

Elève ELEVE

**Maître de stage : Mr Didier BOBIN
Tuteur de stage : Mme Isabelle TERIE**

**Ecole Nationale de Chimie Physique Biologie
PARIS XIIIème**

NOUVELLE APPROCHE D'UN SCAFFOLD ANTI-CANCEREUX



Stage de première année de BTS réalisé chez Sanofi-Aventis (site de Vitry-Alfortville)

Service Chimie médicinale/ Oncologie de Mr Serge Mignani

Juin-Août 2008



Table des matières

REMERCIEMENTS	2
ABREVIATIONS	3
I) INTRODUCTION	4
1. PRESENTATION GENERALE DE LA SOCIETE	4
a) Contexte mondial	4
b) Présentation du groupe Sanofi-Aventis	4
c) Description du département oncologie	6
2. CONTEXTE DE L'ETUDE	7
a) Mais qu'est-ce qu'un cancer ?	7
b) Evolution de la maladie	7
3. PRESENTATION DE LA CIBLE : LES PROTEASES	8
a) Qu'est-ce qu'une protéase ?	8
b) Mécanisme d'action	9
4. OBJECTIF	10
II) RESULTATS ET DISCUSSION	11
1. CONTEXTE CHIMIQUE : LE COUPLAGE DE SUZUKI	11
a) Principe de la réaction	11
b) Mécanisme	11
c) Le palladium Tétrakis	12
2. SCHEMA REACTIONNEL DU TRAVAIL QUI M'A ETE CONFIE	12
3. ESSAIS REALISES	13
III) PARTIE EXPERIMENTALE	19
1. TECHNIQUES UTILISEES AU LABORATOIRE	19
a) Logiciels	19
b) Synthèse assistée par micro-ondes	19
c) Purification	19
α) Chromatographie sur Couche Mince (CCM)	19
β) Chromatographie sur colonne	20
d) Technique d'analyse – Spectroscopie	20
α) Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	20
β) Spectrométrie de masse	20
2. CONDENSATION	22
3. METALLATION	26
4. BROMATION	28
5. COUPLAGE DE SUZUKI	29
6. CONCLUSION	34
IV) BIBLIOGRAPHIE	35
V) ANNEXES	36

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mr Serge Mignani qui m'a permis de faire mon stage au sein du département Oncologie 1.

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance à Mr Didier Babin qui m'a accueilli au sein du Laboratoire OC et qui m'a beaucoup appris pendant toute la durée du stage.

Je remercie chaleureusement Mme Isabelle Terrié-Vacher pour m'avoir encadré avec gentillesse et patience. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour la compétence et la disponibilité donc elle a fait preuve à mon égard. Je la remercie de son chaleureux accueil et de ses nombreux conseils durant le stage.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur Olivier Bedel, Monsieur Daniel Bézard, Monsieur Thierry Gouyon, Mademoiselle Mélanie Liutkus, Madame Véronique Loyau, Monsieur Patrick Richepin, Monsieur Hassine Sahli et Madame Kahina Vilet qui par leur bonne volonté, sympathie et bonne humeur ont su créer une agréable ambiance de travail.

Enfin, j'associe à ces remerciements l'ensemble du personnel des laboratoires d'analyse et toutes les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de discuter et qui m'ont fait découvrir la vie en entreprise.

Abréviations

AcOEt : Acétate d'éthyle
C.C.M : Chromatographie sur Couche Mince
CH₂Cl₂ : Dichlorométhane
d : doublet
ddd : doublet dédoublé
D₂O : Eau deutérée
DIBAH : Diisobutylaluminiumhydride
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DMSO-d₆ : DMSO deutéré 6X
éq : équivalent
EtOH : Ethanol
HMPA : Hexaméthylphosphoric triamide
HPLC : High Pressure Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide Haute Performance)
HCOONH₄ : formiate d'ammonium
Hz : Hertz
LCMS ou LC/SM : Liquid Chromatography Mass Spectrometry (Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse)
MeCN : Acétonitrile
MeOH : Méthanol
NH₄OH : Hydroxyde d'ammonium
NMP : N-méthyl pyrrolidone
Pds : poids
ppm : parties par millions
q : quadruplet
Rdt : rendement
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
s : singulet
scaffold : (échaffaudage en anglais) Partie centrale d'une molécule détenant la majorité de l'activité biologique
t : triplet
T : température
TA : température ambiante
TEA : Triéthylamine
TFA : Trifluoroacétate
THF : Tétrahydrofurane
WE : Week-end

Introduction

1. Présentation générale de la société

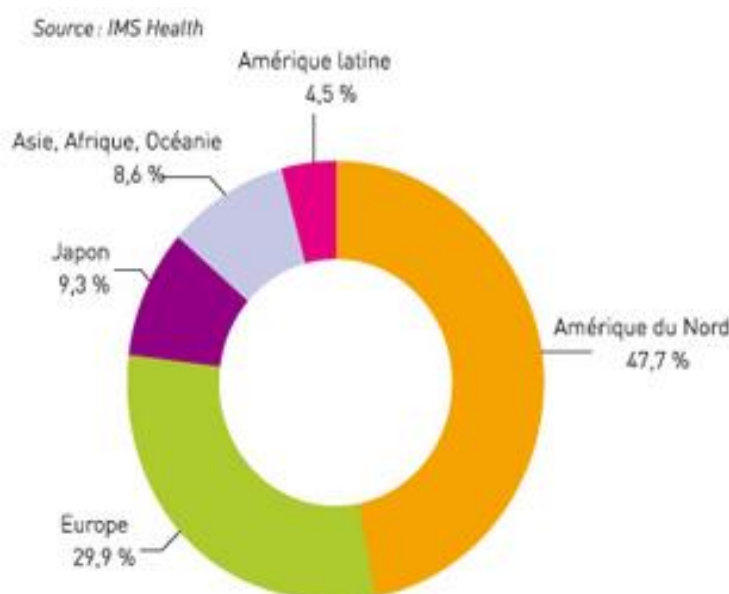
J'ai effectué mon stage de première année au sein du service Chimie Exploratoire Oncologie du centre de recherche de Vitry-Alfortville. Ce département travaille sur la synthèse de nouvelles molécules à propriétés anticancéreuses.

1. a Contexte mondial :

L'industrie mondiale du médicament a connu durant la dernière décennie nombre de rapprochements de grands groupes mondiaux, dans le but de faire face aux coûts toujours croissants de la recherche, mais aussi d'avoir une plus forte présence sur les marchés. Ils ont aussi pour but l'acquisition de nouvelles technologies, l'introduction dans un nouveau domaine thérapeutique, ou même l'implantation dans un pays étranger.

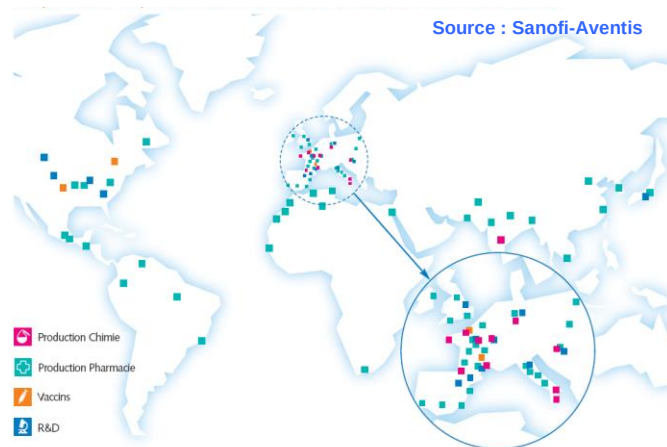
En 2005, le marché du médicament à l'échelle mondiale a été évalué à 643 milliards d'euros. Le marché Nord-Américain reste le plus important avec 48 % du marché mondial devant l'Europe (30%) et le Japon (9%) (source : www.imshealth.com). L'Allemagne et la France représentent les premiers marchés européens.

Le marché mondial du médicament en 2005



1. b Présentation du groupe Sanofi-Aventis :

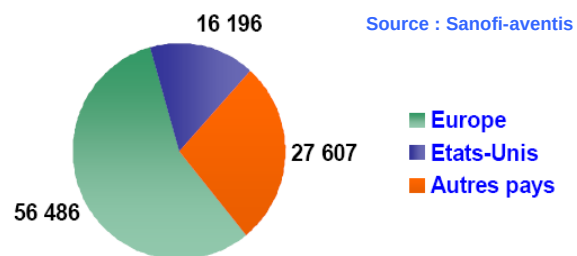
Sanofi-aventis est le premier groupe européen de l'industrie pharmaceutique. Ses activités s'étendent sur divers domaines thérapeutiques, dont les principaux sont : la thrombose, les maladies du système nerveux central, les maladies cardiovasculaires, l'oncologie (les plus gros effectifs sont sur le site de Vitry), la médecine interne et les vaccins.



Implantation de la recherche et de la production du groupe sanofi-aventis dans le monde

Le groupe est présent dans une centaine de pays (France, USA, Hongrie, Japon, Grande-Bretagne...) et compte plus d'une centaine de milliers de collaborateurs à travers le monde, dont près de 19.000 en recherche et développement.

Une grande partie des effectifs est basée en Europe. On compte environs 2500 personnes sur le site de Vitry-Alfortville.



Effectifs du groupe par zones géographiques

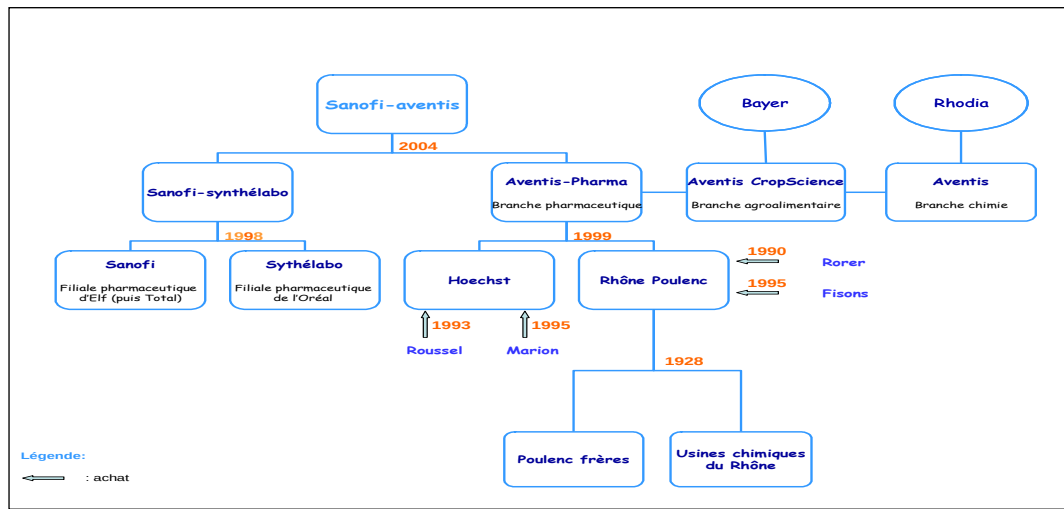
Chiffres-clés (Source Rapport Annuel 2005) :

- 7 domaines thérapeutiques majeurs : cardiovasculaire, thrombose, maladies métaboliques, oncologie, système nerveux central, médecine interne, vaccins
- 1^{er} groupe européen et 3^{ème} mondial de l'industrie pharmaceutique
- Chiffre d'affaires 2007 : 28 Mds €
- Investissements R&D en 2007 : 4,5 Mds €
- 47 produits en phases avancées et 30 nouveaux produits pourraient être soumis d'ici fin 2010
- Près de 97200 collaborateurs dans le monde
- Une présence dans plus de 100 pays

Un petit peu d'histoire :

Sanofi-aventis est né en 2004 de l'union du groupe français Sanofi-Synthélabo et du groupe franco-allemand Aventis. Le premier est issu de la fusion de la filiale pharmaceutique de l'Oréal et de celle de Total. Quant au second, il est né d'une suite de fusions et d'acquisitions au fil des axes de recherche stratégiques (les français Rhône-Poulenc et Roussel, les américains Rorer et Marion, l'allemand Hoechst et le britannique Fisons).

