

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique – Institut Armand-Frappier

**Optimisation de la réaction de Suzuki-Miyaura dans une perspective de synthèse de
bibliothèques de peptides**

Par
Doan, Ngoc Duc

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès Sciences (M.Sc)
en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Président de jury et examinateur interne :	Dre Christiane Ayotte INRS – Institut Armand-Frappier
Examineur externe :	Dr Emanuel Escher Dép. de Pharmacologie Université de Sherbrooke
Directeur de recherche :	Dr Alain Fournier INRS – Institut Armand-Frappier

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes plus sincères remerciements à mon directeur de recherche, le Pr Alain Fournier, pour ses précieux conseils, sa disponibilité et ainsi que pour la confiance qu'il m'a témoignée.

Je remercie également tous les membres du Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides et plus spécifiquement, Myriam Létourneau et Steve Bourgault pour leur contribution à la réalisation de mon projet de recherche.

Enfin, je remercie la Fondation Armand-Frappier pour le support financier qui m'a été accordé.

6 août 2007

Doan, Ngoc Duc

Table des matières

	Page
Remerciements	ii
Table des matières	iii
Abréviations	v
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	ix
Sommaire	x
Introduction	1
Chapitre I : Revue de littérature	5
1.1 : Synthèse et modifications de peptides	6
1.1.1 Informations générales	6
1.1.2. Formation du lien amide	7
1.1.2.1 Carbodiimides	8
1.1.2.2. Sels d'onium	9
1.1.2.3. Sels d'organophosphate et de phosphoryle	10
1.1.2.4. Autres réactifs	11
1.1.3. Synthèse peptidique	12
1.1.4 : Modification des peptides :	12
1.1.4.1. Modifications aux extrémités amino et carboxy terminales	14
1.1.4.2. Cyclisation	15
1.1.4.3. Alkylation de l'azote du lien amide	17
1.1.4.4. Changements de chiralité	18

1.1.4.5. Modification de la chaîne latérale	18
1.2. Réaction de Suzuki-Miyaura et applications	20
1.2.1: Réaction de Suzuki-Miyaura	20
1.2.1.1: Mécanisme de la réaction	22
1.2.1.2: Conditions réactionnelles	24
<i>Catalyseurs :</i>	24
<i>Bases et Solvants</i>	26
<i>Réactions secondaires</i>	28
1.2.1.3: Applications de la réaction Suzuki-Miyaura	32
<i>Synthèse de biphényles</i>	32
<i>Système de biphénylène et de binaphthyle :</i>	36
<i>Dérivés dithiophène</i>	38
<i>Synthèse des acides aminés et modification des peptides</i>	39
<i>Synthèse en phase solide :</i>	40
<i>Synthèse de produits naturels et pharmaceutiques</i>	42
Chapitre II : Résultats	47
Partie A : Article	48
Partie B : <i>Modification de l'ET-1(9-21) à la position Tyr¹³ : le rôle du tryptophane.....</i>	80
Chapitre II : Discussion et conclusion	86
Références	98

Abréviations :

Suzuki-Miyaura , SM ; synthèse organique en phase solide, SOPS ; Enképhaline, Enk ; peptide-1 semblable au glucagon, GLP-1 ; peptide libérant la gastrine, GRP ; dichlorométhane, DCM ; dicyclohexylcarbodiimide, DCC ; diméthylformamide, DMF ; diisopropyléthylamine, DIEA ; N-hydroxybenzotriazole, HOBt ; 1-oxo-2-hydroxydihydrobenzotriazine, HODhbt ; 1-hydroxy-7-azabenzotriazole, HOAt ; 6-chloro-1-hydroxybenzotriazole, Cl-HOBt ; hexafluorophosphate de N,N',N'-tétraméthyluronium, HATU ; hexafluorophosphate de 2-(6-Chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthylaminium, HCTU ; hexafluorophosphate de benzotriazole-N,N',N'-tetramethyl-uronium, HBTU ; hexafluorophosphate de (3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium, HDTU ; hexafluorophosphate de (3,4-dihydro-4-oxo-5-azabenzotriazin-3-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium, HDATU ; hexafluorophosphate de [(7-azabenzotriazol-1-yl)oxy]tris-(pyrrolidino)phosphonium, PyAOP ; hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxytri(pyrrolidino)phosphonium, PyBOP ; diéthoxyphosphinyloxybenzotriazole de phosphinyle, DepOBt ; 3-(diéthoxyphosphinyloxy)-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazine, DepODhbt ou DEPBT ; diéthoxyphosphinyloxy-7-azabenzotriazole, DepOAt ; 1-[di(o-tolyl)phosphinyloxy]benzotriazole, DtpOBt ; 1-[di(o-tolyl)phosphinyloxy]-7-azabenzotriazole, DtpOAt ; 1-[di(o-tolyl)phosphinyloxy]-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazine, DtpODhbt ; trifluorure de (diéthylamino)sulfure, DAST ; hexafluorophosphate de tétraméthylfluoroformamidinium, TFFH ; carbonate de bis(trichlorométhyle), BTC ; tétrahydrofurane, THF ; thyrolibérine, TRH ; barrière hémato-

encéphalique, BHE; DMSO, diméthylsulfoxyde; SPPS, Synthèse peptidique en phase solide; SAR, relation structure-activité; Met-Enk, méthionine-enképhaline; Leu-Enk, leucine-enképhaline; Tyr(*t*-Bu), *O*-*tert*-butyl-tyrosine; Phe(*p*I), *p*-iodo-phénylalanine; Bip, 4-biphénylalanine; BOP, hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris(diméthylamino)-phosphonium; DIEA, diisopropyléthylamine; TFA, acide trifluoroacétique; ACN, acétonitrile; NMP, N-méthyl-2-pyrrolidinone; RP-HPLC, chromatographie liquide à haute performance en phase inverse; Fmoc, 9-fluorenylméthoxycarbonyl; MALDI-TOF, désorption – ionisation par impact laser assistée par matrice – *sm* à temps de vol; MS, spectrométrie de masse; Pd(PPh₃)₄, (tetrakis)(triphénylphosphine) palladium(0); PdCl₂(PPh₃)₂, dichlorobis(triphénylphosphine)palladium(II); PCy₃, tricyclohexylphosphine; *n*-Bu₄NI, tetrabutylammonium iodide; (Boc)₂O, dicarbonate de di-*tert*-butyl; Boc, *tert*-butyloxycarbonyl. rt, room temperature.

Liste des schémas et figures :

	Page
Schéma 1 : Couplage peptidique utilisant le DCC comme réactif lors d'une synthèse en phase solide.....	9
Schéma 2: Couplage entre l'acide phénylboronique et l'aldéhyde 4-bromo-benzoïque selon les conditions de la réaction de Suzuki-Miyaura	21
Schéma 3: Cycle catalytique du couplage de Suzuki-Miyaura	22
Schéma 4: Formation de produits secondaires lors de la réaction de SM impliquant l'utilisation d'un ligand de triphénylphosphine	29
Schéma 5 : Échange aryle-aryle	29
Schéma 6 : Réaction d'homo-couplage catalysée par le palladium	30
Schéma 7: Homo-couplage en présence d'oxygène	30
Schéma 8 : Dimérisation de l'acide 1-alcénylboronique	31
Schéma 9: Exemple de la réaction de l'alkoxycarbonylation	31
Schéma 10: Formation de produits secondaires par la réaction de Heck	31
Schéma 11: Synthèse de squelettes d'alkaloïde de dibenzopyrrocoline	34
Schéma 12 : Synthèse de la streptonigrine	35
Schéma 13 : Synthèse de 2-arylbenzothiazoles	36
Schéma 14: Synthèse de polyrotaxanes (n = 3-9)	37
Schéma 15 : Synthèse de blocs de construction de type aryle/alkyle utilisés pour la synthèse de dendrimères et de polymères hyperbranchés	37
Schéma 16 : Synthèse d'oligothiophènes substituées avec le 9,9-diarylfluorene	38
Schéma 17 : Synthèse régiosélective des dérivés thiophènes par la réaction de SM	39

Schéma 18 :	Synthèse de dimères peptidiques par la réaction de SM	40
Schéma 19:	Synthèse d'une librairie d'inhibiteurs de la protéase NS3	40
Schéma 20 :	Méthode alternative du couplage de SM permettant la formation de composés biaryliques	42
Schéma 21 :	Approches synthétiques pour la formation du système biarylique A- B de la vancomycine	45
Schéma 22 :	Synthèse de N, α -Boc-[Ala ^{1,2,3} , Phe(pI) ⁴ , Leu ⁸]Enk-résine	89
Figure 1:	Trois stratégies principales d'effectuer la cyclisation en phase solide	17
Figure 2:	Famille des médicaments de type de Sartan	43
Figure 3.	Structure de la palytoxine	44
Figure 4 :	Chromatogramme de l'analyse HPLC et spectre de masse du mélange de peptides après la réaction de SM effectuée sur le peptide <i>N</i> - α -Fmoc-[Cys(Acm) ^{11,15} , Phe(pI) ¹³]ET-1(9-21) obtenu par MS MALDI-TOF	81
Figure 5:	Chromatogrammes de l'analyse HPLC et MALDI-TOF MS du produit initial [BiP ¹³]ET-1(9-21) (A) et du mélange réactionnel obtenu après la réaction SM (B)	84

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1 : Molécules biaryliques synthétisées au moyen de la réaction de SM	33
Tableau 2 : Peptides synthétisés pour évaluer la compatibilité des conditions de SM avec différentes combinaisons d'acides aminés	82

Résumé

L'utilisation de peptides en tant qu'agents thérapeutiques présente plusieurs avantages. En effet, les peptides sont des molécules qui possèdent une haute affinité et spécificité tout en ayant un profil de toxicité plus bas que la plupart des petites molécules pharmacologiques. De plus, contrairement aux protéines, les peptides sont plus stables aux variations de température et ils possèdent une meilleure pénétration des tissus à cause de leur taille relativement petite. Par contre, leur utilisation est encore limitée. Pour augmenter la spécificité et l'affinité de récepteur, la stabilité sanguine aussi bien que la puissance des peptides, on a fait des modifications chimiques y compris l'introduction de groupements aromatiques, de fonctions hétérocycliques ou de petits fragments de molécule sur la chaîne peptidique. À cet égard, la réaction de Suzuki-Miyaura (SM) s'avère appropriée pour la modification des peptides.

La réaction de SM est le couplage entre un dérivé de l'acide boronique et un halogénure ou un triflate de vinyle ou d'aryle en présence d'un catalyseur de palladium et d'une base. Les principaux avantages de cette réaction sont des conditions de réaction douces, une toxicité moindre pour l'environnement par rapport à la plupart des autres réactifs organométalliques, et la disponibilité commerciale des dérivés de l'acide boronique. Présentement, la réaction de SM est fréquemment utilisée en synthèse organique classique et elle a contribué à accélérer la préparation de composés bioactifs pour des études structure-activité. Toutefois, son usage est toujours très limité pour la conception de dérivés peptidiques et en particulier la réaction n'a jamais été exploitée pour la modification post-synthèse après assemblage d'une chaîne peptidique sur un support solide. Puisque les peptides contiennent des groupements actifs qui pourraient interférer avec la réaction de SM, il nous est apparu plus approprié d'exécuter la réaction en phase solide tandis que tous les groupements des chaînes latérales du peptide sont protégés.

Dans la présente étude, nous montrons une nouvelle stratégie utilisant la réaction de SM pour modifier en phase solide des peptides contenant un acide aminé aromatique. Le peptide [Ala^{1,2,3}, Leu⁸]Enk, lié à une résine de type Wang, a été choisi comme modèle de peptide-résine afin de vérifier la compatibilité avec la méthode de SM.

Notre premier essai, effectué avec le N- α -Fmoc-[Ala^{1,2,3}, Phe(*p*)⁴, Leu⁸]Enk, lié à une résine Wang, a indiqué que le groupement protecteur Fmoc n'est pas stable dans les conditions basiques utilisées pour la réaction de SM. Le groupement protecteur Fmoc a été ensuite remplacé par un groupe Boc et celui-ci s'est montré compatible avec la méthode.

Afin d'évaluer les conditions optimales de la réaction de SM nous avons étudié, l'influence de la base, du solvant, du catalyseur, de la température et du temps sur le rendement réactionnel. L'acide phénylboronique a été utilisé pour cette optimisation. Les conditions optimales se sont avérées être le DMF comme solvant, le K₃PO₄ ou le Na₂CO₃ comme base et le Pd(PPh₃)₄ comme catalyseur, avec un temps de réaction de 20 h et une température de l'ordre de 80 °C, nous avons poursuivi notre étude afin d'évaluer les rendements avec différents acides boroniques.

