, 2H); 7.08 (d, 1H, J=7.65 Hz); **RMN ¹³C** δ: 18.80, 20.88, 34.45, 38.29, 41.51, 45.37, 55.21, 104.41, 104.95, 124.30,

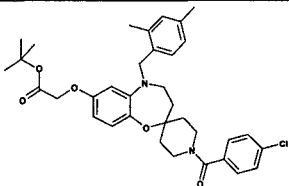
126.44, 126.84, 127.82, 131.30, 132.62, 136.04, 136.40, 138.63, 144.45, 153.54.; **LC-MS_1**: $T_R = 1.84$ min., $[M+H]^+ = 353$ (10%).

- 1'-(4-chlorobenzoyl)-5-(2,4-diméthylbenzyl)-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridin]-7-ol **123**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{29}H_{31}ClN_2O_3$	491,04

Le composé **122** (600 mg, 1.7 mmoles, 1 éq.) est solubilisé dans 20 mL de dichlorométhane. La triéthylamine (262 μ L, 1,9 mmoles, 1.1 éq.) est additionnée, suivie du chlorure de 4-chloro-benzoyl (260 μ L, 1.7 mmoles, 1 éq.). La réaction est alors mise sous agitation à température ambiante pendant 1 h. Le milieu réactionnel est évaporé, le résidu est solubilisé dans 50 mL d'acétate d'éthyle, lavé par une solution de $NaHCO_3$ saturée, puis par une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ puis évaporée pour donner une poudre beige. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant comme éluant un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle (80/20, V/V) pour donner 628 mg d'une poudre blanche. Le composé étant instable à la lumière, il a été utilisé directement dans la synthèse du composé **124**.

- tert*-butyl (1'-benzyl-5-(2,4-diméthylbenzyl)-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridin]-7-yloxy)acétate **124**:

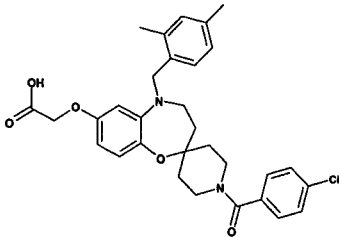
Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$C_{35}H_{41}ClN_2O_5$	605,18

Le composé **123** (200 mg, 0.4 mmole, 1 éq.) est solubilisé dans 3 mL de THF anhydre. La solution est alors placée dans un bain de glace. NaH (16 mg, 0.4 mmole, 1 éq.) est alors ajouté par petites portions et le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30 min. Le

bromoacétate de *tert*-butyle (70.8 μ L, 0.48 mmole, 1.2 eq.) est additionné goutte à goutte et la solution est agitée à température ambiante pendant 2 h. La phase organique est évaporée, le résidu est solubilisé dans 25 mL de dichlorométhane, puis lavée par une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis évaporée. Le résidu est alors lyophilisé pour donner 200 mg d'une poudre blanche.

Rendement: 81%; **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.38 (s, 9H), 1.5 (m, 2H), 1.78 (t, 2H, $J=5.36$ Hz), 1.80 - 1.93 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 3.23 (t, 2H, $J=5.36$ Hz), 3.29 - 3.49 (m, 3H), 4.19 (s, 2H), 4.31 (s, 2H), 4.38 (m, 1H), 6.1 (dd, 1H, $J=8.62$ Hz, $J=2.90$ Hz), 6.26 (sd, 1H, $J=2.90$ Hz), 6.69 (d, 1H, $J=8.62$ Hz), 6.88 (d, 1H, $J=7.64$ Hz), 6.92 (s, 1H), 6.98 (d, 1H, $J=7.64$ Hz), 7.26-7.33 (m, 4H); **RMN ^{13}C** δ : 18.7, 20.7, 26.9, 33.1, 33.9, 37.0, 37.4, 37.5, 42.3, 44.0, 54.2, 64.8, 102.0, 104.1, 122.7, 125.4, 126.1, 127.2, 127.5, 130.2, 193.9; **LC-MS_1**: $T_R = 3.25$ min., $[\text{M}+\text{H}]^+ = 606$ (30%).