Histoire de la société sanofi-aventis



Le site de Vitry a été au centre de ces évolutions, puisque sur l'emplacement actuel, *Etienne Poulenc* a entrepris en 1908 de bâtir le centre de production (CPV). Ce dernier s'est agrandi au gré de l'évolution des connaissances et des moyens du groupe, et le centre de recherche (CRVA) s'y est ajouté.

A Vitry-Alfortville, les efforts sont aujourd'hui concentrés autour de la lutte contre le cancer et les maladies neurodégénératives.

Site de recherche de Vitry-Sur-Seine

Les stratégies de sanofi-aventis sont articulées autour de six valeurs essentielles : l'audace, la créativité, le courage, le respect, la performance et la solidarité. La priorité est donc donnée à la recherche avec aujourd'hui plus de 125 molécules et vaccins en développement et un chiffre d'affaires estimé en 2006 à 28,4 milliards d'euros.



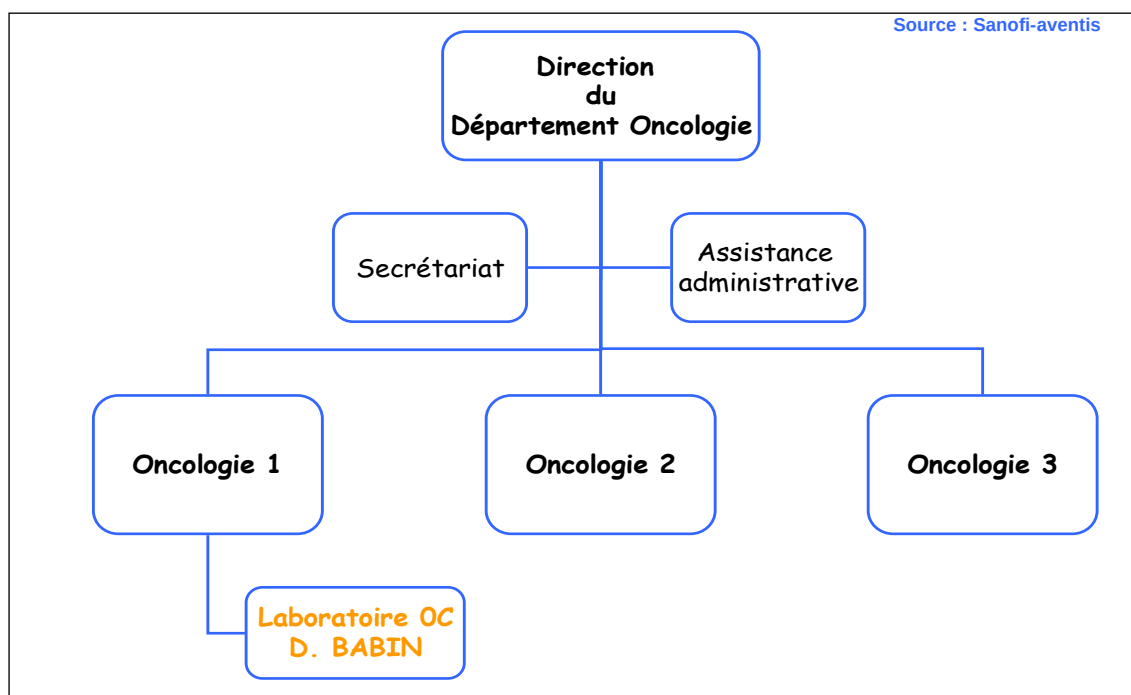
Source : Sanofi-aventis

1. c Description du département oncologie :

Le département est subdivisé en trois services : « oncologie 1 », « oncologie 2 », et « oncologie 3 ». Les équipes sont réparties sur plusieurs laboratoires dans chaque service. Celle de monsieur Babin dépend de « oncologie 1 ».

La direction de ce service est actuellement assurée par monsieur Serge Mignani, et celle du département par monsieur Christoph Lengauer.

Organisation du département Oncologie



2. Contexte de l'étude

2. a *Mais qu'est-ce qu'un cancer ?*

Le cancer, qui touche dix millions de personnes chaque année, constitue un véritable problème de santé publique. Cette pathologie résulte de la multiplication anarchique des cellules touchées qui se caractérisent par :

- une division cellulaire qui ne tient plus compte des signaux de contrôle de l'organisme porteur.
- une perte des relations avec les cellules voisines et un envahissement des tissus adjacents, supporté par une vascularisation propre et la création d'un tissu de soutien de la masse tumorale.
- la création de métastases : cellules tumorales qui migrent et se développent à distance du site initialement atteint.

La difficulté dans le traitement des pathologies rassemblées sous le vocable de « cancer » provient de l'extrême variété des profils de malades et de tumeurs. Ainsi, pratiquement toutes les cellules de l'organisme peuvent être affectées d'un tel dérèglement, et le traitement doit prendre en compte l'état général du malade et le stade de développement de la maladie.

2. b *Evolution de la maladie:*

La maladie comprend en général quatre stades, du développement initial aux métastases :

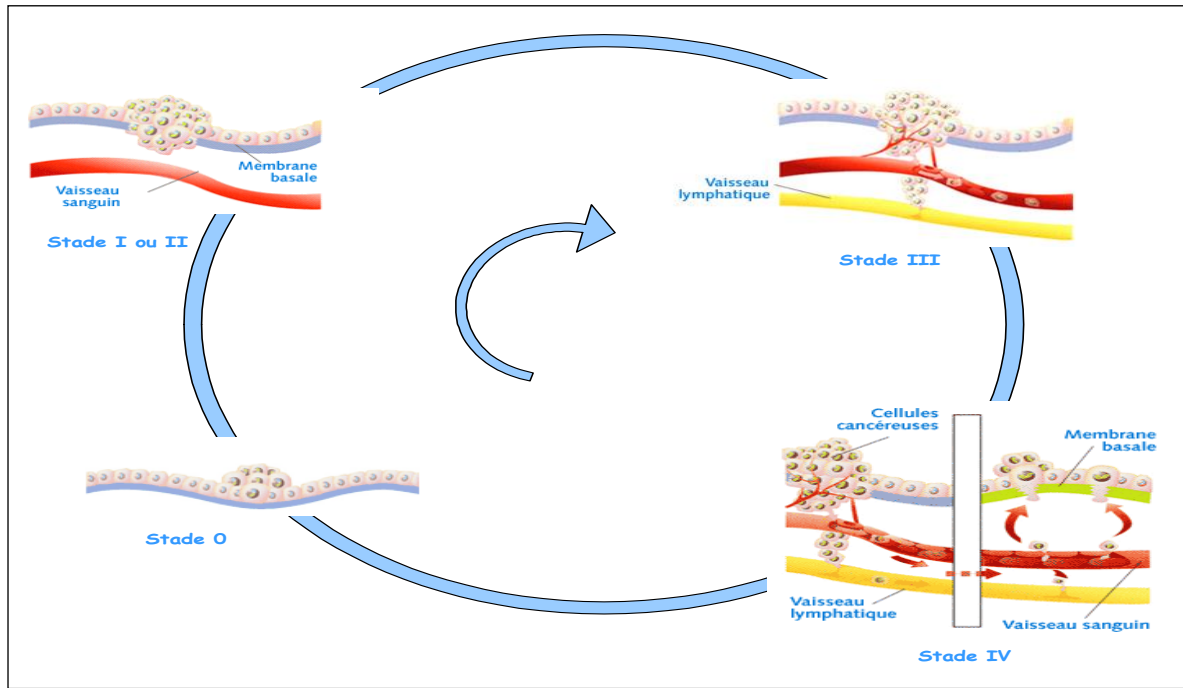
Le cancer in situ (stade 0): Les cellules cancéreuses sont en nombre limité et la tumeur reste localisée.

Le cancer infiltrant (stade I ou II) : La tumeur y est encore localisée mais les cellules cancéreuses tendent à infiltrer les tissus avoisinants.

La maladie localement avancée (stade III) : Les cellules du cancer infiltrant se détachent de la tumeur pour aller se propager par les vaisseaux lymphatiques et sanguins et s'accumuler dans les tissus et ganglions lymphatiques.

Dissémination métastatique (stade IV) : Les cellules cancéreuses ayant essaimé par les voies sanguines et lymphatiques se fixent alors sur d'autres organes et tissus (poumons, cerveau, os...) et y forment des tumeurs secondaires nommées « métastases ».

Stades d'évolution d'un cancer



3. Présentation de la cible : les protéases

3. a *Qu'est ce qu'une protéase ?*

Les protéases (ou peptidases ou enzymes protéolytiques) sont des enzymes qui brisent les liaisons peptidiques des protéines⁽¹⁾. On parle alors de coupure protéolytique ou de protéolyse. Ce processus implique l'utilisation d'une molécule d'eau ce qui les classe parmi les hydrolases.

Les fonctions biologiques des protéases sont variées : elles interviennent dans la maturation des protéines, dans la digestion des aliments, dans la coagulation sanguine, dans le remodelage des tissus au cours du développement de l'organisme et dans la cicatrisation. Certaines protéases sont des toxines, comme la toxine botulique.

Certaines protéases sont produites sous forme de précurseurs inactifs, appelés zymogènes. Ils sont en général activés par une coupure protéolytique qui libère l'enzyme fonctionnelle et déclenche ainsi l'activité. Il existe ainsi des processus de protéolyse en cascade, en particulier dans la coagulation.

3. b *Mécanisme d'action*

Plusieurs mécanismes d'action ont été décrits pour les protéases, ce qui permet de les regrouper en grandes familles mécanistiques, en fonction de la nature du ou des acides aminés du site actif impliqué dans la catalyse. On distingue ainsi :

- Les **protéases à sérine** qui possèdent une triade catalytique caractéristique comprenant une sérine (d'où leur nom), une histidine et un aspartate. Le groupement hydroxyle de la sérine joue le rôle de nucléophile et attaque le carbonyle de la liaison peptidique. Parmi les protéases à sérine, on peut citer :

- la trypsine du pancréas, spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles l'acide aminé engagé par son carboxyle est une lysine ou une arginine.
- la chymotrypsine du pancréas s'attaque à des liaisons peptidiques où le carboxyle engagé est un acide aminé hydrophobe ou aromatique.
- la thrombine qui clive le fibrinogène en fibrine lors de la coagulation sanguine.

- Les **protéases à thiol** qui possèdent une cystéine dans leur site actif. Dans ces protéases, le rôle du nucléophile est joué par le soufre de la cystéine, sous forme de thiolate déprotoné.

Parmi les protéases à thiol, on peut citer :

- la papaïne, protéine végétale. Spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles l'acide aminé engagé par son carboxyle est un acide aminé basique, aromatique ou apolaire.
- les caspases, protéases qui interviennent dans le processus d'apoptose ou mort cellulaire programmée.