En particulier, l'étude a été étendue à l'analyse du comportement de la réaction de SM lors de substitutions par divers acides boroniques contenant des groupements électro-donneurs ou électro-attracteurs. Il semble que les dérivés de l'acide phénylboronique porteurs d'un groupement électro-attracteur sur le cycle aromatique soient plus réactifs que ceux avec un groupement électro-donneur. Par exemple, l'acide 4-méthoxyphénylboronique a été complètement inactif dans ces conditions de réaction de SM, tandis que le couplage avec l'acide 4-méthylcarboxyphénylboronique a donné 87% de conversion. Ces conditions ont également été appliquées en synthèse de dérivés hétéroaromatiques de H₂N-[Ala^{1,2,3}, Leu⁸]Enk-OH. À cet égard, les dérivés de l'acide pyridineboronique, l'acide furaneboronique, et l'acide thiophèneboronique ont été utilisés et ils sont donnés de bons rendements. Enfin, la réaction de SM avec des acides alkylboroniques a également été étudiée sur l'iodo-peptide-résine. Les résultats obtenus indiquent que l'acide *trans*-2-chlorométhylvinylboronique est facilement couplé tandis que l'acide 2-méthylvinylboronique donne seulement 10% de conversion. Des résultats similaires ont été obtenus pour la modification en phase solide de *N*- α -Boc-[Ala^{1,2,3}, Leu⁸]Enk-résine à la position Phe⁷. Par contre, il semble qu'il y ait un encombrement stérique qui désavantage la réaction de SM lors de modifications à la position Phe⁷. En effet, les conversions obtenues à cette position sont plus basses que celles observées lors des modifications effectuées en position Tyr⁴.

Également, une appréciation plus globale de la stratégie nous est apparue nécessaire et c'est pourquoi des études additionnelles ont ensuite été poursuivies avec des peptides plus complexes, afin de vérifier la compatibilité de la méthode de SM avec des séquences de peptide contenant des acides aminés sensibles tels que la méthionine, la cystéine, l'histidine et le tryptophane. Pour ce faire, des peptides courts contenant les résidus Cys, Met, His ou Trp ont été synthétisés. La réaction s'est bien déroulée avec les peptides contenant Cys, Met ou His. Par contre, la présence de Trp semble être problématique puisque le mélange de peptides après la réaction de SM ne contenait pas le peptide attendu. De plus, un peptide possédant une masse de 34 Da inférieure à celle du produit attendu a été produit. Un résultat similaire a également été obtenu avec le peptide *N*- α -Boc-[Phe(*p*I)¹³]ET-1(9-21). Étant donné que la même réaction secondaire s'est produite en soumettant le peptide *N*- α -Boc-[BiP¹³]ET-1(9-21), il peut être conclu que cette perte de masse s'effectue indépendamment de la présence du résidu Phe(*p*I). La nature et l'endroit où se produit cette modification reste encore à élucider.

En conclusion le développement de conditions de la réaction de SM appropriées à toutes les séquences peptidiques est un objectif des plus importants afin d'augmenter les outils disponibles pour la modification post-synthèse des peptides.

Doan, Ngoc Duc
Etudiant

Alain Fournier
Directeur de recherche

.....

.....

Introduction:

L'utilisation de peptides en tant qu'agents thérapeutiques présente plusieurs avantages. En effet, les peptides sont des molécules qui possèdent une bonne affinité et spécificité tout en possédant un profil de toxicité plus bas que la plupart des petites molécules pharmacologiques. De plus, contrairement aux protéines, les peptides ont une bonne stabilité aux variations de température. Une étude effectuée en 2003 a ainsi montré que plus de 40 peptides thérapeutiques sont actuellement sur le marché, et que de 600 à 700 nouvelles molécules peptidiques sont en évaluation dans des études cliniques ou précliniques [Marx V., 2005]. Leur utilisation n'est pas cependant sans limites de sorte que certains peptides n'ont pu devenir des candidats prometteurs au développement de nouvelles approches thérapeutiques. Premièrement, leur utilisation exige une cible pharmacologique connue. De plus, étant donné leur excrétion rénale rapide et leur manque de stabilité *in vivo* à cause de la dégradation par les protéases, ils affichent une demi-vie courte. Enfin, les peptides ont également un accès limité à l'espace intracellulaire et peuvent contenir des séquences potentiellement immunogènes, surtout pour des séquences peptidiques aléatoires. Donc, afin d'améliorer l'activité biologique, l'affinité envers le récepteur, la stabilité ou une quelconque autre propriété clé d'un point de vue pharmacologique, les études de type structure-activité générant par exemple des bibliothèques d'analogues peptidiques s'avèrent très utiles afin d'optimiser l'utilisation thérapeutique des peptides. [Sewald, N. *et al.* 2002]. Dans cette ligne de pensée, la chimie combinatoire est considérée comme une méthode efficace pour produire des bibliothèques d'analogues ayant un spectre étendu de modifications chimiques.

La réaction de Suzuki-Miyaura s'est avérée une méthode utile en chimie combinatoire pour la construction de liens C-C, étant donné ses nombreux avantages comparativement à d'autres méthodes utilisant des réactifs organométalliques. La réaction de SM consiste le couplage entre un dérivé de l'acide boronique et un halogénure ou un triflate de vinyle ou d'aryle en présence d'un catalyseur de palladium et d'une base. Les principaux avantages de cette réaction sont des conditions de réaction douces, une toxicité moindre pour l'environnement par rapport à la plupart des autres réactifs organométalliques, et la disponibilité commerciale des dérivés de l'acide boronique [Miyaura, N., *et al.* 1995; Suzuki, A. 1999; Suzuki, A. 2002; Miyaura, N. 1998]. Suite au travail original de Suzuki et Miyaura [Miyaura, N., *et al.* 1979; Miyaura, N., *et al.* 1985], la réaction a été employée à plusieurs occasions en synthèse organique et la première application de la réaction SM dans l'industrie pharmaceutique fut la synthèse du Losartan, un antagoniste non-peptidique du récepteur de l'angiotensine II [Larsen, RD *et al.* 1994]. Depuis, cette réaction a été également utilisée comme étape principale dans la préparation d'inhibiteurs de la COX-II, tels le Rofecoxib et l'Etorocoxib, dans la synthèse de l'acétate stéroïdal de l'abiratérone, un inhibiteur efficace du cytochrome humain P450_{17 α} [Anthony O. King, *et al.* 2004], pour les synthèses totales d'alcaloïdes divers [Furstner, A., *et al.* 2006], et pour la construction de la vancomycine [Nicolaou, KC. *et al.* 1998].

De plus, la réaction de SM a été utilisée pour produire des acides aminés non-naturels qui peuvent être ensuite incorporés dans des peptides afin de produire des molécules originales. Par exemple, Collier *et al.* [Collier, P. N. *et al.* 2001; Collier, P. N. *et al.* 2000] ont constaté que la réaction de SM peut permettre d'obtenir avec de bons rendements une vaste gamme d'acides aminés non naturels à partir de l'homoalanine. Similairement,

Zhang *et al.* ont utilisé la réaction de SM afin d'obtenir des acides aminés indoligidione qui sont des structures mimant les coudes β [Zhang, J. *et al.* 2002]. Également, Nakamura *et al.* [Nakamura, H. *et al.* 2000] ont développé une méthode pratique faisant appel à la réaction de SM pour la synthèse énantiomérique de la 4-borono-L-phénylalanine qui peut ensuite servir de dérivé pour une autre réaction de SM afin de produire des phénylalanines 4-aryliques non protégés. [Gong, Y.; He, W. 2002].

Récemment, la modification de peptides basée sur la réaction de SM a été étudiée par Kotha et Lahiri [Kotha, S. *et al.* 2001; Kotha, S. *et al.* 2003]. Leur étude a évalué la production en solution de peptides modifiés sur la chaîne latérale de la phénylalanine en partant d'un résidu 4-iodo-phénylalanine pour effectuer la réaction de SM. Aussi, des protéines ont été modifiées par l'intermédiaire de la réaction de SM effectuée en milieu aqueux [Ojida, A. *et al.* 2005]. Toutefois, malgré toutes ces démonstrations de l'usage de la réaction de SM, il y a seulement une étude récemment rapportée dans la littérature montrant l'utilisation de cette réaction afin de modifier un tripeptide lors de la synthèse en phase solide [Haug BE. *et al.* 2007].

La synthèse organique en phase solide (SOPS) est largement utilisée pour la production de bibliothèques de molécules organiques par chimie combinatoire. En fait, la synthèse en phase solide présente plusieurs avantages par rapport aux méthodes de synthèse en solution : le rendement est élevé grâce à l'utilisation de réactifs en excès et ceux-ci, de même que leur sous-produits, peuvent être simplement enlevés par lavage et filtration du support solide avec du solvant. Les pertes sont minimisées lors de longues synthèses puisque le produit dérivé n'a pas besoin d'être isolé par précipitation à chaque étape de la

synthèse, et le processus peut facilement être automatisé [Thompson, L.A.. *et al.* 1996]. Ainsi, plusieurs groupes de recherche ont investi des efforts pour transférer à une stratégie sur support solide des méthodes de synthèse initialement développées pour la phase liquide. À cet égard, la SOPS est devenue la méthode de choix pour la synthèse de presque toutes les sortes de peptides depuis son développement par Merrifield en 1963.

L'objectif de notre travail a été de vérifier l'applicabilité de la réaction de SM à la synthèse peptidique en phase solide. À cet égard, le peptide [Ala^{1,2,3}, Leu⁸]Enképhaline a été choisi comme un modèle simple pour effectuer des modifications en position Tyr⁴ ou Phe⁷. L'optimisation de la réaction a d'abord été étudiée en modifiant le peptide à la position Tyr⁴. Puis, la réaction de SM en phase solide a été appliquée en utilisant les conditions optimisées afin de synthétiser une librairie d'analogues de [Ala^{1,2,3}, Leu⁸]Enk modifiés à la position Tyr⁴ ou Phe⁷. De plus, l'applicabilité de la réaction de SM à la modification en phase solide de peptides contenant des résidus sensibles comme Cys, Met, His ou Trp a également été évaluée. Pour ce faire, le fragment 9-21 de l'endothéline-1 lié à un support solide a été choisi comme modèle dans lequel le résidu Tyr¹³ a été remplacé par Phe(*p*-I). Ensuite, la réaction de SM a été effectuée en appliquant les conditions optimales déterminées pour [Ala^{1,2,3}, Leu⁸]Enk.

Chapitre 1 : Revue de la littérature

1.1 : Synthèse et modifications de peptides

1.1.1 : Informations générales

Les peptides sont des molécules constituées d'une chaîne d'acides aminés dont le nombre est inférieur à 100. Ils peuvent être isolés par extraction à partir d'une source naturelle, obtenus par synthèse chimique ou par l'utilisation de micro-organismes recombinants. Jusqu'ici, bon nombre des approches thérapeutiques au moyen de peptides ont été développées au moyen de molécules de source naturelle. Les peptides possèdent généralement des propriétés biologiques relativement spécifiques (Watt PM. 2006). Ainsi, ils peuvent être utilisés en tant qu'agonistes ou antagonistes efficaces pour plusieurs récepteurs impliqués dans la progression de différentes pathologies. Par exemple, le GLP-1 (glucagon-like peptide-1) est utilisé dans le contrôle du diabète, la ghreline possède des propriétés permettant le traitement de l'obésité, le GRP (gastrin-releasing peptide) est utilisé dans le traitement de cancers, et la défensine s'est révélée être un agent antimicrobien efficace.

L'utilisation de peptides en tant qu'agents thérapeutiques présente donc plusieurs avantages. En effet, les peptides sont des molécules qui possèdent une bonne affinité et spécificité tout en ayant un profil de toxicité plus bas que la plupart des petites molécules pharmacologiques. De plus, contrairement aux protéines, les peptides sont plus stables aux variations de température. Par contre, leur utilisation est limitée. Ainsi, actuellement, seuls les peptides bioactifs ayant des cibles biologiques bien précises sont une source d'approches thérapeutiques. De plus, leur demi-vie *in vivo* est courte étant donné leur

élimination rénale rapide et leur dégradation par des protéases. Enfin, les peptides n'affichent qu'un accès limité à l'espace intracellulaire et ils peuvent contenir des séquences potentiellement immunogènes. Néanmoins, dès 2003, on identifiait sur le marché plus de 40 peptides thérapeutiques, et quelques 600 à 700 peptides étaient à des étapes d'études cliniques ou précliniques (Marx V. 2005).

1.1.2 : Formation des liens amides

Les amides sont des groupes fonctionnels les plus fréquemment retrouvés chez les molécules biologiquement actives ; ils forment les connexions chimiques principales des protéines, généralement identifiées comme la liaison peptidique. En plus de la présence répandue des fonctions amides dans une variété de petites molécules biologiquement actives, l'utilisation de plus en plus efficace de peptides en tant qu'agent thérapeutique a créé le besoin d'avoir des méthodes efficaces de synthèse de ces liens amides et pour la production chimique des peptides.