- Acide (1'-benzyl-5-(2,4-diméthylbenzyl)-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridin]-7-yloxy)acétique **125**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{ClN}_2\text{O}_5$	549,07

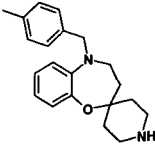
Le composé **124** (67 mg, 0.11 mmole, 1 eq.) est solubilisé dans 5 mL de dichlorométhane. 2 mL d'acide trifluoroacétique sont ajoutés. Le milieu est mis sous agitation à température ambiante pendant 2 h. La solution est alors évaporée sous pression réduite, le résidu est solubilisé dans 25 mL de dichlorométhane, lavée par une solution de KHSO_4 (5%), suivie d'une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , et évaporée. Le résidu obtenu est alors lyophilisé (48 mg).

Rendement: 80%; **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.5 (m, 2H), 1.78 (t, 2H, $J=5.20$ Hz), 1.80 - 1.93 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 3.23 (t, 2H, $J=5.20$ Hz), 3.29 - 3.49 (m, 3H), 4.2 (s, 2H), 4.11 (m, 1H), 4.44 (s, 2H), 6.1 (dd, 1H, $J=8.57$ Hz, $J=2.90$ Hz), 6.25 (sd, 1H, $J=2.90$ Hz), 6.69 (d, 1H, $J=8.57$ Hz), 6.88 (d, 1H, $J=7.39$ Hz), 6.92 (s, 1H), 6.98 (d, 1H,

$J=7.39$ Hz), 7.26-7.33 (m, 4H); **RMN ^{13}C** δ : 18.7, 20.7, 33.1, 33.9, 37.2, 37.4, 37.5, 42.3, 45.2, 55.0, 64.3, 101.9, 104.0, 123.7, 126.2, 126.8, 128.2, 128.5, 131.2, 193.9.

Réaction de débenzylation :

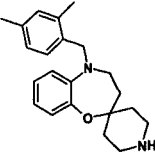
- 5-(4-méthylbenzyl)-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **126**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$	322,45

Le composé **90** (100 mg, 0.24 mmole, 1 éq.) est solubilisé dans 5 mL de méthanol. Le palladium sur charbon (10%) (10 mg, 0.1 éq. massique) est alors additionné et le milieu est mis sous agitation sous atmosphère de dihydrogène pendant 18 h. La solution est alors filtrée sur célite, la célite est lavée avec 50 mL d'éthanol et la phase organique récupérée est évaporée pour donner 69 mg d'une huile incolore.

Rendement: 90%; **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.49 (td, 2H, $J=11.55$ Hz, $J=4.39$ Hz), 1.77 (t, 2H, $J=5.39$ Hz), 1.91 (d, 2H, $J=12.51$ Hz), 2.27 (s, 3H), 2.40 (m, 1H), 2.85 (d, 2H, $J=12.57$ Hz), 3.12 (t, 2H, $J=12.35$ Hz), 3.18 (t, 2H, $J=5.39$ Hz), 4.28 (s, 2H), 6.62-6.72 (m, 2H), 6.82-6.91 (m, 2H), 7.07 (d, 2H, $J=7.92$ Hz), 7.14 (d, 2H, $J=7.92$ Hz); **LC-MS_1**: $T_R = 1.96$ min., $[\text{M}+\text{H}]^+ = 323$ (20%).

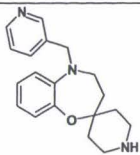
- 5-(2,4-diméthylbenzyl)-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **127**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}$	336,48

Le protocole opératoire appliqué est le même que pour le composé **126**.

Rendement: 85%; **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.88 (t, 2H, $J=5.37$ Hz), 2.0 (d, 2H, 15.0 Hz), 2.14 (d, 2H, $J=15.0$ Hz), 2.25 (s, 3H), 2.31 (s, 3H), 3.23 (t, 2H, $J=5.37$ Hz), 3.38-3.48 (m, 4H), 4.27 (s, 2H), 6.70-6.76 (m, 2H), 6.82 (d, 1H, $J=7.23$ Hz), 6.94-6.98 (m, 2H), 7.00 (s, 1H), 7.08 (d, 1H, $J=7.61$ Hz); **LC-MS_1**: $T_R = 2.23$ min., $[\text{M}+\text{H}]^+ = 337$ (20%).

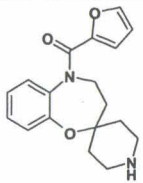
- 5-(pyridin-3-ylméthyl)-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **128**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}$	309,41

Le protocole opératoire appliqué est le même que pour le composé **126**.