- Les **protéases acides** agissent à pH acide et possèdent un acide aspartique sur leur site actif. Par exemple :

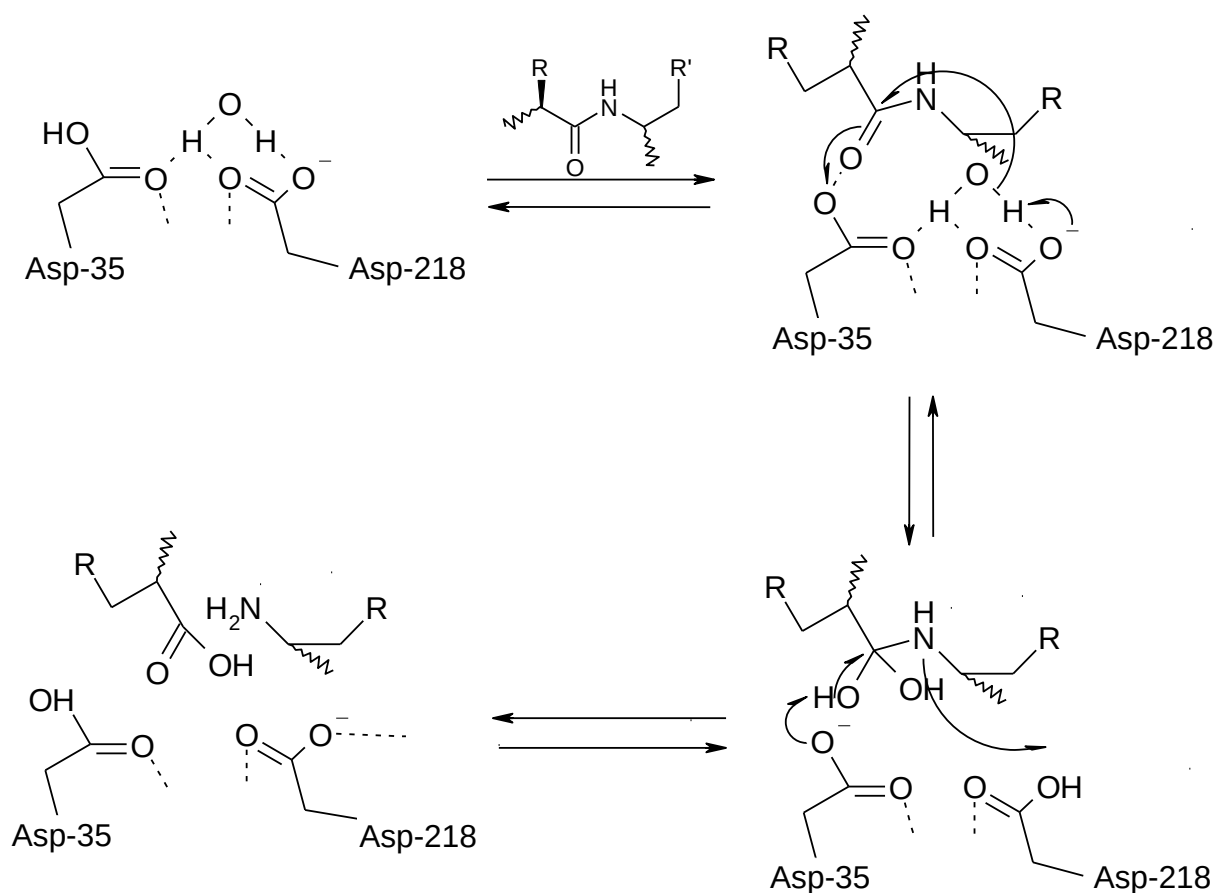
- la pepsine : spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles est engagé un acide aminé aromatique (fonction amine).
- la protéase du VIH-1.

- Les **métalloprotéases** qui possèdent un cation métallique, en général un atome de zinc, fixé fortement à la protéine par les chaînes latérales de plusieurs acides aminés. Le cation métallique intervient directement pour activer une molécule d'eau qui clive la chaîne peptidique. Par exemple :

- la thermolysine
- les protéases de la matrice extracellulaire
- les protéases à thréonine (décrites en 1995)
- les protéases à acide glutamique (décrites en 2004)

Dans les deux première familles de protéases que nous venons de décrire, l'eau intervient après la formation de l'intermédiaire tétraédrique alors que dans les deux dernière familles, l'eau est le nucléophile direct.

Mécanisme catalytique d'une protéase à aspartate



4. Objectif

Mon objectif durant ce stage a été de trouver différentes voies de synthèse pour un inhibiteur de protéase de la famille des protéases acides ou protéases à aspartate.

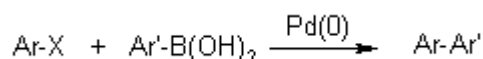
Il a fallu que je montre que les réactions chimiques qui étaient théoriquement possibles pouvaient se réaliser aussi pratiquement tout en essayant de varier les conditions opératoires pour un meilleur rendement final.

Résultats et discussion

1. Contexte chimique : le couplage de Suzuki

Dans la perspective de synthétiser de nouveaux agents antitumoraux, il m'a été demandé de travailler plus particulièrement un couplage de Suzuki⁽²⁾. Cette réaction n'ayant pas encore été abordée en cours, il m'a paru intéressant d'en détailler le principe sachant que cette réaction a déjà été mise en œuvre par une précédente stagiaire³.

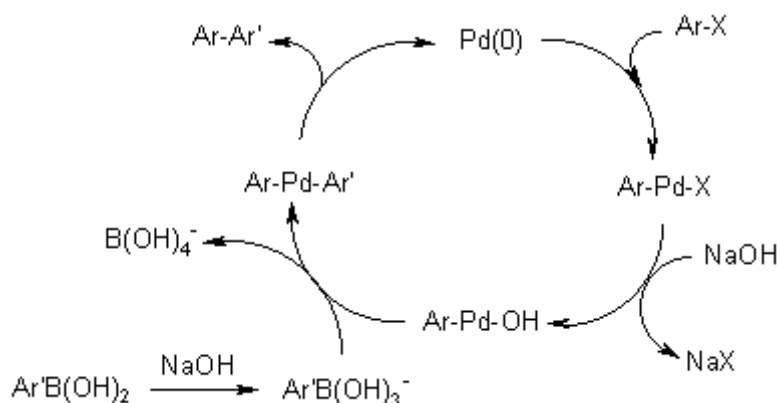
L'équation-bilan de cette réaction est la suivante :



1. a Principe de la réaction

Il s'agit d'un couplage entre un acide arylboronique et un halogénure d'aryle permettant la synthèse d'un biphenyle. La réaction a besoin d'un catalyseur au palladium^(4,5) comportant des ligands phosphines (exemple : le tétrakis(triphénylphosphine) $\text{Pd(PPh}_3)_4$). L'acide arylboronique, quant à lui, est activé par une base.

1. b Mécanisme

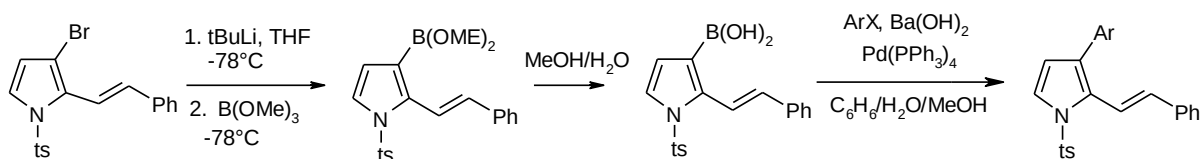


Le complexe de palladium subit tout d'abord une addition oxydante au cours de laquelle le palladium passe du degré d'oxydation 0 au degré d'oxydation 2. L'utilisation d'une base permet ensuite l'activation du boronique, nécessaire à la transmétalement. Enfin, une élimination réductrice régénère l'agent catalytique et libère le biphenyle attendu.

Cette réaction chimique a été publiée pour la première fois en 1979 par Akira Suzuki.

Souvent, cette réaction est surnommée la réaction de Miyaura-Suzuki.

Exemple en synthèse : ⁽⁶⁾



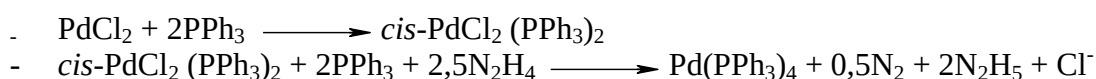
Cependant, de très nombreux dérivés boroniques sont commerciaux.

Le même type de réaction peut être conduit en utilisant l'étain à la place du bore ; c'est la réaction de Stille.

1. c Le palladium Tétrakis

Tétrakis (triphenylphosphine) palladium (0) est le composé chimique abrégé $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, ou même PDP_4 . Il s'agit d'un solide cristallin jaune vif qui devient brun lors de la décomposition dans l'air. Les quatre atomes de phosphore sont dans les coins d'un tétraèdre entourant le palladium (0) qui est au centre du complexe⁽⁷⁾. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ est très souvent utilisé comme catalyseur dans les réactions de couplage⁽⁸⁾.

Ce complexe est établi en deux étapes à partir de Pd (II) :

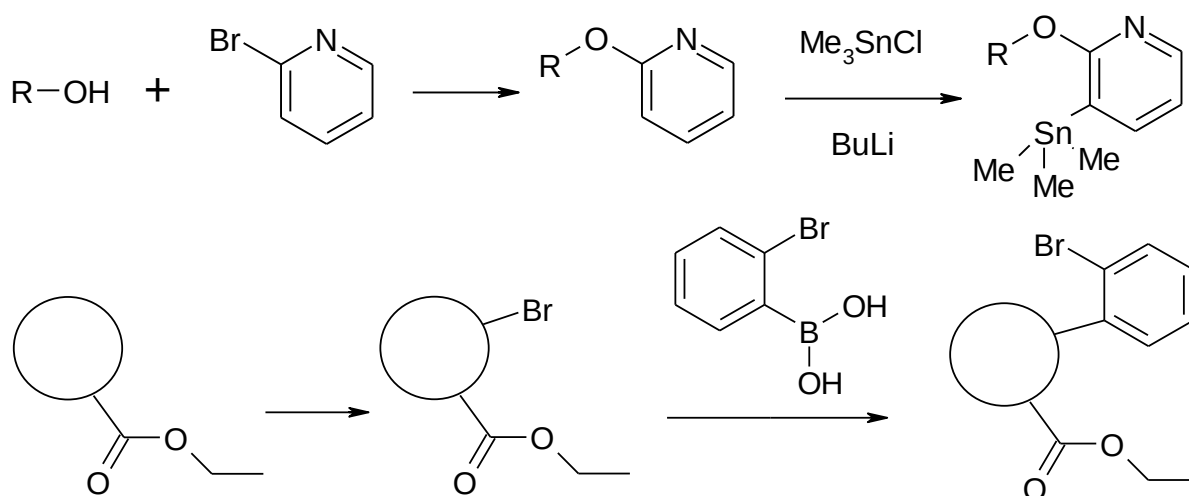


Des réducteurs autres que l'hydrazine peuvent être employés.

Structure du tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) :



2. Schéma réactionnel du travail qui m'a été confié



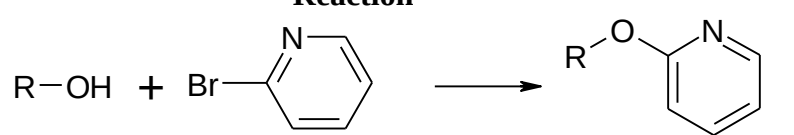
3. Essais réalisés

Les objectifs de ces essais sont les suivants :

- réussir une condensation
- préparer un dérivé de type stannane
- réussir la bromation d'un hétérocycle puis le faire réagir dans une réaction de Suzuki
- ces deux derniers permettent d'accéder à des structures de type Ar-Ar

3. a

Sur cette réaction de condensation, nous avons tenté d'optimiser certains critères pour obtenir un meilleur rendement comme la température de chauffage, la base et le solvant.