Les amides sont généralement formés par le couplage d'acides carboxyliques et d'amines. Cette approche est utilisée autant dans la synthèse chimique que dans les systèmes biologiques pour la synthèse de peptides ou de protéines. En milieu aqueux neutre, la réaction d'un acide carboxylique et d'une amine est un processus thermodynamiquement défavorable. C'est pourquoi, en synthèse chimique, l'acide carboxylique doit être traité avec une quantité stœchiométrique d'un réactif, normalement un réactif de déshydratation, pour produire un ester actif qui réagit ensuite avec une

amine nucléophile. Ce processus produit un lien amide, avec des quantités stœchiométriques de sous-produits de réactifs de couplage.

1.1.2.1. Carbodiimides

Les carbodiimides ont formé pendant longtemps une classe de réactifs *in situ* parmi les plus populaires de la synthèse peptidique. En fait, le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) a été jusqu'à la fin des années 80, le réactif le plus populaire et constitue un choix particulièrement approprié pour la synthèse sur résine de polystyrène. Généralement, la réaction s'effectue à la température ambiante, dans du dichlorométhane (DCM) puisque ce solvant est un excellent agent de gonflement de la résine de polystyrène, ce qui favorise l'accès aux sites réactionnels lors de synthèse en phase solide. Le diméthylformamide (DMF) peut être ajouté pour augmenter la solubilité des réactifs. Cependant, il ralentit la vitesse de réaction en favorisant la formation d'un produit secondaire inerte, la N-acylurée. Par conséquent, des quantités minimales doivent être employées. La N-hydroxybenzotriazole (HOBT), la 1-oxo-2-hydroxydihydrobenzotriazine (HODhbt), le 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt), le 6-chloro-1-hydroxybenzotriazole (Cl-HOBT) et le dérivé aza du HODhbt ont été également utilisés comme additifs pour améliorer le rendement du couplage.

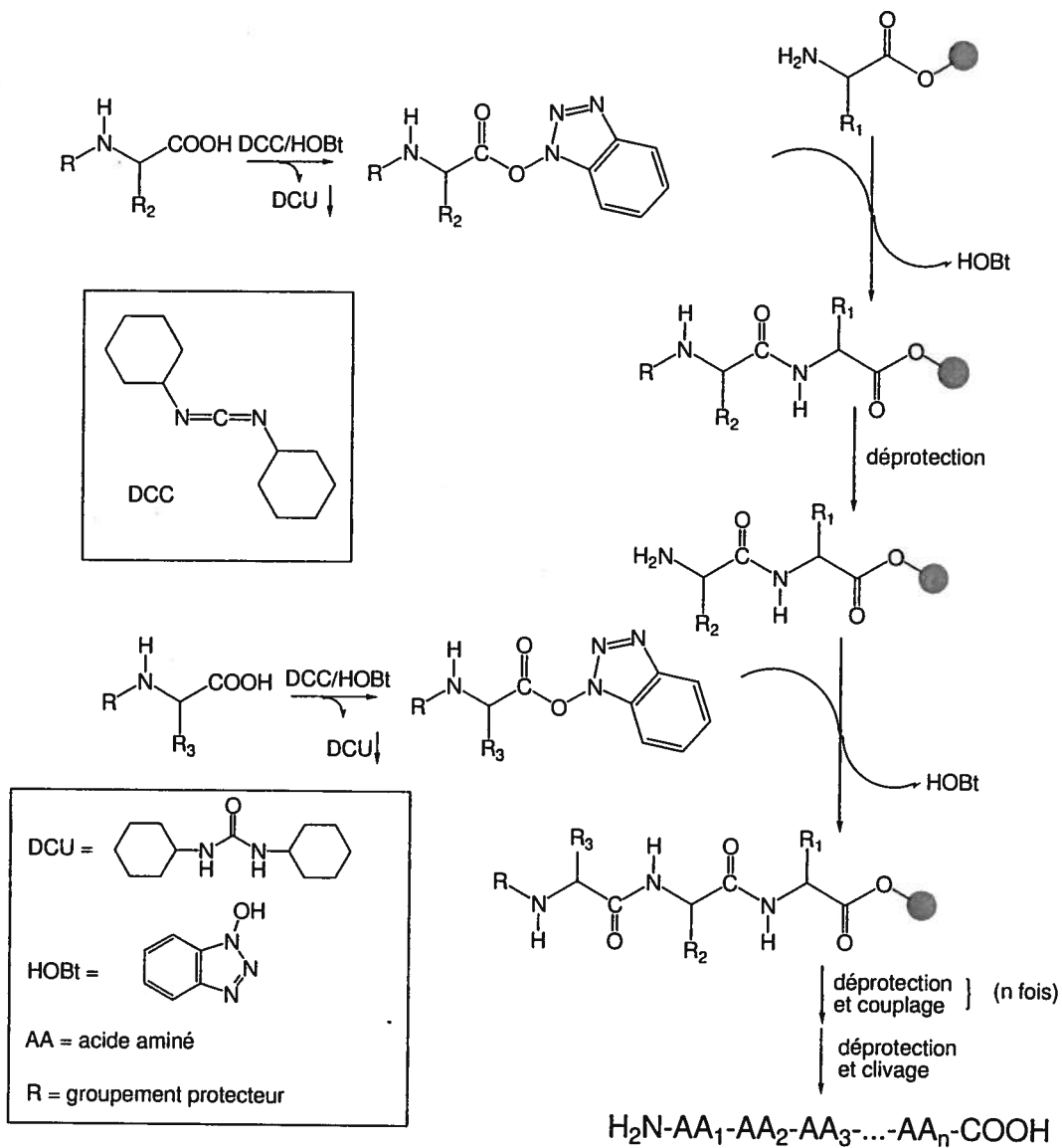


Schéma 1 : Couplage peptidique utilisant le DCC comme réactif lors de synthèse en phase solide.

1.1.2.2. Sels d'onium

Les mêmes esters actifs peuvent être préparés avec des sels d'onium (aminium, uronium ou phosphonium) en présence d'une base. Les systèmes employés le plus fréquemment

sont l'hexafluorophosphate du O-(7-azabenzotriazole-1-yl)-N, l'hexafluorophosphate de N,N,N'-tétraméthyluronium (HATU), l'hexafluorophosphate de 2-(6-chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthylaminium (HCTU), l'hexafluorophosphate de benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium (HBTU), l'hexafluorophosphate de (3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium (HDTU), l'hexafluorophosphate de (3,4-dihydro-4-oxo-5-azabenzo-1,2,3-triazin-3-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium (HDTU), l'hexafluorophosphate de (3,4-dihydro-4-oxo-5-azabenzo-1,2,3-triazin-3-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium (HDATU) et leurs sels correspondants de tétrafluoroborate. L'hexafluorophosphate de [(7-azabenzotriazol-1-yl)oxy]tris-(pyrrolidino)phosphonium (PyAOP) ou l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxytri(pyrrolidino)phosphonium (PyBOP) sont également couramment utilisés [Carpino L, *et al.* 1994 ; Sabatino G., *et al.* 2003 ; Carpino LA., *et al.* 2004]. Les couplages avec des sels d'aminium ou d'uronium, en présence d'une base, se sont avérés plus efficaces que ceux effectués avec des réactifs de phosphonium ou d'un carbodiimide. D'autre part, les réactifs dérivés de sels de phosphonium sont préférés à leurs homologues d'aminium/uronium pour la cyclisation, car ces derniers composés peuvent donner des réactions de guanidilation sur le groupement amine (Albericio F., *et al.* 2001).

1.1.2.3. Sels d'organophosphate et de phosphinyle

De façon similaire, des esters d'organophosphates ou de phosphinyles, tels que le diéthoxyphosphinyloxybenzotriazole de phosphinyle (DepOBt), la 3-(diéthoxyphosphinyloxy)-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazine (DepODhbt ou DEPBT), le diéthoxyphosphinyloxy-7-azabenzotriazole (DepOAt), le 1-[di(o-

tolyl)phosphinyloxy]benzotriazole (DtpOBT), le 1-[di(o-tolyl)phosphinyloxy]-7-azabenzotriazole (DtpOAt), et le 1-[di(o-tolyl)phosphinyloxy]-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazine (DtpODhbt) peuvent être utilisés comme réactif pour la formation du lien amide. Ces dérivés sont plus stables que des sels d'aminium ou de phosponium et leur solubilité dans les solvants organiques, y compris les solvants non polaires tel le DCM, est meilleure. Or, l'utilisation de ce genre de solvant diminue la racémisation et donne habituellement de meilleurs rendements surtout pour effectuer la condensation de segments ou l'acylation des amines N-alkylées.

1.1.2.4. Autres réactifs

Les fluorures d'acides sont des réactifs très commodes pour l'incorporation d'acides aminés encombrés stériquement. Ces fluorures peuvent être préparés et isolés par la réaction des acides aminés protégés avec un fluorure cyanurique ou le trifluorure de (diéthylamino)sulfure (DAST). Alternativement, ils peuvent être produits *in situ* avec l'hexafluorophosphate de tétraméthylfluoroformamidinium (TFFH) (Carpino LA. *et al.* 1995). Dans ce cas, la conversion totale en fluorure est réalisée quand la réaction est effectuée en présence d'un additif anionique de fluorure de polyhydrogène tel que le PTF (Carpino LA., *et al.* 2003). Un autre réactif qui est bien adapté pour l'acylation des dérivés d'amine N-alkylée est le carbonate de bis(trichlorométhyle) (BTC). Les conditions optimales impliquent l'activation avec le BTC dans du tétrahydrofurane (THF), en présence de 2,4,6-triéthylpyridine et de plusieurs équivalents de diisopropyléthylamine (DIEA).

1.1.3. Synthèse peptidique

La méthodologie en phase solide qui a été développée par Bruce Merrifield dans les années 1960, est la méthode de choix pour la synthèse de peptides. Ces avantages sont la rapidité, la simplicité et le rendement élevé. Étant donné que le support solide est complètement insoluble dans tous les solvants utilisés, des lavages par simple filtration permettent de retirer les réactifs, ce qui minimise les pertes physiques, surtout lors de synthèses comportant plusieurs étapes. De plus, l'utilisation de réactifs en excès assure de meilleurs rendements de couplage. En outre, l'efficacité de la réaction de couplage peut être par exemple vérifiée par un test colorimétrique à base de ninhydrine (Kaiser *et al.* 1969). Généralement, la méthode de synthèse peptidique en phase solide est la meilleure stratégie pour la préparation de petits peptides (20-30 acides aminés) (Lloyd-Williams P, *et al.* 1997). Par contre, les peptides plus grands (jusqu'à 60 acides aminés) devraient être synthétisés par une approche convergente, comportant la synthèse de segments peptidiques protégés en phase solide et la combinaison de ces unités en solution.

1.1.4 : Modification des peptides

Au cours des trois dernières décennies, des polypeptides naturels ont été largement étudiés afin de comprendre leur mécanisme moléculaire d'action. Il est apparu que le clivage de peptides par des peptidases est nécessaire pour produire les molécules bioactives et pour les inactiver suite au déclenchement de la cascade de signaux menant à

une action biologique. Ce processus métabolique très efficace représente un défi important à l'utilisation des peptides comme médicaments. Ainsi, les peptides non modifiés ne circulent pas dans le sang pour plus de quelques minutes en raison de la dégradation enzymatique et ont généralement une disponibilité biologique faible dans les tissus et les organes, ce qui limite leur utilité en tant qu'agents thérapeutiques. Le défi est donc d'effectuer des modifications chimiques qui maximisent la stabilité enzymatique et l'activité biologique tout en conservant l'efficacité et la sélectivité du peptide bioactif. Par conséquent, le design rationnel de tels médicaments peptidiques exige de prendre en considération des paramètres biologiques comme le métabolisme, l'absorption et le transport, non seulement par la circulation systémique mais dans les organes spécifiques et au travers des barrières membranaires. Il est également nécessaire d'obtenir des données structurales et d'identifier les parties de la molécule responsables de l'activité biologique. Ces résultats peuvent alors être exploités pour concevoir des molécules efficaces au plan pharmacologique.

Il y a trois groupes principaux de molécules dérivées de peptides : les analogues peptidiques, les pseudo-peptides et les peptidomimétiques. Des peptides contenant les modifications relativement petites et qui ne changent pas le lien peptidique, par exemple la substitution d'acides aminés ou la modification chimique des chaînes latérales, sont appelés analogues peptidiques. Les pseudo-peptides sont des peptides contenant des modifications de la liaison peptidique y compris le remplacement de quelques groupes chimiques. Enfin, les peptidomimétiques sont des molécules organiques qui comportent

des liens autres que la liaison peptidique mais qui imitent l'activité pharmacologique des peptides. Dans ce travail, nous avons focalisé sur la formation d'analogues peptidiques.