Rendement: 90%; **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.49 (td, 2H, $J=13.10$ Hz, $J=4.12$ Hz), 1.76 (t, 2H, $J=5.41$ Hz), 1.90 (d, 2H, $J=12.80$ Hz), 2.6-2.9 (m, 4H), 3.16 (t, 2H, $J=5.41$ Hz), 4.32 (s, 2H), 6.7-6.8 (m, 2H), 6.9-7.0 (m, 2H), 7.19 (s, 1H), 7.59 (d, 1H, $J=7.85$ Hz), 8.4-8.55 (m, 2H); **LC-MS_1**: $T_R = 1.04$ min., $[\text{M}+\text{H}]^+ = 310$ (25%).

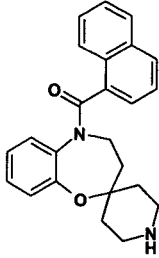
- 5-(2-furoyl)-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **129** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$	312,37

Le protocole opératoire appliqué est le même que pour le composé **126**.

Rendement: 75%; **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.6-1.9 (m, 6H), 2.5-2.8 (m, 6H), 5.83 (m, 1H), 6.19 (m, 1H), 6.58 (d, 1H, $J=7.61$ Hz), 6.99 (m, 2H), 7.16 (d, 1H, $J=7.61$ Hz), 7.25 (m, 1H); **LC-MS_1**: $T_R = 2.65$ min., $[\text{M}+\text{H}]^+ = 313$ (100%).

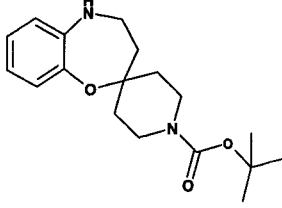
- 5-(1-naphthoyl)-4,5-dihydro-3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine] **130** :

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O	372,47

Le protocole opératoire appliqué est le même que pour le composé **126**.

Rendement: 80%; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.6-1.9 (m, 6H), 2.5-2.8 (m, 6H), 6.49-6.52 (m, 2H), 6.83-6.95 (m, 2H), 7.15-7.23 (m, 2H), 7.42-7.55 (m, 2H), 7.66 (m, 1H), 7.74 (d, 1H, J=8.01 Hz), 8.14 (d, 1H, J=7.55 Hz); **LC-MS_1:** T_R = 2.87 min., [M+H]⁺ = 373 (100%).

- *tert*-butyl-4,5-dihydro-1'*H*,3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine]-1'-carboxylate **131**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₃	318,42

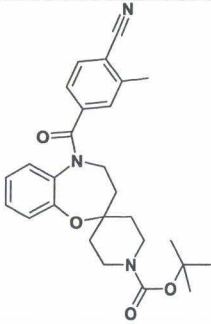
Le composé **89** (10 g, 31 mmoles, 1 éq.) est solubilisé dans 50 mL de méthanol. Le palladium sur charbon (10%) (1 g, 0.1 éq. massique) est alors additionné et le milieu est mis sous agitation sous atmosphère de dihydrogène pendant 18 h. La solution est alors filtrée sur célite, la célite est lavée avec 200 mL d'éthanol et la phase organique récupérée est évaporée pour donner 6.8 g d'une poudre blanche.

L'amine déprotégée (6.8 g, 32 mmoles, 1 éq.) est solubilisée, en présence de triéthylamine (8.9 mL, 2 éq.), dans 50 mL de dichlorométhane, 50 mL de dioxane et 10 mL d'acétonitrile. Boc₂O (6.97 g, 32 mmoles, 1.05 éq.) solubilisé dans 30 mL de dichlorométhane est ajouté goutte à goutte pendant 1 h et la solution est agitée 1 h supplémentaire à température ambiante. La solution est évaporée, le résidu est solubilisé dans 100 mL de dichlorométhane, lavé par 3 x 50 mL d'une solution basique de NaHCO₃ (10%), puis par une solution saturée

de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , puis évaporée pour donner une huile incolore. Celle-ci est purifiée par chromatographie sur gel de silice en utilisant un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle (80/20, V/V) pour donner 6.7 g d'une poudre beige.