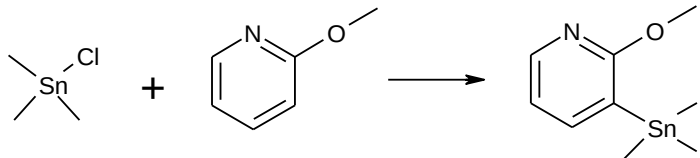
Réaction^(9,10,11) 						
Alcool	2-bromopyridine	Autres produits	Solvant	Chauffage	Rdt Pds	Aspect
1 éq	1,2éq (2-chloropyridine)	K ₂ CO ₃ (5éq)	DMF	2h30 à 60°C ¾ d'heure à 100°C Une nuit à 120°C ½ heure à 140°C	23% 0,4g	Cristaux orangés
1,5éq	1éq	NaOH à 1N (1,2éq)	Acétone	1h à TA Une nuit à 50°C 1h à 100°C	Aucun produit	Solution vert pâle
6éq	1éq	K ₂ CO ₃ (7éq) KI (0,2éq) CuI (0,2éq)	NMP	5h à 150°C	25% 30,1mg	Poudre blanche
5éq	1éq	NaH à 60% dans l'huile KI (0,2éq) CuI (0,2éq)	NMP	½ heure à TA 2h à 150°C	0,7% 13,4mg	Cristaux orangés
1éq	1éq	KOH (1éq) KI (0,2éq) CuI (0,2éq)	Ethanol	24h à 80°C (X2)	Aucun produit	Solution noire
5éq	1éq	CuI (1éq)	TEA	½ heure à 90°C 96h à 80°C	0,9% 6,4mg	Cristaux marron

1éq	1éq	Tert-butoxide de potassium (1,08éq)	HMPA	10min à 210°C (X2)	24% 29,2mg	Poudre blanche
-----	-----	-------------------------------------	------	--------------------	---------------	----------------

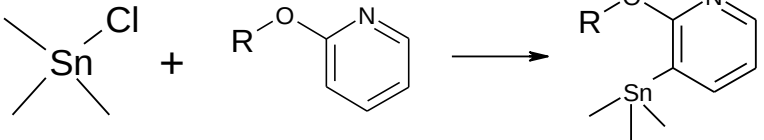
Ces différents essais nous ont permis de voir que la température de chauffage, la force de la base et le pouvoir dissociant du solvant jouaient un rôle important dans cette réaction. On remarque qu'une élévation de la température, une base assez forte et un solvant dissociant nous faisait avoir plus de produit attendu. Ces méthodes seront retenues par la suite.

3.b

Pour l'ortho-méallation, nous avons d'abord voulu faire un test sur une molécule simple pour ensuite faire réagir le produit qui nous intéresse. Cela nous permettait de voir comment réagissait les dérivés d'étain et si les conditions expérimentales sur cette réaction pouvaient être employées sur notre produit. Le problème était de voir si la méallation avait bien lieu en position 3.

Réaction ⁽¹⁴⁾						
						
2-méthoxypyridine	Chlorure de triméthylétain	Autres produits	Solvant	Temps T	Rdt Pds	Aspect
1éq	1,05éq	Tert-butyllithium dans pentane 1,6M (1,3éq)	THF	¾ d'heure à -65°C	36,8% 0,3g	Liquide jaune

Après avoir eu un rendement acceptable sur cette réaction, nous avons décidé de retenir les conditions expérimentales pour faire la méallation sur notre produit.

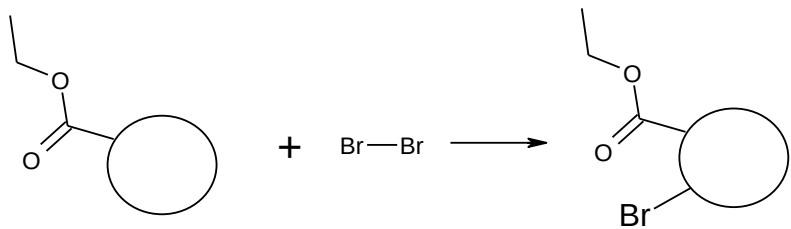
Réaction ^(12,13)						
						
Pyridine	Chlorure de triméthylétain	Autres produits	Solvant	Temps T	Rdt Lc/SM	Aspect
1 éq	1,05éq	Tert-butyllithium dans pentane 1,6M (1,3éq)	THF	¾ d'heure à -65°C ¾ d'heure à 0°C	17% de produit attendu	Liquide incolore

1éq	1,05éq	Phenyllithium (1,3éq)	THF	1h à 0°C	3% de produit attendu	Huile jaune
-----	--------	--------------------------	-----	-------------	-----------------------------	----------------

Parmi ces deux essais, on retiendra le premier car il y a plus de produit attendu. Cela est sûrement dû à la température de réaction et de la nature du lithien. Cependant, le produit n'est pas majoritaire. On note la présence de dérivés d'étain. Les analyses nous ont montré que c'était des dérivés issus du réactif.

3. c

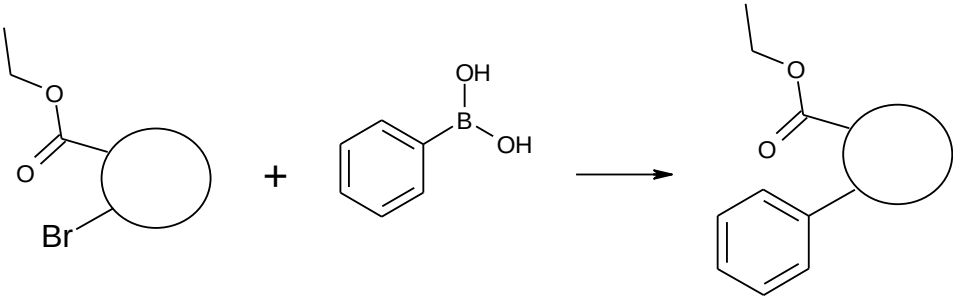
Cette réaction était essentielle pour former le produit qui servira de réactif dans la réaction de Suzuki.

Réaction					
					
Limitant	Dibrome	Solvant	Temps T	Rdt Pds	Aspect
1éq	2éq	Acide acétique	3h à TA	>100% 9,52g	Poudre jaune

Cet essai a très bien marché puisque nous avons obtenu un rendement quantitatif. Ainsi nous avons obtenu suffisamment de produit pour faire plusieurs essais de couplage de Suzuki en faisant réagir cette molécule sur un acide boronique.

3. d

Comme nous l'avons précisé précédemment, ce produit est le réactif essentiel pour tester notre couplage de Suzuki. Nous avons voulu d'abord faire des tests en le faisant réagir sur un acide boronique moins important que celui que nous voulions à la base pour mettre au point des conditions opératoires.

Réaction							
							
Limitant	Boronique	Catalyseur	Base	Solvant	Chauffage	Rdt Pds	Aspect
1éq	1éq	Palladium (triphenylphosphine) Tétrakis (0.01éq)	K ₃ PO ₄ (3éq) dissous dans l'eau	Dioxanne	15min à 110°C 10min à 150°C 10min à 180°C	Aucun produit	Poudre orange
1éq	2éq	Palladium (triphenylphosphine) Tétrakis (0,05éq)	Cs ₂ CO ₃ (3éq) dissous dans l'eau	Dioxanne	10min à 160°C	2% de produit attendu	Poudre jaune
1éq	1,5éq	Palladium (triphenylphosphine) Tétrakis (0,05éq)	Cs ₂ CO ₃ (1,6éq) dissous dans l'eau	Dioxanne	2X 10min à 130°C	Aucun produit	Poudre orange
1éq	1,5éq	Palladium (triphenylphosphine) Tétrakis (0,05éq)	Cs ₂ CO ₃ (1,6éq) dissous dans l'eau	Dioxanne	2X 10min à 140°C	Aucun produit	Huile jaune

Après ces tests, nous en avons déduit que la réaction se faisait mieux en mettant 3éq de carbonate de césium et en chauffant à une température assez élevée (160°C).

Ainsi, nous pouvions réaliser la réaction de couplage avec l'acide boronique qui nous intéressait tout en changeant quand même des paramètres car nous avons obtenu dans la réaction précédente peu de produit attendu. Nous voulions quand même optimiser la réaction.

1éq	1éq	1,1'-bis (diphenylphosphino) Ferrocene palladium Dichloride (0,1éq)	Li ₂ CO ₃ (3éq) dissous dans l'eau	Dioxanne	10min à 160°C	12,6% 74,8mg	Poudre beige
1éq	1éq	[1,2-bis (diphenylphosphino)ethane] dichloropalladium (0,1éq)	Li ₂ CO ₃ (3éq) dissous dans l'eau	Dioxanne	10min à 160°C	Aucun produit	Milieu jaune
1éq	1éq	Bis (acetonitrile) dichloropalladium (0,1éq)	Li ₂ CO ₃ (3éq) dissous dans l'eau	Dioxanne	10 min à 160°C	14% de produit attendu	Milieu noir
1éq	1,5éq	Acétate de palladium (0,1éq) + 2- (di-tert-butylphosphino)biphenyl (0,1éq)	Li ₂ CO ₃ (3éq) dissous dans l'eau	Dioxanne	10 min à 160°C	15% de produit attendu	Milieu noir

Parmi ces essais, nous retiendrons que le palladium Tétrakis et le palladium/férocène sont de bons catalyseurs, que le carbonate de lithium est une bonne base, que le dioxanne est un bon solvant et qu'il faut chauffer en général une seule fois à 160°C pendant 10min.

C'est avec ces paramètres que nous arrivons à obtenir le plus de produit.

On peut aussi ajouter que le couplage de notre Ar-Br est viable via une réaction de Suzuki.

Partie expérimentale

1. Techniques utilisées au laboratoire

1. a Logiciels

Chaque essai (tableau de charge, mode opératoire, résultats d'analyses..) est consigné dans un cahier de laboratoire et dans une application électronique : ARP. Chaque essai est référencé par le numéro de cahier du chimiste et par le numéro de l'essai qui correspond au numéro de page du cahier papier. ARP permet ainsi d'accéder à tous les essais effectués par les chimistes du site.

Le logiciel ISIS DRAW permet le dessin de molécules et de réactions.

1. b Synthèse assistée par micro-ondes

J'ai pu effectuer au cours de mon stage des réactions au four micro-ondes, technique qui a fait son apparition dans les laboratoires de chimie à la fin des années 90.

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques de fréquences comprises entre 0.3 et 1000GHz. Les appareils commerciaux fonctionnent à 2450MHz.

L'intérêt de cette technique réside dans le fait que les micro-ondes vont activer directement les ions et les molécules qui possèdent un moment dipolaire non nul. Le transfert entre les micro-ondes et les molécules étant très rapide (de l'ordre de la nanoseconde) par rapport au temps de relaxation des molécules de réactifs ou de solvant (de l'ordre de 0.1µs), il se crée un état hors-équilibre qui se traduit par une température instantanée des molécules, non mesurable mais beaucoup plus élevée que la température du solvant que l'on mesure.

Certaines réactions chimiques sont ainsi beaucoup plus rapides par chauffage micro-ondes qu'avec un chauffage classique (bain d'huile, plaque chauffage..). C'est le cas de la réaction de couplage de Suzuki que j'ai découverte au cours du stage.

Couplage de Suzuki assisté par micro-ondes

Mode opératoire : Dans un vial Personal Chemistry, on introduit le substrat (1mmol, 1éq), le dérivé boronique (1mmol, 1éq) et K₃PO₄ (1mmol, 1éq) en solution dans 10mL de dioxane dégazé sous argon. On ajoute le catalyseur palladié (0.01mmol, 0.01éq), on scelle le vial. On chauffe au micro-onde jusqu'à disparition du produit de départ (suivi par LC/MS), à une température T (°C).

On ajoute de l'eau au mélange réactionnel puis on extrait à l'acétate d'éthyle. On rassemble les phases organiques que l'on sèche sur MgSO₄ et on amène à sec après filtration.

On purifie le brut sur colonne de silice.

1. c Purification

Les réactifs utilisés sont pour la plupart des produits Acros ou Aldrich. Les solvants ont été achetés chez Carlo Erba - SDS.

α) Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

L'avancement des réactions a été suivi par chromatographie sur couche mince (CCM), sur des plaques Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck), les points étant visualisés sous rayonnement UV à 254 nm.