1.1.4.1. Modifications aux extrémités amino et carboxy terminales

Dans le sérum ou le plasma, beaucoup de petits peptides sont dégradés principalement par des exopeptidases. Il y a seulement quelques hormones et neuropeptides qui sont naturellement protégés aux extrémités, comme la thyroïdolibérine (TRH) qui contient des groupements α -pyroglutamyle et α -proline-amide aux extrémités amino et carboxy terminales. La plupart des peptides naturels ont leurs extrémités terminales libres et ils sont dégradés rapidement, habituellement en quelques minutes. En conséquence, leur protection est considérée comme une approche stratégique dans le développement des médicaments peptidiques étant donné que ces modifications peuvent augmenter leur stabilité dans le plasma et apporter des changements favorables à leurs propriétés pharmacodynamiques. En fait, beaucoup de méthodes de modification ont été développées dans ce but parmi lesquelles l'acétylation et l'amidation ont permis d'augmenter la stabilité et d'assurer l'activité biologique de différents types de peptide, en particulier des neuropeptides. L'acétylation des amines terminales augmente la lipophilicité des peptides, ce qui peut améliorer la capacité de passage à travers les barrières membranaires, en particulier dans le petit intestin et la barrière hémato-encéphalique (BHE). Bien que la protection de ces extrémités soit employée couramment pour améliorer la stabilité enzymatique, elle empêche rarement la dégradation complète.

Dans la plupart des cas, elle ralentit le métabolisme du peptide, mais la dégradation se produit toujours par l'action plus spécifique des endopeptidases.

1.1.4.2. Cyclisation

Le design d'analogues cycliques représente une autre stratégie employée couramment pour augmenter la stabilité et l'affinité des peptides. La cyclisation confère une contrainte structurale qui réduit la flexibilité conformationnelle et peut augmenter l'affinité, la sélectivité, la stabilité et la disponibilité biologique aussi bien que la perméabilité à la barrière membranaire. Plusieurs stratégies chimiques ont d'ailleurs été développées pour convertir un peptide linéaire en une structure cyclique (Kates SA. *et al.* 1994; Rich DH., *et al.* 1993; Goodman M., *et al.* 1995). La cyclisation peut impliquer les acides aminés situés aux extrémités formant ainsi une seule structure cyclique. Cette méthode est dite "tête-à-queue". Par ailleurs, la cyclisation peut s'effectuer entre les chaînes latérales de deux acides aminés du peptide, ce qui génère une structure moléculaire partiellement cyclique. La nature du lien assurant la cyclisation peut varier selon le groupement chimique impliqué dans la liaison. Ainsi, la liaison entre deux groupements sulfhydryles formera un pont disulfure alors que la liaison entre une amine et un groupement carboxyle sur des chaînes latérales d'acides aminés produira un pont lactame. Enfin, des ponts lactones ou thio-lactones peuvent être formés par des liens entre des groupements carboxyles, hydroxyles ou sulfhydryles.

L'approche la plus commune pour synthétiser un peptide cyclique hétérodétique implique la formation d'un pont disulfure entre deux résidus cystéines. Cette stratégie implique nécessairement l'incorporation des cystéines dans la séquence peptidique. La formation des ponts disulfures dans la synthèse de peptides peut s'effectuer par l'oxydation des thiols protégés ou non (Annis I., *et al.* 1997). De plus, la réaction de cyclisation peut s'effectuer en solution ou sur un support polymérique. Le rendement de la réaction et la pureté des produits dépendent des groupements protecteurs choisis, des conditions précises de la réaction et de la structure du peptide. Généralement, l'oxydation est assurée par la présence d'un oxydant tel l'oxygène (air), le ferricyanure de potassium, l'iode, le DMSO, etc.

La cyclisation par le biais d'un amide, soit pour obtenir une cyclisation "tête-à-queue", soit pour former un pont lactame intramoléculaire, nécessite généralement l'utilisation des réactifs utilisés pour le couplage peptidique. Le rendement de ce type de cyclisation est principalement influencé par la conformation du peptide linéaire initial en solution et la distance entre les résidus choisis. De plus, un choix judicieux des réactifs de couplage peut également améliorer sensiblement le rendement de la cyclisation du peptide. Récemment, avec le développement de la chimie combinatoire, de nouvelles approches ont été étudiées pour effectuer la cyclisation en phase solide. Trois stratégies principales ont été élaborées. Comme montré à la **figure 1**, la première approche consiste à obtenir la déprotection spécifique des groupements amines et carboxyliques de manière à les faire réagir pour former le lien amide alors que le peptide est toujours ancré à son support solide (stratégie A). Une autre approche fait appel à des molécules de liaison

électrophiles pour la liaison de la chaîne peptidique au support solide. La déprotection spécifique d'un groupement amine réagira avec la molécule de liaison électrophile ce qui libèrera la chaîne peptidique de son support tout en ayant généré un peptide cyclique (stratégie B). Enfin, l'atome d'azote du résidu en C-terminal peut servir d'ancrage pour le support solide. Le pont lactame peut alors être effectué entre les groupements amine et carboxylique ciblés du peptide avec une plus grande flexibilité pour le repliement de la molécule (stratégie C).

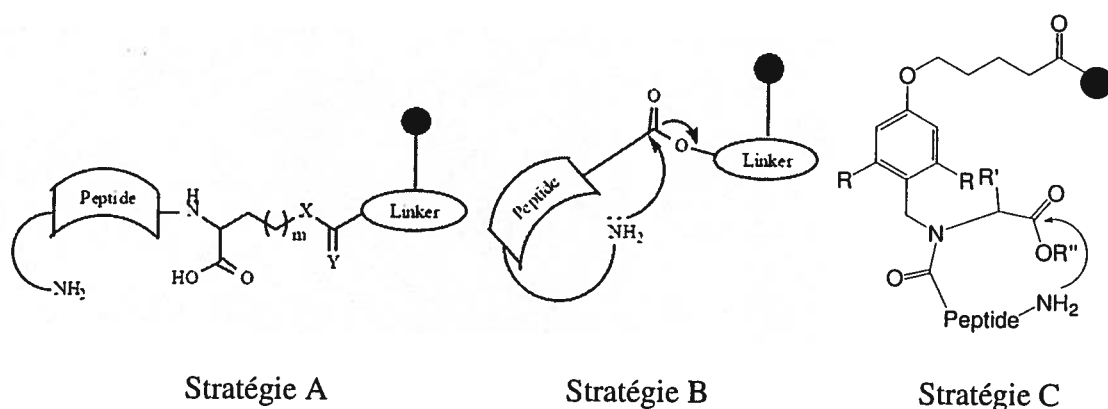


Figure 1 : Trois stratégies principales d'effectuer la cyclisation en phase solide.

1.1.4.3. Alkylation de l'azote du lien amide

La méthylation de l'azote d'un amide est l'une des modifications les plus utilisées pour améliorer la stabilité de peptides parce qu'elle peut empêcher la dégradation par des endopeptidases spécifiques. Cependant, la N-alkylation d'un lien amide induit une restriction dans la flexibilité conformationnelle d'un peptide. De plus, elle empêche la formation de ponts hydrogènes et favorise la conformation *cis* du lien amide.

1.1.4.4. Changements de chiralité

Dès les débuts de la chimie peptidique, la sélectivité stéréochimique des structures peptidique a été un élément d'intérêt majeur pour la recherche scientifique. La spécificité stéréochimique des protéines naturelles qui ne contiennent que des énantiomères d'acides aminés de configuration L, est importante pour l'identification et l'interaction entre les molécules. Le remplacement d'une partie ou même de tous les acides aminés L d'une séquence de peptide par les acides aminés de configuration D correspondants peut conférer une résistance à la dégradation protéolytique. De plus, il s'est avéré que les acides aminés D sont moins immunogènes que leurs homologues de configuration L [Gill TJ., *et al.* 1963 ; Borek F. *et al.* 1965). Par contre, les changements conformationnels associés à l'utilisation de ces acides aminés vont fréquemment causer une diminution voire une perte d'activité biologique.

Une autre stratégie prometteuse pour le développement d'analogues peptidiques comportant des propriétés biologiques utiles est la synthèse des peptides rétro-inverses. Il s'agit d'inverser simultanément la séquence et de changer la chiralité des acides aminés (Chorev M., *et al.* 1995 ; Chorev M., *et al.* 1993). Structurellement, le peptide rétro-inverse est beaucoup plus semblable au peptide original qu'un simple analogue de configuration D.

1.1.4.5. Modification de la chaîne latérale

La modification de la chaîne latérale des acides aminés impliqués dans le site d'identification d'une protéase est une approche simple pour augmenter la stabilité biologique d'un peptide. Il s'agit de modifier le site d'identification par l'enzyme pour empêcher le clivage en restant le plus proche possible de la séquence originale pour préserver l'activité du peptide. Pour ce faire, un acide aminé non naturel peut être introduit dans la chaîne peptidique mais cela peut également produire des modifications dans les structures secondaires et tertiaires du peptide avec comme conséquence une perte d'affinité. La modification d'un acide aminé naturel, par la méthylation ou l'halogénéation, peut également être utilisée à cette fin. Par exemple, l'incorporation d'un atome de chlore dans le noyau aromatique de la phénylalanine à l'extrémité N-terminale d'analogues de l'enképhaline a augmenté significativement la capacité de passer à travers le BHE (Weber SJ., *et al.* 1993, Weber, SJ., *et al.* 1991). La phénylalanine peut aussi être modifiée par introduction sur le cycle aromatique, d'hétérocycles, de groupements alcènes ou aryles, et de groupements fonctionnels comme -NH₂, -NO₂, -COOH, -CHO. De plus, la modification des groupements fonctionnels situés sur les acides aminés Cys, Lys, Arg, Asn, Asp, Ser, Thr et Tyr peut amener parfois des changements favorables aux propriétés pharmacologiques des peptides.

L'introduction de groupements phosphates sur les chaînes latérales de peptides a d'ailleurs permis l'étude de la phosphorylation et de la déphosphorylation des protéines et d'ainsi déterminer la spécificité de la séquence d'acides aminés des protéines phosphatases (Blaydes JP., *et al.* 2000). Cette modification peptidique peut s'effectuer selon deux méthodes : la phosphorylation globale ou le principe de construction

modulaire. La phosphorylation globale, également connue sous le nom de phosphorylation post-assemblage, implique la synthèse d'un peptide dans lequel la sérine, la thréonine, ou la tyrosine à être phosphorylée est incorporée sans protection de la chaîne latérale. La phosphorylation est alors accomplie par un traitement du peptide avec un phosphorochloridate dialkyle ou diaryle ou avec une phosphoramidite. Dans le principe de construction modulaire, le phosphate est incorporé à un acide aminé *N*- α -protégé qui est alors incorporé à la chaîne croissante du peptide.

La glycosylation est une autre modification importante des chaînes latérales des protéines. La présence des oligosaccharides, de par leur grand nombre de groupes interactifs (-NHCOCH₃, -OH, -O-, -COOH), engendre des ponts hydrogènes ou des interactions ioniques, ce qui contribue à la stabilisation de la structure tridimensionnelle de la protéine. Les glycopeptides peuvent donc servir d'outils structuraux des protéines glycosylées. De plus, les glycopeptides peuvent présenter des propriétés de solubilisation et de transport différentes de celles de la molécule initiale. Généralement, les glycopeptides sont préparés en introduisant l'acide aminé glycosylé pendant l'élongation de la chaîne peptidique en phase solide.

1.2. Couplage de Suzuki et applications

1.2.1: Réaction de Suzuki-Miyaura

Les réactions par lesquelles de nouvelles liaisons carbone-carbone sont formées sont des étapes déterminantes dans la construction de molécules complexes, telles les molécules

bioactives et les produits pharmaceutiques et agrochimiques. Elles sont également essentielles dans le développement d'une nouvelle génération de matériaux organiques présentant des propriétés électroniques, optiques ou mécaniques spécifiques et pouvant être utilisés dans le secteur des nanotechnologies. Depuis les 40 dernières années, les méthodes principales de formation des liaisons carbone-carbone ont fait appel à l'utilisation des métaux de transition pour effectuer les réactions d'une façon contrôlée et sélective. À cet égard, la réaction de Suzuki-Miyaura (SM) est une des méthodes les plus efficaces. Cette réaction est le couplage d'un dérivé de l'acide boronique et d'un halogénure ou triflate de vinyle ou d'aryle, en présence d'un catalyseur de palladium et d'une base (**Schéma 2**). Cette méthode présente plusieurs avantages: des conditions douces de réaction, une toxicité moindre pour l'environnement par rapport à la plupart des autres réactifs organométalliques, et la disponibilité commerciale des dérivés de l'acide boronique. De plus, l'élimination des sous-produits contenant le bore et les manipulations nécessaires afin de réaliser la réaction sont simples et facilement applicables à des protocoles de synthèse à grande échelle. D'ailleurs, la réaction de SM a fortement retenu l'attention des chimistes au cours de dernières années étant donné que les conditions développées pour cette réaction sont favorables à la synthèse industrielle des produits pharmaceutiques et chimiques de haute qualité.