Rendement: 66%; **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.41-1.48 (m, 11H); 1.88-2.00 (m, 4H); 3.15-3.31 (m, 4H); 3.70 (s, 1H); 3.81-3.95 (m, 2H); 6.62 (dd, 1H, $J=7.67$ Hz, $J=1.49$ Hz); 6.71(td, 1H, $J=7.40$ Hz, $J=1.73$ Hz); 6.86 (td, 1H, $J=7.40$ Hz, $J=1.73$ Hz); 6.92 (dd, 1H, $J=7.92$ Hz, $J=1.49$ Hz); **LC-MS_2**: $T_R = 7.08$ min., $[\text{M}+\text{H}]^+ = 319.1$ (20%).

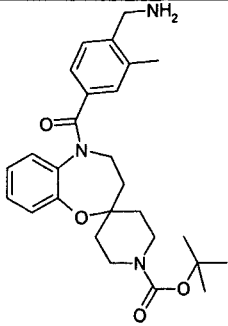
- 1'-*tert*-butyloxycarbonyl 4-(3,4-dihydro-5*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridin]-5-ylcarbonyl)-2-méthyl benzonitrile **132**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4$	461,57

L'acide 4-Cyano-3-méthyl-benzoïque (2 g, 1.24 mmoles, 1 éq.) est placé dans 50 mL de toluène et le chlorure de thionyle est additionné goutte à goutte (4.35 mL, 4.96 mmoles, 4 éq.). La réaction est placée sous reflux pendant 2 h. Après refroidissement, la phase organique est évaporée sous pression réduite pour donner une poudre marron. Le résidu est solubilisé dans 25 mL de DCM et cette solution est ajoutée à une solution de *tert*-4,5-dihydro-1*H*,3*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridine]-1'-carboxylate **131** (3.6 g, 1.28 mmoles, 1 éq.) et de triéthylamine (6.2 mL) dans 25 mL de DCM. La réaction est agitée à température ambiante pendant 16 h. La solution organique est lavée avec une solution saturée de NaHCO_3 , puis avec une solution saturée de chlorure de sodium et enfin séchée sur sulfate de magnésium pour être évaporée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle (80/20, V/V à 50/50) pour donner 3.6 g d'une poudre blanche.

Rendement: 69%; **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.46 (s, 9H); 1.50-2.10 (m, 6H); 2.40 (s, 3H); 3.30 (m, 4H); 3.83 (m, 2H); 6.54 (d, 1H, $J=7.17$); 6.70 (t, 1H, $J=7.17$); 6.85 (d, 1H, $J=7.17$); 6.90-7.10 (m, 4H); **LC-MS_2**: $T_R = 7.95$ min., $[\text{M}+\text{H}]^+ = 461.4$ (100%).

- [4-(1'-*tert*-butyloxycarbonyl-3,4-dihydro-5*H*-spiro[1,5-benzoxazépine-2,4'-pipéridin]-5-ylcarbonyl-2-méthyl)benzyl]amine **133**:

Structure	Formule brute	Masse moléculaire
	$\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_4$	465,60

Au composé **132** solubilisé dans 40 mL de MeOH est additionné le chlorure de cobalt (3.620 g, 15.2 mmoles, 2 éq.). Le mélange est mis sous agitation pendant 10 min. à température ambiante puis est refroidi jusque 0°C . Le borohydrure de sodium (2.875 g, 152 mmoles, 10 éq.) est alors additionné par petites portions et le mélange est agité 30 min. supplémentaires à température ambiante. La solution est évaporée, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant un mélange DCM/MeOH/ NH_3 (90/10/0.1, V/V/V) pour donner 2.7 g d'une poudre blanche.

Rendement: 77%; **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.41 (s, 9H); 1.50-2.00 (m, 6H); 2.11 (s, 3H); 3.30 (m, 3H); 3.69 (m, 2H); 3.83 (m, 2H); 4.52 (m, 1H); 6.58 (d, 1H, $J=7.82$ Hz); 6.78 (td, 1H, $J=7.82$ Hz); 6.98 (d, 1H, $J=7.81$ Hz); 7.06 (dd, 1H, $J=7.82$ Hz, $J=1.46$ Hz); 7.14 (td, 1H, $J=7.82$ Hz, $J=1.46$ Hz); 7.24 (s, 1H); 7.33 (d, 1H, $J=7.81$ Hz); **LC-MS_2**: $T_R = 4.27$ min., $[\text{M}+\text{H}]^+ = 466.4$ (40%).