β) Chromatographie sur colonne

Deux appareils permettent la séparation des composants d'un mélange :

- Chromatographie Flash Biotage Quad 3 : cet appareil utilise des colonnes préparées Biotage ou Merck allant de 2,5g à 100g de silice. La taille des grains de silice est de l'ordre de 15-40µm de diamètre. Il peut faire 12 purifications simultanément grâce à un système lui permettant d'avoir 12 colonnes de 9g. Le solvant est envoyé dans la colonne via un compresseur qui envoie de l'air comprimé. La collecte des fractions se fait automatiquement.
- HPLC préparative: cet appareil est équipé de deux colonnes de silice greffée C18 : l'une de dimensions 100*21mm sur laquelle on peut injecter 50mg de produit et l'autre de dimensions 250*40mm sur laquelle on peut injecter 300mg de produit. On peut travailler en milieu acide (gradient d'élution eau 0.07% TFA/ acétonitrile 0.07% TFA) ou en milieu basique (gradient d'élution eau HCOONH₄ 0.01M NH₄OH pH=9-10 / acétonitrile). L'appareil est piloté par le logiciel Gilson Unipoint 2.0 et la collecte se fait automatiquement lorsque l'absorption UV dépasse un seuil préétabli.

1. d Technique d'analyse - Spectroscopie

α) Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ¹H ont été réalisés sur un spectromètre Brüker Avance DPX300 à une fréquence de 300 MHz, en utilisant comme référence interne le tétraméthylsilane (TMS). Les produits analysés ont été dissous dans du DMSO d₆ (deuté 6X). Les déplacements chimiques δ sont exprimés en parties par million (ppm) et les constantes de couplage J en Hertz.

β) Spectrométrie de masse

Les spectres de masse ont été réalisés sur UPLC/SQD

- Colonne BEH C18 1.7 µm 2.1 x 50 mm
- A=H₂O (0.1% HCO₂H); B=CH₃CN
- Température de colonne: 60 °C
- Gradient: de 5 à 50 % de B en 0.8 min; 100 % de B à 1.2 min, 100 % de B à 1.85 min, retour à 5 % de B à 1.95 min
- Détection: UV-DAD, ELSD, ES + et -

Pour l'UPLC, il est conseillé de filtrer les échantillons

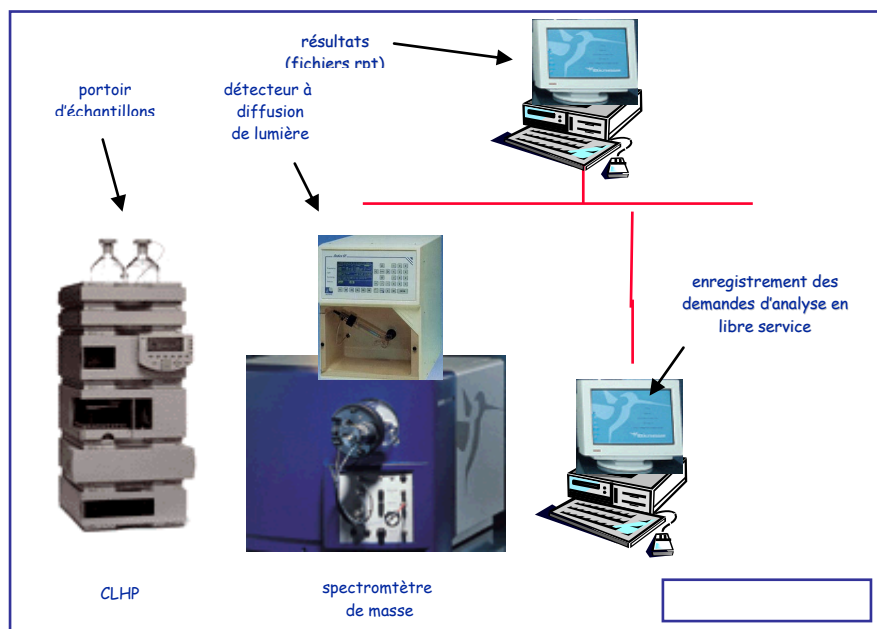
Quatre spectromètres de masse sont disponibles en libre-service pour l'analyse des échantillons par couplage chromatographie liquide – UV – spectrométrie de masse – détecteur à diffusion de lumière (LC/UV/MS/ELS) de façon entièrement automatique.

Cette technique permet, après séparation chromatographique, de suivre les réactions, de confirmer la présence du produit attendu, de déterminer éventuellement la masse moléculaire des autres composés présents, et d'en apprécier les proportions relatives. Elle est donc non seulement utile pour le contrôle qualité des produits issus de la synthèse parallèle, mais également dans le cas des bruts réactionnels, pour la recherche du produit attendu dans différentes fractions, ou encore pour l'optimisation d'une voie de synthèse. L'intérêt de l'UPLC est aussi le temps d'analyse qui n'est que de 2min ce qui est bien pour les réactions au micro-ondes. Techniquement, la seule « contrainte » consiste à dissoudre l'échantillon (MeOH, H₂O, CH₃CN, DMSO; le dichlorométhane est à éviter sauf en cas d'absolue

nécessité) à une concentration très approximative de 10^{-3} molaire, dans un flacon approprié (compatible avec un passeur HP1100 ou Waters).

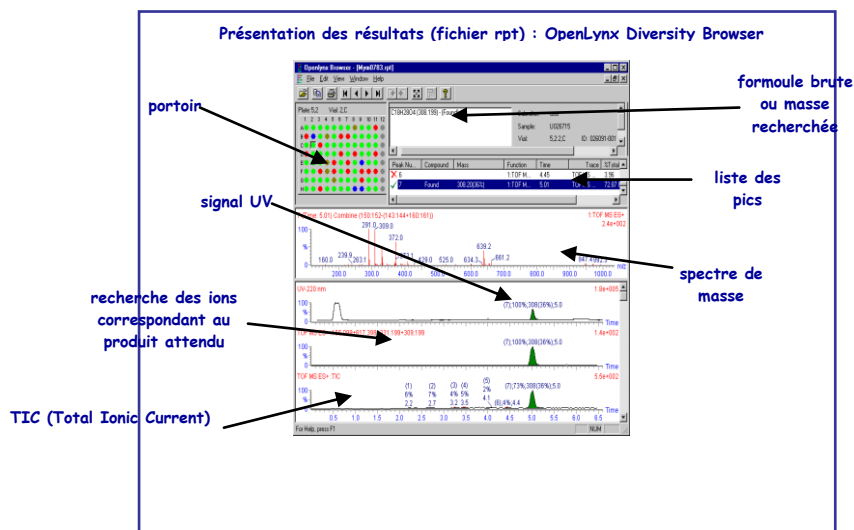
Pratiquement, le chimiste n'a qu'à saisir le numéro de lot et la masse moléculaire du produit attendu, et préciser les conditions opératoires au moment de l'enregistrement de la demande d'analyse; lui est alors signifié où mettre l'échantillon (n° de position sur le portoir).

Les résultats, disponibles sous forme de fichier *.rpt, sont disponibles sur le réseau (chemin d'accès: « crvsacq01/acq/ DIA-LG-CHEM-QCLCMS/LIBRE-SERVICE »).



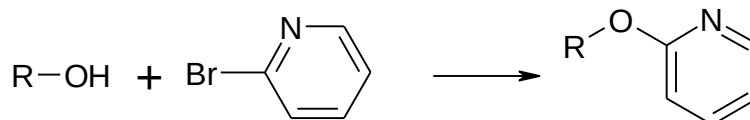
Traitement automatique des données (OpenLynx):

- Intégration des pics pour chaque mode de détection (UV, MS, ELS)
- Reconstitution des spectres correspondants (moyenne des spectres de chaque pic avec soustraction du bruit de fond de part et d'autre)
- Recherche du ou des spectres pouvant correspondre au produit attendu ($[M+H]^+$ ($M+1$), $[M+Na]^+$ ($M+23$), etc...)
- Calcul de l'intensité relative du pic du produit attendu par rapport à tous les autres pics: évaluation de la pureté selon chaque mode de détection.



2. Condensation

Nous avons réalisé plusieurs essais pour tenter de synthétiser une molécule à partir d'un alcool et de la 2-bromopyridine suivant l'équation :



2. a

Nous avons tout d'abord réalisé un essai en prenant la 2-chloropyridine au lieu de la 2-bromopyridine pour voir les différences du point de vue cinétique liées aux halogènes. Le mode opératoire et les résultats sont présents ci-dessous.

Compound ID	Name	Formula	Molweight	Equ.	Mol	Weight	Volume
	ALCOOL			1.000			
A	DMF		0.0				16.000 ml
MFCD0006228	2-CHLOROPYRIDINE d=1,209	C ₅ H ₄ ClN	113.55	1.200	10.700 mmol	1.215 g	1 ml
MFCD00011382	POTASSIUM CARBONATE	CK ₂ O ₃	138.2	5.000	44.600 mmol	6.164 g	

Dans un keller de 50ml muni d'une agitation magnétique, d'une arrivée d'argon, d'une sonde thermométrique et d'un réfrigérant, on introduit:

- Alcool
- 2-chloropyridine
- DMF
- Carbonate de potassium

On agite 1h30 à TA. Le milieu réactionnel est rouge orangé. En LC/SM, pas de produit attendu.

On chauffe à 60°C pendant 2h30.

On chauffe à 100°C pendant ¾ d'heure.

On chauffe à 120°C toute la nuit (solution noire). On rajoute 3éq d'alcool dans le milieu. En LC/SM, 20% de produit attendu.

Passage au micro-ondes CEM : 140°C, 150W, 17bar, ½ heure.

On verse la solution dans l'eau.

100ml

On décante.

On extrait à l'AcOEt

3x100ml

On lave à la soude à 1N

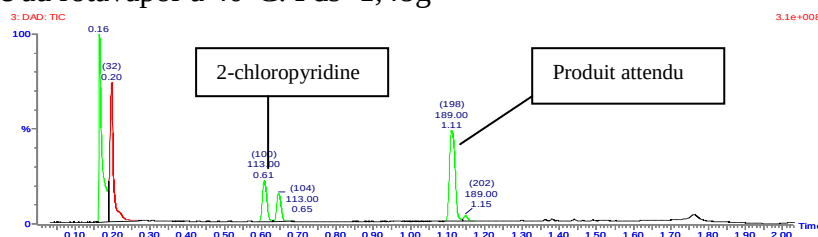
2x100ml

On lave à l'eau

100ml

La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium anhydre. On essore, rince.

On amène à sec au rotavapor à 40°C. Pds=1,48g



On purifie sur biotage sur une cartouche de 40g de silice 30-60 μ dans le mélange Dichlorométhane 80, Acétate d'éthyle 20. On récupère 2 fractions que l'on amène à sec sous vide au rotavapor.

VAS.BND3.001.1 Pds=1g

VAS.BND3.001.2 Pds=270.7mg Huile brune contenant la 2-diméthylaminopyridine

Rdt=42%

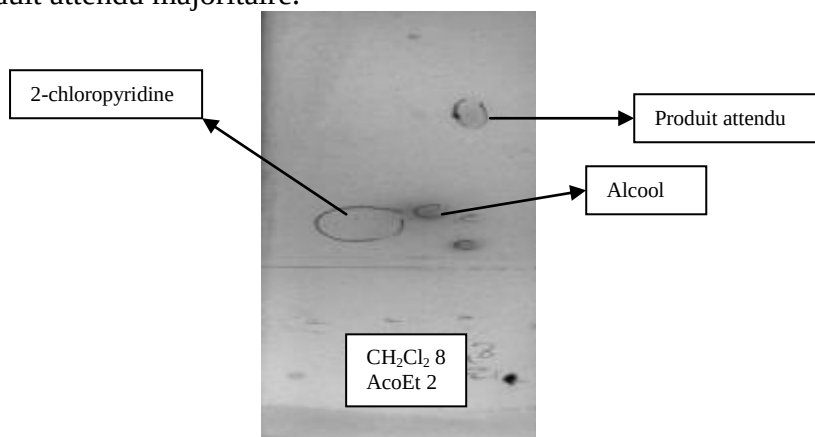
RMN ^1H , (DMSO deutéré, 300MHz), δ (ppm) : 3,0(s,N(CH $_3$) $_2$,position 2) ;

6,5(t,1H,position 4) ; 6,6(d,1H,position 3) ; 7,5(t,1H,position 4) ; 8,05(d,1H,position 6)

On purifie VAS.BND3.001.3 sur une cartouche de 90g de silice 15-40 μ dans le mélange Toluène 97 / Acétate d'éthyle 3. On récupère une fraction contenant le produit attendu que l'on amène à sec au rotavapor.