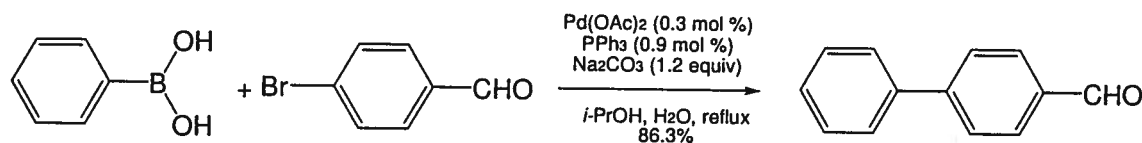


Schéma 2: Couplage entre l'acide phénylboronique et le 4-bromo-benzaldéhyde selon les conditions de la réaction de Suzuki-Miyaura.

Mécanisme de la réaction :

Le couplage des organoboranes impliquerait un cycle catalytique en trois étapes: (1) l'addition oxydante du carbone électrophile au PdL_2 , où L est normalement un ligand de phosphine comme PPh_3 , (2) la transmétallation d'un carbone nucléophile du bore au $\text{R}'\text{PdXL}_2$, et (3) l'élimination réductrice rapide du produit d'interconnexion avec la régénération du catalyseur PdL_2 (**Schéma 3**) [Farina V., *et al.* 1997]. Le schéma est une version simplifiée d'un processus chimique complexe qui, encore aujourd'hui, n'est pas tout-à-fait compris.

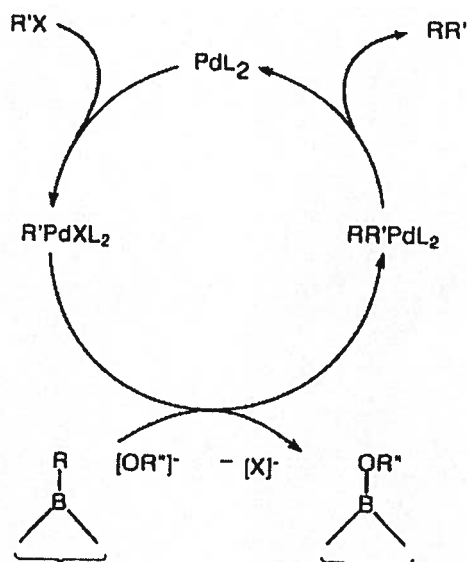


Schéma 3: Cycle catalytique du couplage de Suzuki-Miyaura (Le schéma est extrait de Matos K. *et al.* 1998).

L'addition oxydante au complexe de palladium(0) forme un complexe stable de *trans*- σ -palladium(II). Cette étape détermine la vitesse du cycle catalytique et la nature du groupement X fait varier la vitesse relative de la réaction selon l'ordre suivant : $\text{I} > \text{OTf} >$

Br >> C1 [Miyaura N., Suzuki A. 1995]. L'étape d'élimination réductrice permettant la régénération du complexe de palladium(0) ne se produit qu'en présence de *cis*-RR'PdL₂, donc le *trans*-RR'PdL₂ doit préalablement subir une isomérisation. De plus, la nature des groupements R et R' influence la vitesse de la réaction selon l'ordre suivant : diarchie > (alkyle) aryle > dipropyle > diéthyle > diméthyle. Ceci suggère alors, la participation de l'orbitale n du groupe aryle pendant la formation de la liaison. Enfin, les ligands ayant un bon pouvoir de dissociation facilitent également l'accomplissement de cette étape finale du cycle catalytique [Miyaura N., Suzuki A. 1995].

Bien que les mécanismes réactionnels de l'addition oxydante et de l'élimination réductrice soient raisonnablement bien compris, étant donné que ce sont des processus fondamentalement communs pour tous les types de réaction d'interconnexion faisant l'utilisation d'organométalliques, l'étape de transmétallation est par contre moins connue. En effet, le mécanisme de cette étape dépend fortement des agents organométalliques et des conditions réactionnelles utilisées. Néanmoins, différents processus de transmétallation des composés organoboroniques avec des halogénures de palladium ont été proposés pour des conditions basiques ou neutres. Les mécanismes réactionnels proposés pourraient impliquer une quaternisation de l'atome de bore en milieu basique pour augmenter la nucléophilicité du groupement organique qui formera le lien carbone-carbone. La participation d'un complexe intermédiaire palladium/base lors de la réaction d'interconnexion ainsi que le transfert aisé des groupements organiques des composés organoboroniques aux complexes de Pd(0) en conditions neutres a également été suggéré.

Toutefois, le mécanisme qui est prédominant lors des réactions de SM n'a pas encore été élucidé.

Conditions réactionnelles

Catalyseurs :

Le catalyseur qui devra être utilisé pour effectuer la réaction de SM doit être choisi adéquatement. En effet, il est important de prendre en considération la force de réactivité du catalyseur, sa propension à favoriser des réactions secondaires et son coût en fonction de la facilité à le régénérer et à le récupérer.

$\text{Pd}(\text{PPh}_3)$ est le catalyseur le plus communément utilisé lors de la réaction de SM. Toutefois, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ seul ou avec un ligand de phosphine, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ et $\text{PdCl}_2/\text{phosphine}$ sont également utilisés afin de générer un catalyseur palladium(0) étant donné qu'ils sont facilement réduits *in situ*. Plusieurs ligands de phosphine sont efficaces afin de stabiliser le Pd(0) mais la stœchiométrie, la grosseur ou la capacité à donner des électrons peut changer l'activité des catalyseurs envers l'addition oxydante et la transmétallation.

Par exemple, les triarylyphosphines sont des ligands efficaces pour le couplage de SM des iodures organiques, des bromures, et des triflates, mais leur réaction avec les chlorures est très lente [Portony M, Milstein D 1993]. Des ligands fortement électro-donneurs ou

encombrés stériquement, comme le $P(t\text{-Bu})_3$ et le 2-(di-t-butylphosphino)biphényle peuvent surmonter cet obstacle [a) Old DW, *et al.* 1998; b) Wolfe JP, *et al.* 1999].

Les carbènes N-hétérocycliques nucléophiles représentent une classe de ligands ayant des propriétés électroniques et stériques réglables. En fait, le succès de ces ligands réside dans la formation de liaisons de coordination fortement liés avec le palladium, ce qui défavorise la formation de palladium noir [Weskamp, *et al.* 1999]. De plus, la densité électronique de ces ligands facilite l'addition oxydante et leur volume stérique favorise la formation d'espèces catalytiquement actives de monocarbène-palladium, ce qui supporte l'élimination réductrice [Grasa, G. A. *et al.* 2002]. Par contre, les carbènes N-hétérocycliques sont sensibles à l'air et à l'humidité. L'utilisation des chlorures correspondants pouvant être déprotonés *in situ*, permet d'éviter ce problème. De plus, ces sels sont disponibles commercialement.

Récemment, il y a eu un intérêt considérable pour le développement de nouveaux catalyseurs avec haute activité, pouvant être utilisés en petite quantité dans des réactions de SM. À cet égard, les complexes de palladacycle ont prouvé leur utilité par leur bonne activité et leur stabilité à la chaleur et à l'air, ce qui permet leur recyclage et leur usage à répétition [a) Herrmann, W. A. *et al.* 1999 ; b) Dupont, J. *et al.* 2001].

Afin de faciliter la récupération du catalyseur, des systèmes catalytiques de palladium hydrosolubles ont été développés. Ceux-ci fonctionnent dans un système biphasique, ce

qui permet une séparation directe des produits organiques résultant de la réaction de SM comparativement aux protocoles utilisant la catalyse homogène.

En 1994, Wallow et Novak [Wallow, T. I. *et al.* 1994] ont montré que les ligands de phosphine peuvent limiter l'activité catalytique du palladium dans certains couplages de SM. De fait, les réactions secondaires associées aux réactions de SM, c'est-à-dire les échanges aryle-aryle et la formation de sels de phosphonium, peuvent être surmontées par l'utilisation du palladium sans ligand. De plus, celle-ci permet même d'augmenter les rendements tout en travaillant dans des conditions réactionnelles plus douces, de diminuer le temps de réaction et finalement de générer moins de produits secondaires [Miyaura, N. 2002].

L'utilisation de plusieurs autres types de catalyseur de palladium a été également démontrée dans la littérature [Bellina F. *et al.* 2004]. Bien que chacun possède des propriétés réactionnelles offrant des avantages certains, il est encore nécessaire de développer des catalyseurs plus efficaces et peu coûteux pouvant fonctionner dans des conditions douces.

Bases et solvants

La réaction d'interconnexion des acides organoboroniques exige généralement la présence d'une base chargée négativement, telle que le carbonate, le phosphate, ou l'hydroxyde de sodium ou de potassium, pouvant être utilisée en solution aqueuse ou en

suspension dans divers solvants organiques (toluène, dioxane, DME ou DMF). Dans ce dernier cas, c'est-à-dire lorsqu'une suspension de la base est utilisée, un agent de transfert de phase tel le Bu_4NX , où X représente I ou Br, est habituellement ajouté au mélange réactionnel afin d'assurer le succès du couplage de SM. Le choix de la base doit être effectué en fonction de l'acide boronique utilisé car les propriétés physicochimiques de la base vont faire varier les rendements de la réaction. En effet, la solution aqueuse de Na_2CO_3 , une base faible, est efficace dans la réaction de couplage biarylique des acides arylboroniques. Cependant, l'efficacité de la réaction entre l'acide mésitylboronique et l'iodobenzène varie en fonction de la base selon l'ordre suivant : $TiOH > Ti_2CO_3 \sim Ba(OH)_2 > NaOH > K_3PO_4 > Na_2CO_3 > NaHCO_3$ [Watanabe T, *et al.* 1992; Anderson JC, *et al.* 1997]. Par contre, le $Ba(OH)_2$ a été identifié comme la meilleure base pour la synthèse des dérivés biaryliques 2,6,2-trisubstitués à partir des ortho-dihaloarènes ou des acides arylboroniques [a) Watanabe T, *et al.* 1992 ; b) Saito S, *et al.* 1997; Schoevaars AM, *et al.* 1997; c) Bringmann G, *et al.* 1998; d) Hoye TR, *et al.* 1999]. D'autre part, la réaction d'interconnexion des acides 1-alcénylboroniques avec des 1-halo-1-alcènes exige une base relativement plus forte que celle utilisée pour les acides arylboroniques [a) Miyaura N, *et al.* 1985 ; b) Miyaura N. and Suzuki A. 1990]. Le choix de la base est d'autant plus crucial que des difficultés peuvent être rencontrées durant la réaction en relation avec la solution basique utilisée. En effet, la saponification des esters, la racémisation des composés optiquement actifs, la condensation d'aldol des composés carbonyles et le clivage hydrolytique de la liaison B-C sont des réactions secondaires associées à l'utilisation d'une base non appropriée pour la réaction. Ces difficultés peuvent être surmontées par l'utilisation d'une base hétérogène. Par exemple, les esters

peuvent rester intacts avec des systèmes biphasés utilisant le NaOH aqueux et le toluène [Kawanaka Y, *et al.* 1996], ou le $K_3PO_4 \cdot nH_2O$, ou le Cs_2CO_3 en suspension dans du DMF, du dioxane ou du toluène [Miyaura N, *et al.* 1989]. Cependant, la présence d'eau ou l'utilisation des bases inorganiques hydratées est préférable puisque la réaction est considérablement accélérée [Johnson CR, and Braun MP., 1993]. Les sels de fluor, tels le CsF et le Bu_4NF peuvent également être utilisés pour le couplage des substrats sensibles aux bases [Wright SW, *et al.* 1994]. Récemment, Yasuike *et al.* [Shuji Yasuike, *et al.* 2007] ont développé une réaction s'apparentant au couplage de SM mais ne faisant pas l'utilisation d'une base entre des diacétates pentavalents de diacétates de triarylantimoine et des acides boroniques formés. De plus, en 2006, le groupe de Zhou [Jie Yan, *et al.* 2006] a réalisé un couplage de SM entre le tétraphénylborate de sodium et des sels hypervalents d'iodonium en milieu aqueux en utilisant l'irradiation par micro-ondes et ce sans avoir recours à une base et à un catalyseur. Ainsi, une méthode alternative pour la formation des liens carbone-carbone a été élaborée offrant un temps de réaction court et de bons rendements.

Réactions secondaires

Les triarylphosphines forment d'excellents ligands pour stabiliser le catalyseur de palladium pendant le cycle catalytique. Cependant, un échange indésirable entre les deux peut s'effectuer menant au couplage des groupements du ligand lié au catalyseur plutôt qu'au dérivé de l'acide boronique. Un exemple de cette réaction secondaire est donné au Schéma 4 :

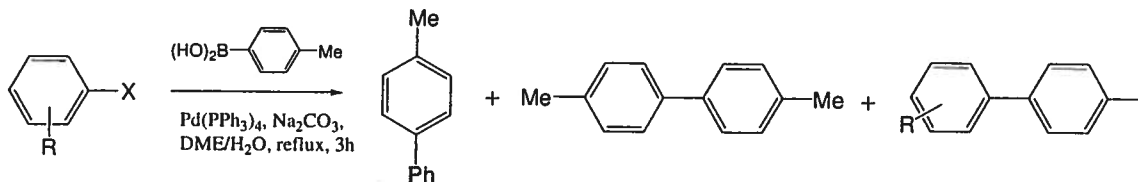


Schéma 4: Formation de produits secondaires lors de la réaction de SM impliquant l'utilisation d'un ligand de triphénylphosphine.

Cet échange aryle-aryle est extrêmement sensible aux effets électroniques et stériques du ligand de phosphine et des haloarènes [a) Goodson FE, *et al.* 1997; b) Goodson FE, *et al.* 1998; c) Grushin VV, 2000]. En effet, la présence d'un groupement électro-donneur dans le ligand de phosphine ou au niveau de l'haloarène favorise l'échange aryle-aryle alors qu'un groupement électro-attracteur ou offrant un obstacle stérique défavorisera cette réaction secondaire. De plus, la présence d'un groupement en position *ortho* de l'acide arylboronique ou de l'haloarène peut réduire cette réaction secondaire. La réaction secondaire caractérisée par l'échange aryle-aryle est représentée au schéma 5 suivant :

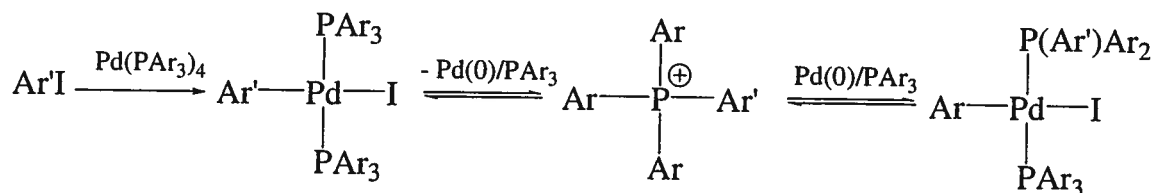


Schéma 5 : Échange aryle-aryle

Les résultats indiquent que l'encombrement stérique a un impact plus important que le caractère électro-donneur du ligand de phosphine du catalyseur de palladium sur le rapport des espèces formées lors de la réaction de SM. Ainsi, des ligands de phosphine électro-donneurs avec un encombrement stérique important sont généralement

recommandés car ils favorisent une addition oxydante rapide des halogénures organiques. D'ailleurs, l'échange arylique se produit avant la transmétallation.

Une autre réaction secondaire associée à la réaction de SM est l'homo-couplage. Le Schéma 6 représente le mécanisme proposé pour cette réaction ainsi que les produits formés :

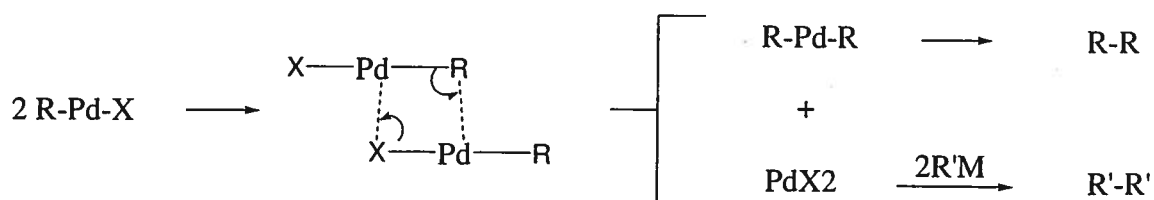


Schéma 6 : Réaction d'homo-couplage catalysée par le palladium [Miyaura N. 2002]

En fait, cette réaction secondaire semble être accélérée par la présence d'oxygène. Quand le mélange réactionnel est exposé à l'air, l'acide arylboronique est aisément transformé en un biaryle par la réaction d'homo-couplage. Cette réaction est lente dans des conditions neutres, et rapide en présence d'une base aqueuse. De même, des diènes symétriques peuvent être obtenus en présence d'un catalyseur de Pd(OAc)₂ et du Cu(OAc)₂, comme l'ont démontré Miyaura et Suzuki par la dimérisation de 1-alcénylboronates (Schéma 7) [Miyaura, N.; Suzuki, A. 1987]. Des biaryles symétriques peuvent être obtenus à partir des acides arylboroniques (Schéma 8).

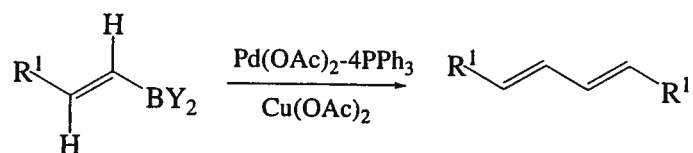


Schéma 7 : Dimérisation de l'acide 1-alcénylboronique

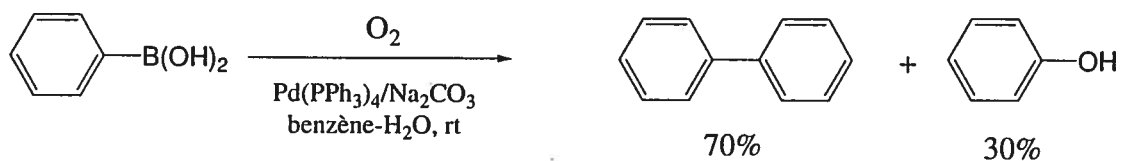


Schéma 8: Homo-couplage en présence d'oxygène

Une réaction d'alkoxycarbonylation peut également avoir lieu sur les acides boroniques en présence de monoxyde de carbone et d'un catalyseur de palladium (Schéma 9). [a] Miyaura N, *et al.* 1989 ; b) Ishiyama, T. *et al.* 1992].

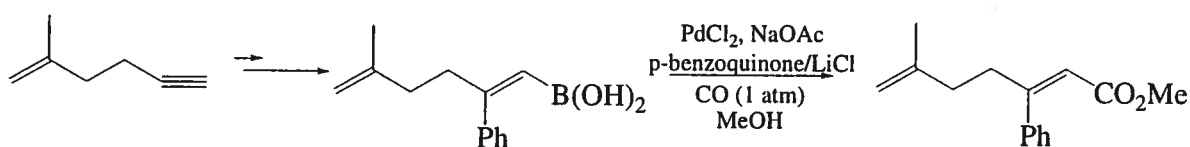


Schéma 9: Exemple de la réaction de l'alkoxycarbonylation

La formation d'un autre type de produit secondaire peut également avoir lieu par la réaction de Heck, laquelle implique généralement des organométalliques faiblement nucléophiles, tels que les silanes (Schéma 10). Ce phénomène a d'ailleurs été observé par l'équipe de Miyaura [a) Miyaura, N. *et al.* 1979 ; b) Miyaura N, *et al.* 1985] lors du couplage du (E)-1-hexényl-1,3,2-benzodioxaborole et l'iodobenzène (Schéma 10)

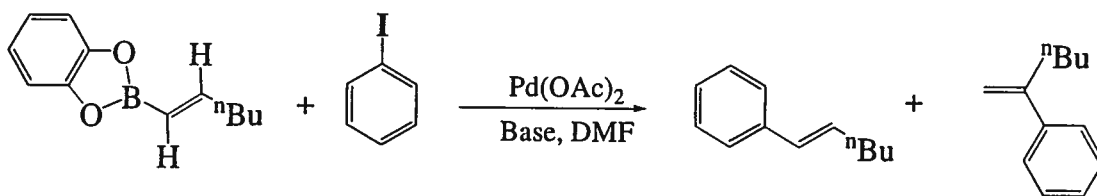


Schéma 10: Formation de produits secondaires par la réaction de Heck

En plus des réactions secondaires décrites ci-haut, le couplage de SM est souvent accompagné par la déhalogénéation des halogénures organiques, en particulier quand de

l'alcool est utilisé comme solvant [Spivey AC, *et al.* 2000], de déamination [Hird M, *et al.* 1999], de déhydrogénation [Lee C-W, Chung YJ, 2000] et de protodéboronation [Kuvilla HG, *et al.* 1961; Kuvila HG, *et al.* 1964; Brown HC, Molander GA, 1986].

Applications de la réaction Suzuki-Miyaura

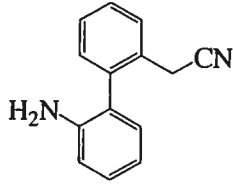
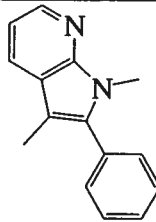
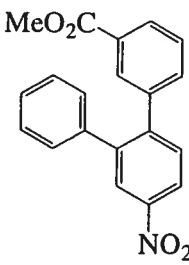
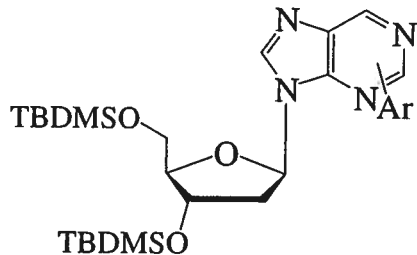
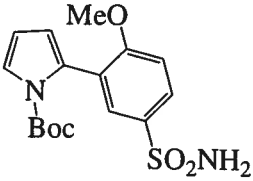
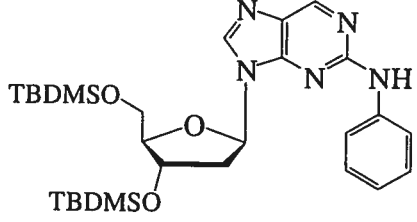
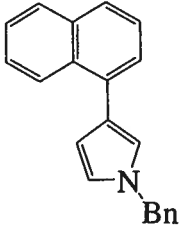
Synthèse de biphényles

L'emploi de la méthode de couplage de SM a augmenté rapidement ces dernières années, en particulier pour la synthèse de molécules contenant des systèmes de biaryles et d'hétéro-biaryles. Les molécules biaryliques jouent un rôle important dans la chimie médicinale. Par exemple, les porphyrines et les métalloporphyrines sont des cibles intéressantes pour les chimistes oeuvrant en synthèse organique, et des chimies bio-inorganique et organométalliques. À cet égard, la réaction de SM s'est avérée être un outil utile pour produire diverses structures de porphyrine [a) Muzzi, C. *et al.* 1999; b) Tse, M. K. *et al.* 2000; c) Yu, L.; Lindsey, J. S. 2001; d) Aratani, N.; Osuka, A. 2001; e) Dai, W.-M.; Mak, W. L. 2000].

Tel que résumé au tableau 1, les systèmes biaryliques encombrés stériquement, **A1**, sont des éléments structuraux importants de plusieurs produits naturels comme le (-)rhazinilam, une substance possédant les propriétés tubuline-liantes uniques, et leur synthèse est relativement facile en utilisant le couplage de SM [a) Baudoin, O. *et al.* 2000; b) Johnson, J. A. *et al.* 2000]. En 2000, Kothare *et al.* ont synthétisé de la même

façon système terphénylique (Tableau 1, A2), qui agit en tant qu'inhibiteur de la farnésyltransférase [Kothare, M. A. *et al.* 2000].

Tableau 1 : Molécules biaryliques synthétisées au moyen de la réaction de SM.

Produit	Structure	Produit	Structure
A1		A5	
A2		A6	
A3		A7	
A4			

Les dérivés aryliques de pyrrole substitués aux positions C-2 et C-5 montrent des propriétés sélectives d'antagoniste du récepteur D3 de la dopamine et les dérivés de pyrrole substitués à la position C-3 se retrouvent souvent dans plusieurs produits naturels. À cet égard, les groupes de Gallagher et de Chung ont rapporté la synthèse de pyrroles

substitués à ces positions (Tableau 1, A3 et A4) par la réaction de SM en utilisant le $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ comme catalyseur [a) Johnson, C. N. *et al.* 1998; b) Lee, C.-W. *et al.* 2000].