VAS.BND3.001.3 Pds=0,3907g Cristaux orangés Rdt=23%

En LC/SM, produit attendu majoritaire.



RMN ^1H , (DMSO deutéré, 300MHz), δ (ppm) : 7,0(d,1H,position 5) ; 7,85(t,1H,position 4) ;

8,15(d,1H,position 2)

Produit attendu majoritaire.

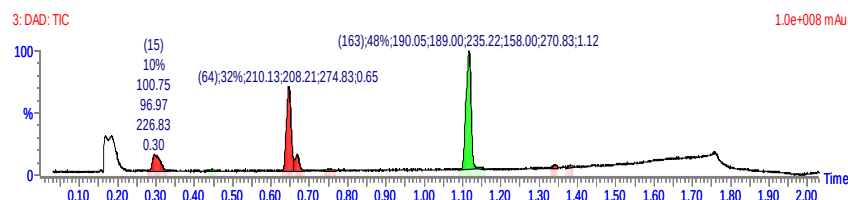
2. b

Compound ID	Name	Formula	Molweight	Equ.	Mol	Weight	Volume
	ALCOOL			6.000			
MFCD00006219	2-BROMOPYRIDINE	C $_5$ H $_4$ BrN	158.0	1.000	0.633 mmol	0.100 g	60.350 μ l
MFCD00011382	POTASSIUM CARBONATE	CK $_2$ O $_3$	138.2	7.000	4.431 mmol	0.612 g	
A	NMP		0.0				4.000 ml
B		IK	166.01	0.200	126.600 μ mol	0.021 g	
MFCD00010978	COPPER(I) IODIDE	CuI	190.45	0.200	126.600 μ mol	24.110 mg	

Dans un vial (2ml à 5ml) muni d'une agitation magnétique, on introduit :

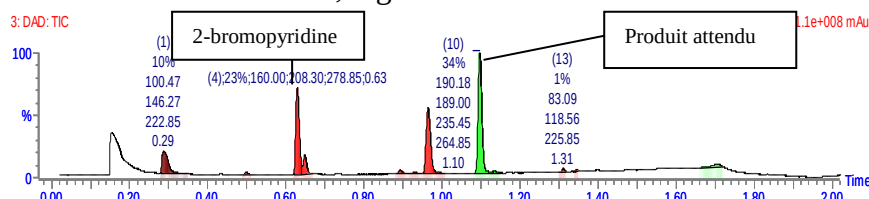
- Alcool
- NMP
- Carbonate de potassium
- 2-bromopyridine
- Iodure de potassium
- Iodure de cuivre

Passage au micro-ondes à 150°C pendant 5h. En LCMS, 48% de produit attendu.



On verse la solution dans 50ml d'eau. On décante.

On extrait à l'AcoEt(2x30ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium anhydre. On essore, rince. On amène à sec au rotavapor à 40°C. En LCMS, formation d'un produit inconnu. Huile verdâtre. Pds=2,71g Présence de NMP.



On passe le produit en HPLC phase basique grande colonne.

Reprend par 4cm³ de DMSO. CLHP préparative colonne Macherey-Nagel 250x40mm phase inverse C18 Nucleodur Gravity 10μ. Eluant : MeCN et H₂O à 10mM HCOONH₄ amené à pH9-10 par NH₄OH. Palier 10% MeCN : 3min, gradient jusqu'à 95% MeCN en 37min puis palier à 95% MeCN de 8min. Collecte en fonction de l'absorption UV254nm. 1 injection de 4cm³ sont nécessaires.

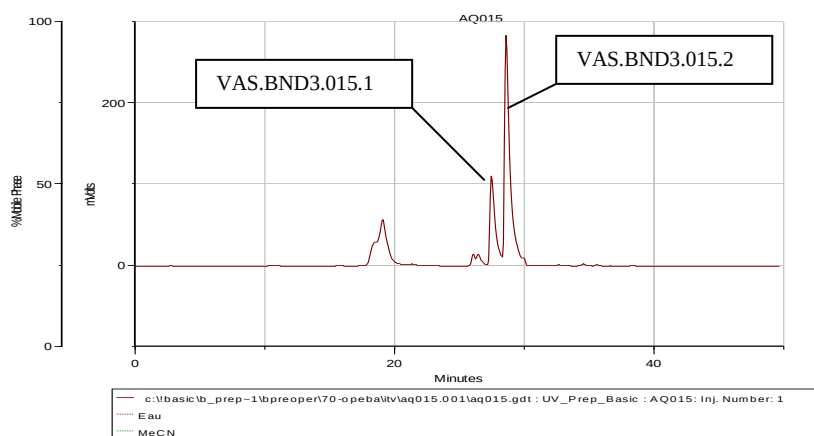
On récupère 2 fractions que l'on amène à sec sous vide au rotavapor pour enlever l'acétonitrile. On les passe ensuite au lyophilisateur toute la nuit pour éliminer l'eau.

VAS.BND3.015.1 Pds=0,2mg

VAS.BND3.015.2 Pds=30,1mg Poudre blanche Rdt=25%

RMN ¹H, (DMSO deutéré, 300MHz), δ(ppm) : 7,0(d,1H,position 5) ; 7,85(t,1H,position 4) ; 8,15(d,1H,position 2)

Produit attendu majoritaire.



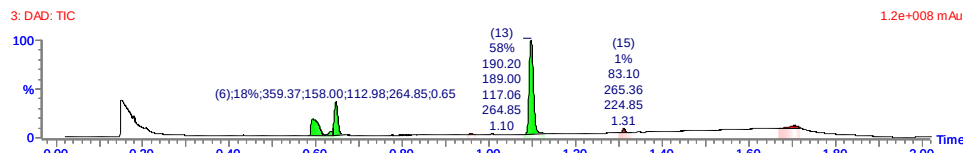
2. c

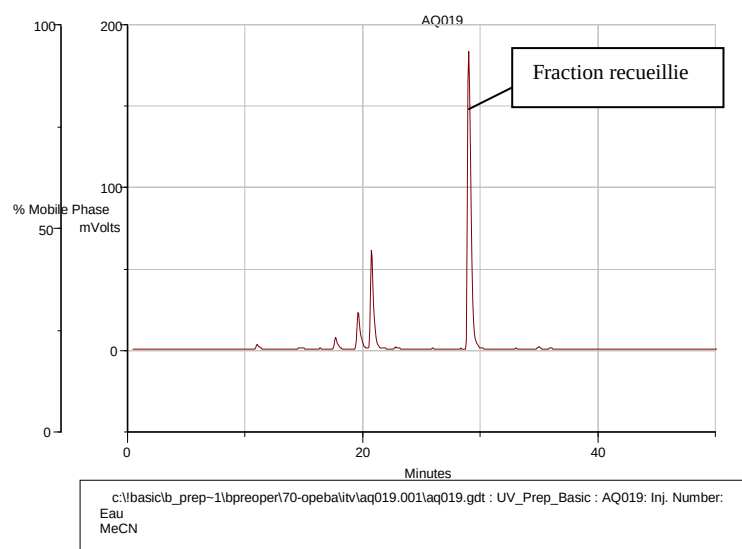
Compound ID	Name	Formula	Molwei ght	Equ.	Mol	Weight	Volume
	ALCOOL			1.000			
MFCD00006219	2-BROMOPYRIDINE	C ₅ H ₄ BrN	158.0	1.000	0.633 mmol	0.100 g	0.060 ml
MFCD00012162	POTASSIUM TERT-BUTOXIDE	C ₄ H ₉ KO	112.21	1.080	0.684 mmol	76.710 mg	
680-31-9	HEXAMETHYLPHOSPHORAMIDE	C ₆ H ₁₈ N ₃ OP	179.2	9.081	5.748 mmol	1.030 g	1.000 ml

Dans un vial(2ml à 5ml) muni d'une agitation magnétique, on introduit :

- Tert-butoxide de potassium
- HMPA
- Alcool
- 2-bromopyridine

Passage au micro-ondes (Personnal Chemistry) à 210°C pendant 10min. En LCMS, 58% de produit formé.

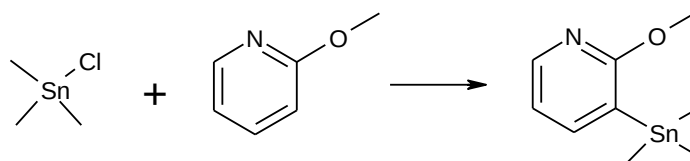




3. Métallation

3. a

Pour voir comment se comporte les dérivés de l'étain, tout en ayant pour objectif une prochaine réaction avec pour réactif limitant le produit formé dans les réactions précédentes sur un dérivé d'étain, nous avons voulu faire une réaction test :



Compound ID	Name	Formula	Molweight	Equ.	Mol	Weight	Volume
B	THF		0.0				5.000 ml
MFCD00000520	TRIMETHYLTIN CHLORIDE	C3H9ClSn	199.27	1.050	2.886 mmol	0.575 g	
MFCD00006262	2-METHOXYPYRIDINE	C6H7NO	109.13	1.000	2.749 mmol	0.300 g	
594-19-4	TERT-BUTYLLITHIUM dans pentane à 1.6M	C4H9Li	64.06	1.300	3.574 mmol		2.234 ml

Dans un keller de 25ml muni d'une agitation magnétique, d'une arrivée d'argon et d'une sonde thermométrique, on introduit:

- 2-méthoxypyridine
- 3ml de THF

Le keller est plongé dans un mélange de carboglace, d'acétone et d'azote liquide.

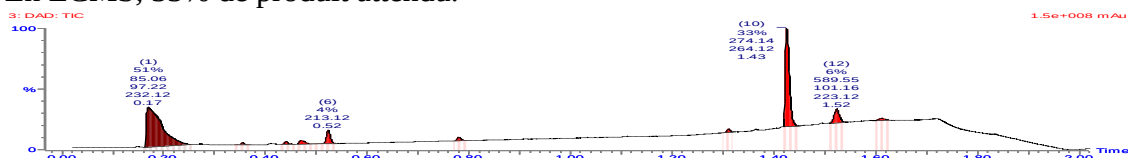
On ajoute ensuite avec précaution :

- Tert-butyllithium (ajout en 10 min à -64°C puis agitation pendant 1h à -66°C)

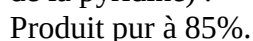
Le milieu est jaune et limpide.

Puis on ajoute le chlorure de triméthylétain à -65°C en solution dans 2ml de THF (ajout en 10min puis agitation pendant ¾ d'heure).

En LCMS, 33% de produit attendu.



En LCMS, 37% de produit attendu.



Ainsi, nous avons l'équation suivante :



Le keller est plongé dans un mélange de carboglace, d'acétone et d'azote liquide.

On ajoute ensuite avec précaution :

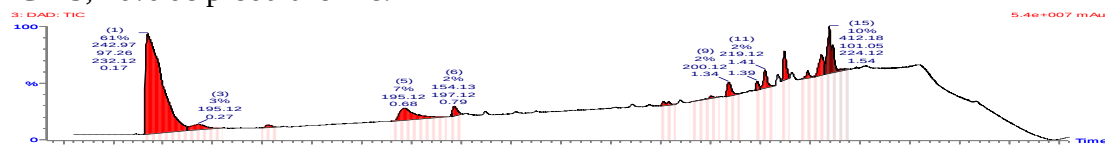
- Tert-butyllithium (ajout en 10 min à -65°C puis agitation pendant 1h à -65°C)

Le milieu est jaune et limpide.

Puis on ajoute le chlorure de triméthylétain à -65°C en solution dans 1ml de THF (ajout en 10min puis agitation pendant ¾ d'heure).

On fait remonter la température à 0°C et on laisse sous agitation ¾ d'heure.

En LCMS, 10% de produit formé.



On verse la solution dans une solution aqueuse de NH₄Cl

10ml

On décante.