Des indoles et azaindoles possédant un groupement aryle substitué sont utilisés comme médicaments antipsychotiques et anti-inflammatoires. A ce sujet, Chi *et al.* ont synthétisé avec succès des dérivés 2-aryliques de 5- et 7-azaindoles A5 (Tableau 1) par une réaction catalysée par le $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ à partir de 2-iodo-3-méthylazaindoles protégés et d'acides arylboroniques [Chi, S. M. *et al.* 2000]. De plus, l'équipe de Lotter [Lötter A.N.C., *et al.* 2007] a réalisé la synthèse de squelettes d'alcaloïdes de dibenzopyrrocoline en utilisant le couplage de SM comme étape principale (Schéma 11).

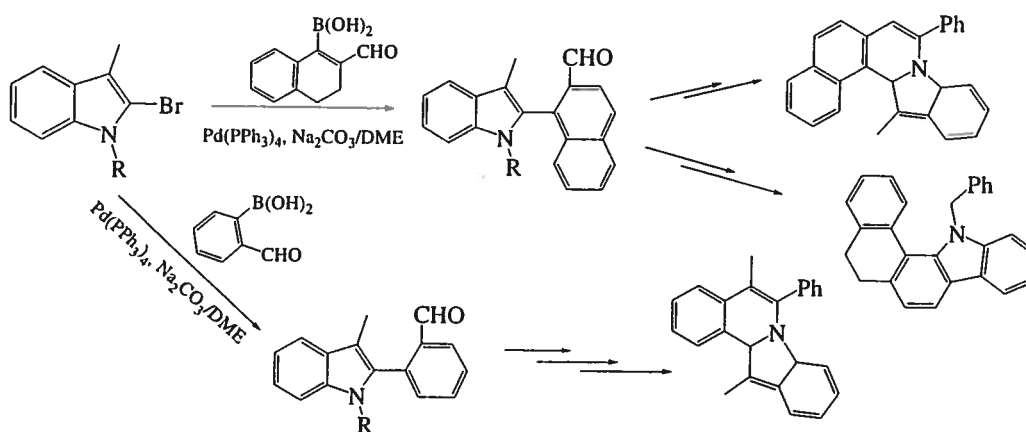


Schéma 11: Synthèse de squelettes d'alcaloïdes de dibenzopyrrocoline

Les purines sont également des composés très importants dans les systèmes biologiques, car elles agissent en tant qu'inhibiteurs de plusieurs récepteurs de protéine et d'enzymes. Lakshman *et al.* ont synthétisé des C-6 et C-2 aryl-2'-déoxynucléosides hydrophobes (A6 et A7, Tableau 1) [a) Lakshman, M. K. *et al.* 2001 ; b) Lakshman, M. K. *et al.* 1999] par

l'intermédiaire d'une réaction de SM entre les halopurines correspondantes, des acides arylboroniques et des arylamines.

Les composés de furfurane possédant un groupement aryle substitué constituent des unités structurales importantes de plusieurs produits naturels. D'ailleurs, même isolés, les dérivés aryliques de furfurane montrent parfois une activité biologique. De plus, des dérivés de furfurane sont également utilisés comme additifs alimentaires. À cet égard, McClure *et al.* [McClure, M. S. *et al.* 2001] ont développé une méthode simple pour synthétiser des dérivés aryliques de furaldéhyde par une réaction catalysée par le PdCl₂ entre des halogénures aryliques et des acides 2-furaldéhyde-boroniques. Par la même méthode, des 5-aryl-2-furaldéhydes ont été synthétisés avec succès en une seule étape en utilisant la réaction de SM [McClure, M. S. *et al.* 2001].

Au cours des dernières années, des dérivés aryliques de pyridine sont devenus une classe des composés jouant un rôle important en chimie médicinale et en science des matériaux. Récemment, la synthèse du système biaryle C-D de la streptonigrine, un agent antinéoplasique, a été effectuée selon un protocole utilisant la réaction de SM (Schéma 12) [McElroy WT. *et al.* 2006]

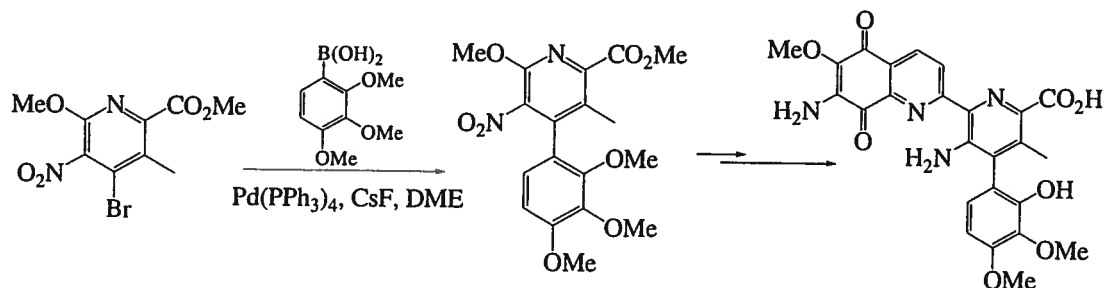


Schéma 12 : synthèse de la streptonigrine

De même, en 2005, le groupe de Kumar a utilisé le couplage de Suzuki comme étape principale dans la synthèse de dérivés 2-arylbenzothiazoles (Schéma 13). Ces dérivés sont à la base de composés utilisés comme agents antitumoraux, antituberculeux, antiparasitaires, antagonistes de canaux calciques, agents chimioluminescents et photosensibilisateurs [Majo VJ. *et al.* 2003].

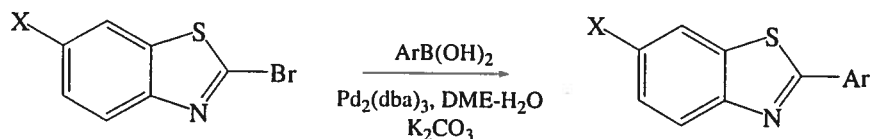


Schéma 13 : synthèse de 2-arylbenzothiazoles

Système de biphénylène et de binaphthyle :

Les composés biphénylènes (paraphénylènes) et leurs homologues sont des éléments structuraux importants des cristaux liquides, des composés fluorescents, et des polymères de circuits électroniques. De plus, les composés hétéroaryliques sont utiles en chimie de coordination et dans la catalyse asymétrique. En conséquence, le développement de méthodes simples pour la synthèse des biphénylènes est un atout et la réaction de SM est un outil utile pour assembler ces systèmes. En fait, plusieurs équipes de recherche ont utilisé la réaction de SM comme étape principale dans la synthèse des polymères semi-conducteurs, et luminescents. Par exemple, en 2000, l'équipe d'Anderson a publié une méthode de synthèse de polyrotaxanes, des polymères semi-conducteurs et luminescents utilisés en nanotechnologies, *via* le couplage de SM, entre l'ester 4,4'-

biphényldiboronique et l'acide 4,4'-diiodobiphényl-2,2'-dicarboxylique (Schéma 14)

[Taylor, P. N. *et al.* 2000].

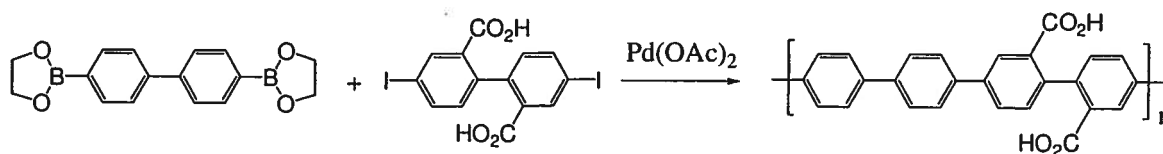


Schéma 14: Synthèse de polyrotaxanes ($n = 3-9$).

Les dendrimères sont des macromolécules bien définies dont la forme est ramifiée. Ils sont utiles dans les systèmes de livraison de médicaments car ils facilitent le transport des molécules médicamenteuses au site désiré. Ils sont également des entités très importantes en chimie des matériaux, des polymères et dans les systèmes de transfert d'énergie. Des études récentes ont montré que les dendrimères pourraient être synthétisés avec un bon rendement en appliquant la réaction de SM. D'ailleurs, en 2002, la synthèse de dendrimères contenant de la porphyrine a été démontrée en utilisant la réaction de SM comme étape principale [Capitosti, G.J. *et al.* 2003]. De plus, des dendrimères et des polymères hyperbranchés ont été synthétisés par la réaction de SM et la réaction d'iododésilylation (Schéma 15) [Bo Z., *et al.* 2004].

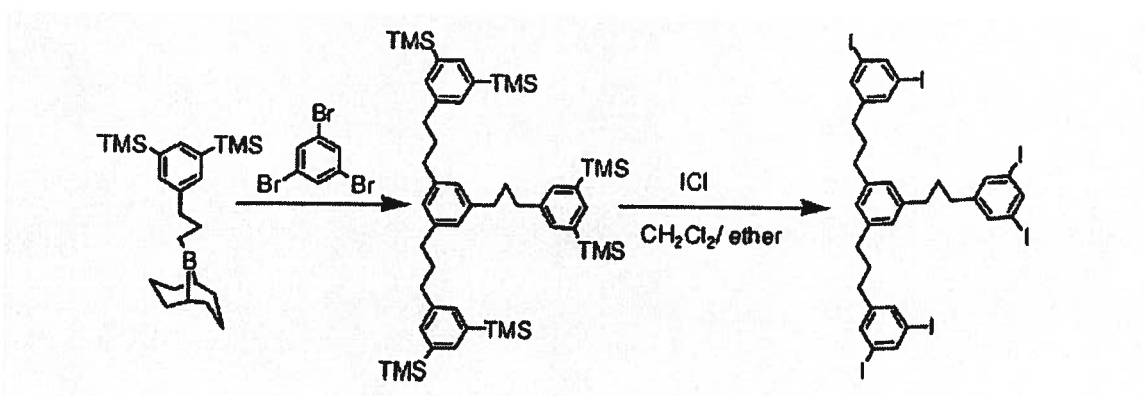


Schéma 15 : Synthèse de blocs de construction de type aryle/alkyle utilisés pour la synthèse de dendrimères et de polymères hyperbranchés.

Des structures chirales à base de composés binaphthyles peuvent également être obtenues par le couplage de SM en utilisant, par exemple, l'acide chiral binaphthylboronique et des halogénures d'aryles. [Yan, Y.Y. *et al.* 2001].

Dérivés de thiophène :

Les thiophènes substitués sont des molécules qui se retrouvent dans plusieurs produits naturels et leurs propriétés sont utilisées dans l'industrie du parfum, pharmaceutique et en sciences des matériaux. Plus spécifiquement, les polythiophènes possèdent des propriétés optiques électriques non linéaires, ce qui se révèle être un attrait pour produire des transistors à effet de champ, des composantes électroluminescentes, des piles solaires, des résistances photochimiques, des composantes appliquées, des piles et des diodes. À cet égard, des aldéhydes et des phosphates de terthiophène, utilisés comme monomères dans la synthèse de polymères de semi-conducteurs, ont été couplés par la réaction de SM [Collis, G. E. *et al.* 2001]. Un exemple de l'application de la réaction de SM est la synthèse d'une série d'oligothiophènes substitués avec le 9,9-diarylfluorène. La synthèse de cet oligomère est illustrée dans le Schéma suivant :

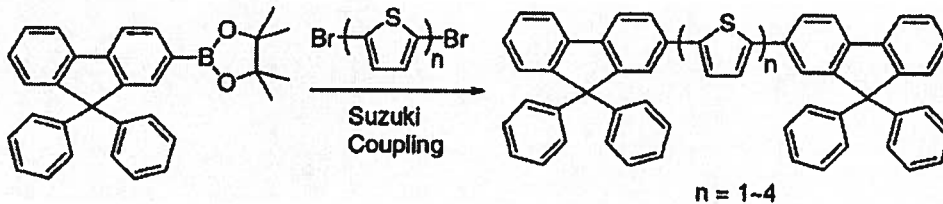


Schéma 16 : Synthèse d'oligothiophènes substituées avec le 9,9-diarylfluorène (Le schéma est extrait de Wong KT., *et al.* 2002)

Cette réaction peut également s'effectuer de manière régiosélective [Dang TT., *et al.*

2007]



Schéma 17 : Synthèse régiosélective des dérivés thiophènes par la réaction de SM.

Synthèse des acides aminés et modification des peptides :

Comme mentionné précédemment, la réaction de SM a été utilisée pour produire des acides aminés non naturels pouvant ensuite être incorporés à des chaînes peptidiques de manière à créer des molécules originales. Ainsi, une vaste gamme d'acides aminés non-naturels, tels l'indolizidine, des dérivés de la phénylalanine 4-aryle non protégés et des dérivés de biarylalanine ont été obtenus.