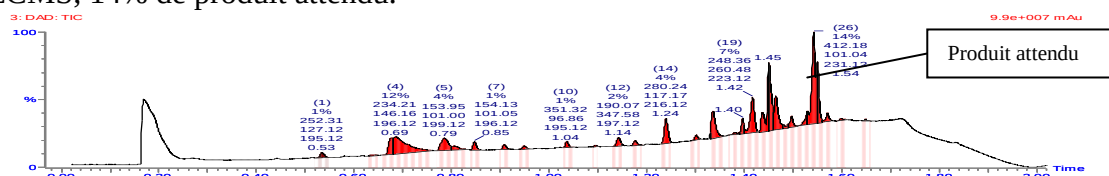
On extrait à l'AcOEt

10ml

La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium anhydre. On essore, rince.

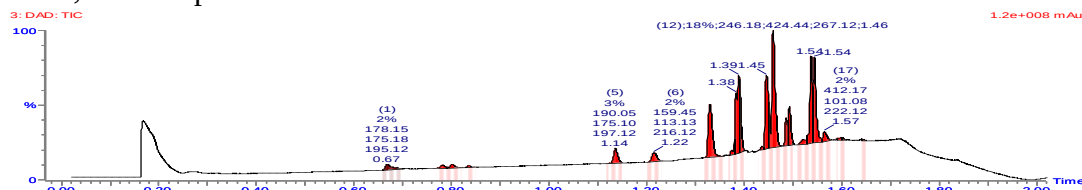
On amène à sec au rotavapor à 40°C. Pds=273.2mg Huile jaune

En LCMS, 14% de produit attendu.



On purifie sur biotage sur une cartouche de 50g de silice 40-63μ dans le mélange Toluène 93, Acétate d'éthyle 7. On récupère une fraction que l'on amène à sec sous vide au rotavapor à 40°C.

En LCMS, 17% de produit attendu.

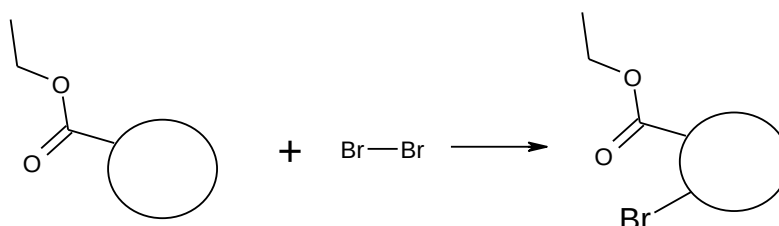


VAS.BND3.050 Pds=60.2mg Liquide incolore Rdt=32,3%

RMN ¹H, (DMSO deutéré, 300MHz), δ(ppm) : Produit non majoritaire. Mélange de dérivés d'étain. Spectre inexploitable.

4. Bromation

Nous avons fabriqué un produit bromé qui sera le réactif limitant d'une prochaine étape (voir partie suivante). Nous avons donc du le fabriquer en quantité assez importante pour faire suffisamment d'essais. L'équation est la suivante :



Compound ID	Name	Formula	Molweight	Equ.	Mol	Weight	Volume
	LIMITANT			1.000	l		
7726-95-6	BROMINE	Br ₂	159.81	2.053	57.800 mmol	9.330 g	3.000 ml
A	AcOH		0.0				52.078 ml

Dans un keller de 250ml muni d'une agitation magnétique, d'une arrivée d'argon et d'une sonde thermométrique, on introduit:

- Limitant
- Dibrome
- Acide acétique

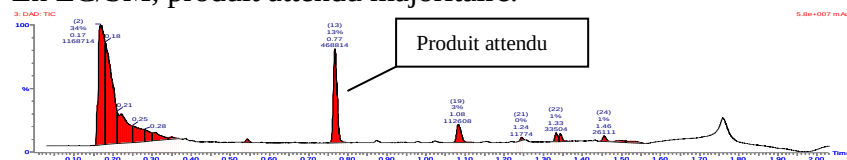
On commence à couler le Br₂ à TA=21°C.

On a un début de précipitation à T=31,4°C. La couleur du milieu réactionnel devient rouge orangé.

La fin de l'introduction du Br₂ s'effectue 5 min après le début de la coulée.

On laisse sous agitation pendant 3h.

En LC/SM, produit attendu majoritaire.



5. a

Compound ID	Name	Formula	Molweight	Equ.	Mol	Weight	Volume
244205-40-1	2-BROMOPHENYLBORONIC ACID	C ₆ H ₆ BBrO ₂	200.83	1.000	0.301 mmol	60.450 mg	
A	DIOXANNE		0.0				2.000 ml
VAS.BND3.003				1.000		0.100 g	
14221-01-3	TETRAKIS(TRIPHENYL PHOSPHINE)PALLADIUM(0)	C ₇₂ H ₆₀ P ₄ Pd	1155.58	0.050	15.050 μmol	17.390 mg	
MFCD00010957	CESIUM CARBONATE à 1.5M	CCs ₂ O ₃	325.83	3.003	0.904 mmol		0.452 ml

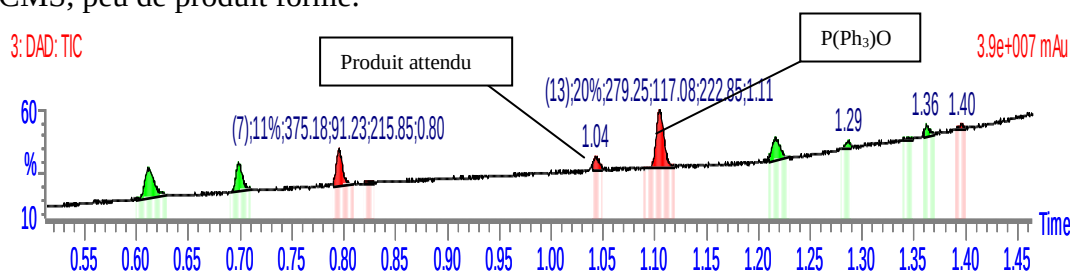
Dans un vial de 5ml muni d'une agitation magnétique, on introduit :

- VAS.BND3.003
- Acide 2-bromophénylboronique
- Dioxanne dégazé sous argon
- Palladium Tétrakis
- Solution aqueuse à 1.5M de Carbonate de Césium (489mg dans 1ml)

La couleur du milieu réactionnel est orange.

On passe le mélange au micro-ondes à 120°C pendant 30min.

En LCMS, peu de produit formé.



On rajoute 10 mg de catalyseur(palladium) et 30 mg d'acide boronique.

On remet le milieu au micro-ondes à 160°C pendant 10min.

On verse la solution dans l'eau.

25ml

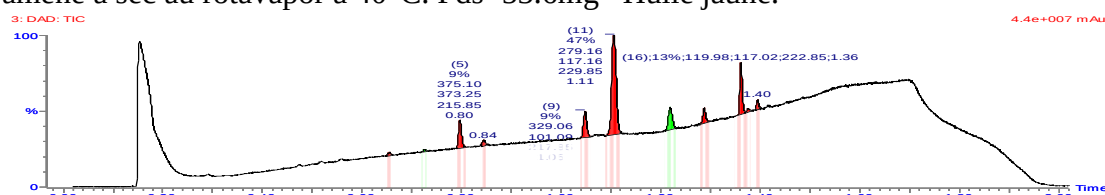
On décante.

On extrait à l'AcOEt

3x25ml

La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium anhydre. On essore, rince.

On amène à sec au rotavapor à 40°C. Pds=53.6mg Huile jaune.



On purifie par LC/SM préparative après avoir dissous le produit dans 1ml de DMSO sur colonne Sun Fire C18. 5μ en 1 injection méthode : 20-95 15mn en phase acide. On recueille 2 fractions que l'on amène à sec sous vide au rotavapor puis au lyophilisateur.

VAS.BND3.022.1 Pds=2mg Rdt=2%

RMN ¹H, (DMSO deutéré, 300MHz), δ(ppm) : 0.95(t,3H,CH₃) ; 4.0(q,2H,CH₂) ;

6.5(s,2H,NH₂)

Produit attendu à 80% de pureté.

5. b

Compound ID	Name	Formula	Molweight	Equ.	Mol	Weight	Volume
A	DIOXANNE		0.0				2.000 ml
VAS.BND3.003				1.000		0.100 g	
14221-01-3	TETRAKIS(TRIPHENYLPHOSPHINE)PALLADIUM(0)	C ₇₂ H ₆₀ P ₄ Pd	1155.58	0.100	30.10 μmol	34.780 mg	
MFCD00011084	LITHIUM CARBONATE	Li ₂ CO ₃	73.89	3.000	0.903 mmol	66.720 mg	
244205-40-1	2-BROMOPHENYLBORONIC ACID	C ₆ H ₆ BrO ₂	200.83	1.000	0.301 mmol	60.450 mg	

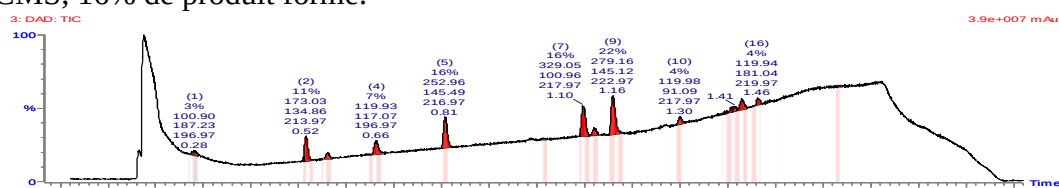
Dans un vial de 5ml muni d'une agitation magnétique, on introduit :

- VAS.BND3.003
- Acide 2-bromophénylboronique
- Dioxanne dégazé sous argon
- Palladium Tétrakis
- Solution aqueuse de Carbonate de Lithium (66.7mg dans 1ml d'eau)

La couleur du milieu réactionnel est orange.

On passe le mélange au micro-ondes à 160°C pendant 10min.

En LCMS, 16% de produit formé.



On rajoute au milieu réactionnel 15mg de catalyseur et 1éq d'acide boronique.

On remet à chauffer au micro-ondes à 160°C pendant 10min.

En LCMS, pas d'amélioration. Cependant tout le limitant a été consommé.

On verse la solution dans l'eau.

25ml

On décante.

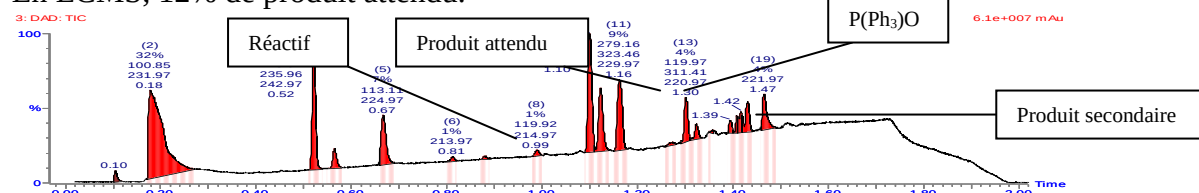
On extrait à l'AcOEt

3x25ml

La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium anhydre. On essore, rince.

On amène à sec au rotavapor à 40°C. Pds=191,1mg Huile brune

En LCMS, 12% de produit attendu.



On passe le produit en HPLC phase acide grande colonne.

Reprend par 4cm³ de DMSO. CLHP préparative colonne Macherey-Nagel 250x40mm phase inverse C18 Nucleodur 10μ. Eluant : MeCN à 0.07%TFA et H₂O à 0.07%TFA. Palier 10% MeCN : 3min, gradient jusqu'à 95% MeCN en 37min puis palier à 95% MeCN de 8min.

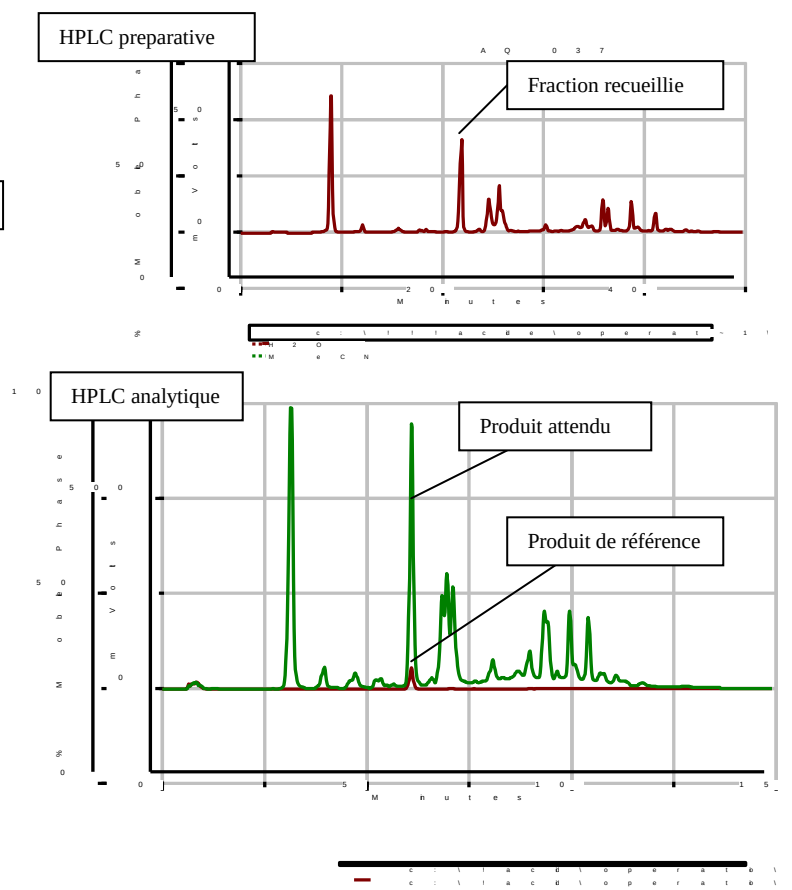
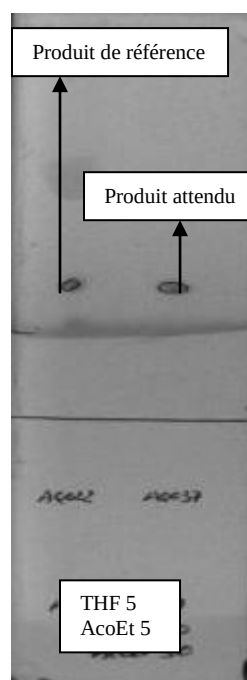
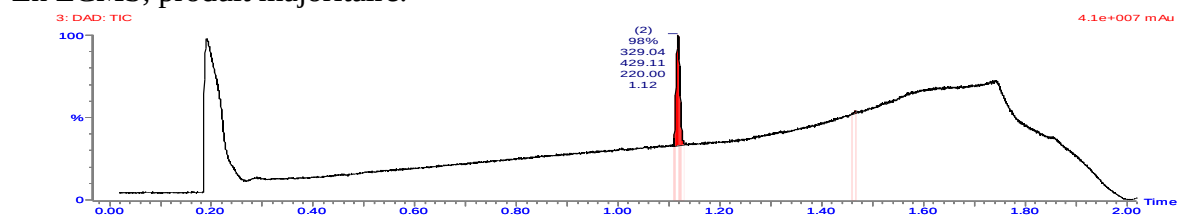
Collecte en fonction de l'absorption UV254nm. Une injection de 4cm³ est nécessaire.

On récupère une fraction que l'on amène à sec sous vide au rotavapor pour enlever l'acétonitrile. On la passe ensuite au lyophilisateur toute la nuit pour éliminer l'eau.

VAS.BND3.037 Pds=3.11mg Poudre blanche Rdt=32%

RMN ¹H, (DMSO deutéré+D₂O, 300MHz), δ(ppm) : 0.95(t,3H,CH₃) ; 4.0(q,2H,CH₂)

En LCMS, produit majoritaire.



5. c

L'essai suivant a été réalisé en changeant juste le catalyseur par rapport à la réaction précédente.

Cet essai est un mélange de deux milieux réactionnels. L'un est réalisé avec 100mg de réactif limitant et l'autre avec 500mg de ce même réactif.

Le protocole et les réactifs étant les mêmes, nous avons regroupé ces deux milieux en un seul. Voici donc le protocole du premier essai :

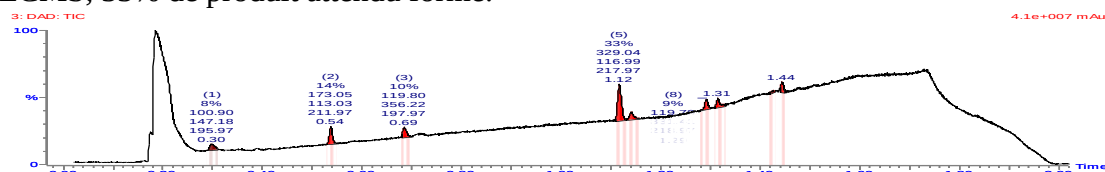
Dans un vial de 5ml muni d'une agitation magnétique, on introduit :

- VAS.BND3.003
- 2-Bromophénylboronic Acid
- Dioxanne dégazé sous argon
- Catalyseur
- Solution aqueuse de Carbonate de Lithium (66.7mg dans 1ml d'eau)

La couleur du milieu réactionnel est orange.

On passe le mélange au micro-ondes (Personnal Chemistry) à 160°C pendant 10min.

En LCMS, 33% de produit attendu formé.



Regroupement avec l'autre milieu réactionnel avant traitement.

Ci-dessous le tableau des quantités de réactifs et de solvant [NB : on remarquera que quantités de réactifs sont exprimées en fonction de 600mg de limitant (100mg + 500mg)]

Compound ID	Name	Formula	Molweight	Equ.	Mol	Weight	Volume
A	DIOXANNE		0.0				12.000 ml
VAS.BND3.003				1.000		0.600 g	
MFCD00011084	LITHIUM CARBONATE	CLi2O3	73.89	3.000	5.421 mmol	0.401 g	
244205-40-1	2-BROMOPHENYLBORONIC ACID	C6H6BBrO2	200.83	1.000	1.807 mmol	0.363 g	
72287-26-4	1,1'-BIS(DIPHENYLPHOSPHINO)FERROCENE PALLADIUM DICHLORIDE	C34H28Cl2FeP2	731.71	0.100	180.70 µmol	132.200 mg	

Dans un vial de 20ml muni d'une agitation magnétique, on introduit :

- VAS.BND3.003
- 2-Bromophénylboronic Acid
- Dioxanne dégazé sous argon
- Catalyseur
- Solution aqueuse de Carbonate de Lithium (334mg dans 5ml d'eau)

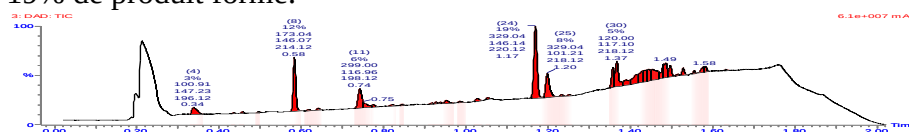
La couleur du milieu réactionnel est rouge.

On passe le mélange au micro-ondes (Biotage) à 160°C pendant 10min.

En LCMS, 22% de produit formé. Cependant, il reste du produit de départ.

On rajoute 50mg de catalyseur au milieu réactionnel et on remet au micro-ondes à 160°C pendant 10min.

En LCMS, 19% de produit formé.



On verse la solution et l'essai réalisé avec 100mg de limitant dans l'eau.

40ml

On décante.

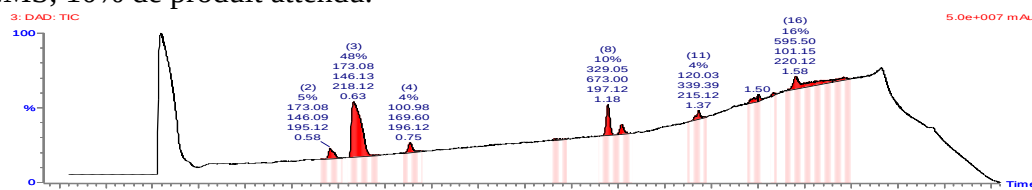
On extrait à l'AcOEt

3x40ml

La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium anhydre. On essore, rince.

On amène à sec au rotavapor à 40°C. Pds=493.2mg Huile brune.

En LCMS, 10% de produit attendu.



On passe le produit en HPLC phase acide grande colonne.

Reprend par 5cm3 de DMSO. CLHP préparative colonne Macherey-Nagel 250x40mm phase inverse C18 Nucleodur 10µ. Eluant : MeCN à 0.07%TFA et H2O à 0.07%TFA. Palier 10%

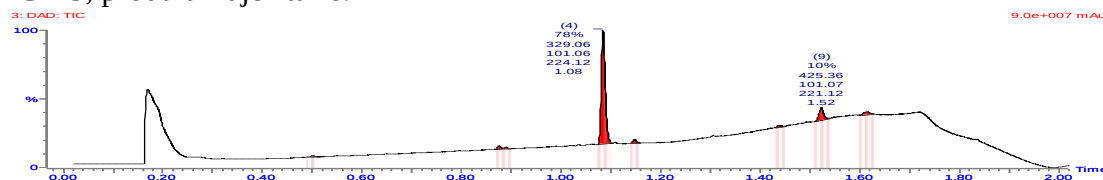
MeCN : 3min, gradient jusqu'à 95% MeCN en 37min puis palier à 95% MeCN de 8min.
Collecte en fonction de l'absorption UV254nm. Une injection de 5cm³ est nécessaire.

On récupère une fraction que l'on amène à sec sous vide au rotavapor pour enlever l'acétonitrile. On la passe ensuite au lyophilisateur pour éliminer l'eau.

VAS.BND3.043 Pds=74.8mg Poudre beige Rdt=12.6%

RMN ¹H, (DMSO deutéré), δ(ppm) : 0.95(t,3H,CH₃) ; 4.0(q,2H,CH₂)

En LCMS, produit majoritaire.



Bibliographie

- ¹ <http://fr.wikipedia.org/wiki/Peptidase>
- ² N. Miyaoura, T. Yanagi, A. Suzuki, *Synth. Comm.*, **1981**, *11*, 513.
T. Watanabe, N. Miyaoura, A. Suzuki, *Synlett.*, **1992**, 207.
- ³ Rapport de stage interne Sanofi-Aventis, Armelle Sigwald, du 3 juillet au 15 décembre 2006
- ⁴ Miyaoura, N et al. *Tetrahedron Lett*, **1979**, 3437.
- ⁵ Miyaoura, N. ; Suzuki, A. *Chem. Commun.* **1979**, 866.
- ⁶ *Can. J. Chem.* **2001**, *79*, 1827.
- ⁷ C. Elschenenbroich, A. Salzer “Organometallics: A Concise Introduction” (2nd Ed.) (**1992**) de Wiley-VCH: Weinheim. ISBN 3-527-28165-7
- ⁸ “Catalyse homogène: Comprendre l’Art” par PW van Leeuwen, Springer, **2005**. ISBN 1-4020-3176-9
- ⁹ *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, 1161-1172
- ¹⁰ *Journal of the American Chemical Society*, **1997**, *119*(43), 10539-10540
- ¹¹ *Tetrahedron*, **1992**, *48*(17), 3633-3652
- ¹² *European Journal of Organic Chemistry*, **2006**, (36), 3562-3565
- ¹³ *Tetrahedron Letters*, **2008**, *49*(3), 569-572
- ¹⁴ *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **1998**, *46*(3), 400-412
- ¹⁵ *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9550-9561
- ¹⁶ *Tetrahedron Letters*, **2007**, *48*(40), 7137-7139

ANNEXES

L

Appareil à micro-ondes Biotage



UPLC/SQD à détection UV-DAD, ELSD, ES + et -



LC/MS préparative



HPLC préparative