L'application de la réaction de SM à des chaînes peptidiques a d'abord été étudiée par Kotha et Lahiri [(a) Kotha, S.; Lahiri, K. 2001; (b) Kotha, S.; and Lahiri.. K. 2003]. L'incorporation d'un résidu 4-iodo-phénylalanine dans une chaîne peptidique pouvant ensuite subir un couplage de SM offrait dès lors la possibilité d'obtenir divers analogues peptidiques à partir d'une synthèse initiale. Les équipes de Yoburn et de Skaff ont d'ailleurs utilisé le couplage de SM afin de produire des dimères de peptides pontés par un résidu dityrosine (Schéma 18) [a) Yoburn, JC. *et al.* 2003 ; b) Ojia Skaff, *et al.* 2005].

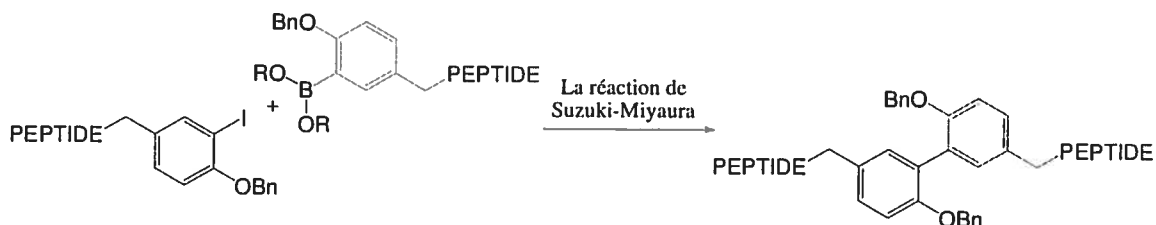


Schéma 18 : Synthèse de dimères peptidiques par la réaction de SM

Puis, Ojida *et al.* ont montré que la réaction de SM pouvait s'effectuer dans des conditions aqueuses modérément douces, permettant ainsi la modification de protéines [Ojida, A. *et al.* 2005]. Enfin, la réaction d'interconnexion a permis l'élaboration d'une librairie d'inhibiteurs peptidomimétiques de la protéase NS3 du virus de l'hépatite C (Schéma 19) [Poupart, M.-A. *et al.* 2001].

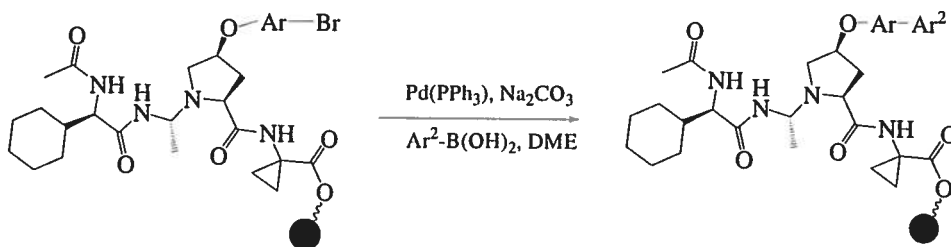


Schéma 19: Synthèse d'une librairie d'inhibiteurs de la protéase NS3

Synthèse en phase solide :

Le couplage de SM en phase solide a été utilisé pour la première fois afin de préparer des composés biaryliques. En effet, Frenette et Friesen [Frenette, R.; Friesen, R.W. 1994] ont effectué une réaction d'interconnexion catalysée par le palladium entre des acides arylboroniques et des bromures ou des iodures aryliques ancrés à une résine de Merrifield

afin de produire des composés biaryliques. Les produits biaryles ont été ensuite clivés par trans-estérification. De plus, l'irradiation par micro-ondes s'est avérée efficace pour augmenter le rendement tout en diminuant le temps de réaction dans la production des biaryles en phase solide [Larhed, M. *et al.* 1996]. Guiles *et al.* [Guiles, J.W. *et al.* 1996] ont poursuivi les études sur l'application de la réaction de SM en phase solide ce qui a permis d'optimiser les conditions de réaction pour de multiples acides boroniques et d'adapter le couplage de SM pour des synthèses effectuées avec des systèmes robotisés.

L'utilisation de la synthèse en phase solide pour produire des bibliothèques de molécules d'intérêt pharmacologique a stimulé l'intérêt de divers groupes de recherche envers la réaction de SM. Ainsi, l'équipe de Yoo [Yoo, S. *et al.* 1997] a construit une variété de dérivés de biphenyltétrazole, des composés ayant des propriétés antagonistes du récepteur de l'angiotensine II, en utilisant la réaction de SM en phase solide. Par ailleurs, Boojama *et al.* [Boojama, C.G. *et al.* 1995] ont également utilisé le couplage de SM en phase solide, mais cette fois, afin d'obtenir des dérivés 1,4-benzodiazépine-2,5-dione qui peuvent être utilisés comme agents anticonvulsivants. Enfin, l'équipe de Lange [Lange, U. E. W. *et al.* 2003] a mis au point une nouvelle approche synthétique en phase solide faisant appel à la réaction de SM pour produire des bibliothèques d'antagonistes des récepteurs de l'endothéline.

Des groupes de recherche ont également exploré l'introduction de variations au sein de la réaction de SM. Par exemple, Fraley *et al.* [Fraley M.E. and Rubino R.S. 1997] a réussi à coupler différents acides boroniques en présence du catalyseur Pd(PPh₃)₄ sur un triflate

de vinyle attaché à une résine de polystyrène. De même, l'équipe de Piettre [Piettre S.R. and Baltzer S. 1997] a développé une autre méthode permettant la formation de composés biaryliques en faisant réagir des halogénures d'aryles ancrés à un support solide avec un ester de pinacol de diborane. Cette première étape a mené à la formation d'un arylboronate pouvant ensuite réagir avec différents halogénures aryliques menant à la formation de composés biaryliques (schéma 20)

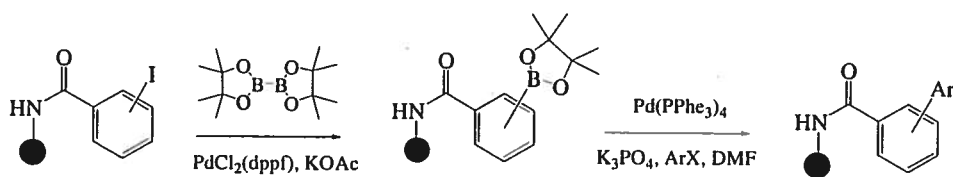


Schéma 20 : Méthode alternative du couplage de SM permettant la formation de composés biaryliques [Piettre S.R. and Baltzer S. 1997]

Enfin, la réaction de SM a été également utilisée dans la préparation de nouveaux supports solides pouvant être utilisés en chimie combinatoire.

Synthèse de produits naturels et pharmaceutiques :

En 1981, moins de deux ans après la publication originale du groupe de Suzuki, la réaction de SM était utilisée afin de produire une substance, l'acétate de (E)-9,11-dodécadiène-1-yl [Rossi, R. *et al.* 1981], une phéromone sexuelle isolée du lépidoptère *Diparopsis castanea*. Par contre, il a fallu attendre jusqu'en 1994 pour identifier la première application de la réaction de SM en industrie pharmaceutique, soit la synthèse du Losartan, un antagoniste du récepteur de l'angiotensine II [Larsen, RD *et al.* 1994]. Il faut noter que les médicaments du même groupe (type Sartan – Figure 2) tels l'Irbesartan,

le Candesartan, le Telmisartan, le Olmesartan, et le Valsartan, sont actuellement synthétisés en utilisant la réaction de SM comme étape principale [Corbet, JP. *et al.* 2006].

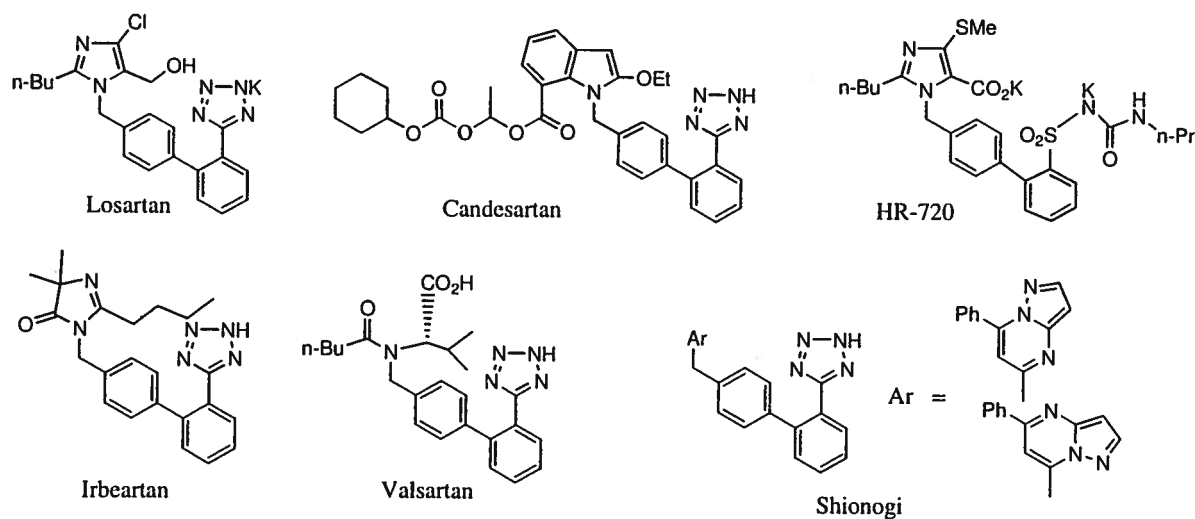


Figure 2: Famille des médicaments de type Sartan

Une des applications les plus remarquables de la réaction de SM dans le domaine de produits naturels est la synthèse totale de la palytoxine par Kishi *et al.* [a) Armstrong, R.W. *et al.* 1989; b) Armstrong, R.W. *et al.* 1989; c) Suh, E. M. *et al.* 1994]. Le défi relève du fait que la palytoxine, dont la structure est représentée à la figure 3, est une des substances non peptidiques les plus toxiques à avoir été isolées de coraux, est une structure complexe formée de 71 éléments stéréochimiques.

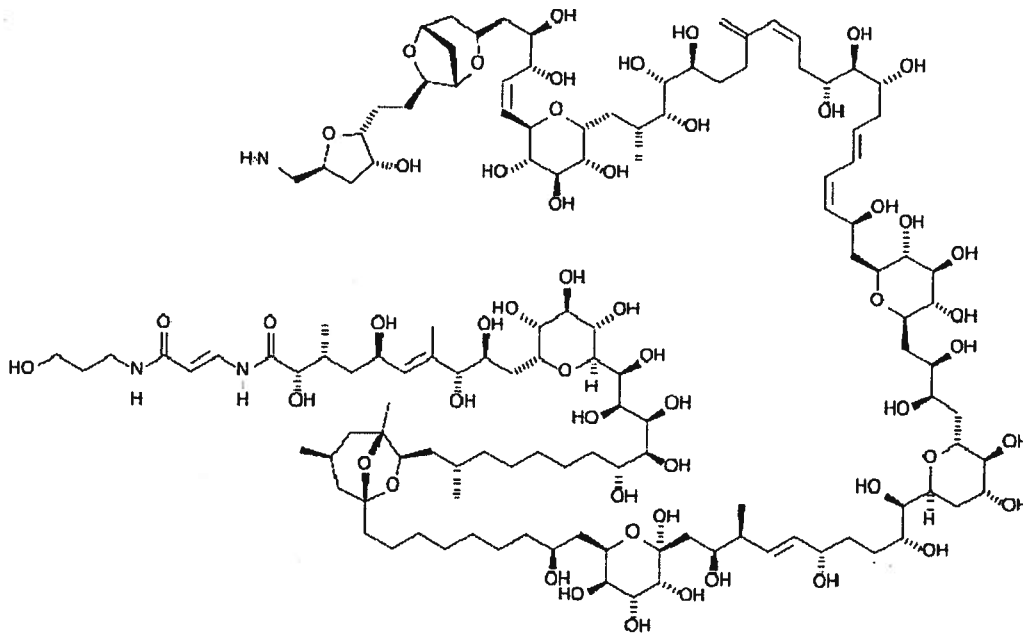


Figure 3 : Structure de la palytoxine

D'autres toxines isolées d'organismes marins ont également été synthétisées par des méthodes faisant appel à la réaction de SM. A titre d'exemple, on peut mentionner la brévéttoxine, la ciguatoxine et le ganbierol qui sont toutes formées d'éthers polycycliques [H. Takakura, *et al.* 2001; M. Sasaki, *et al.* 1998; M. Sasaki, *et al.* 1999; M. Sasaki, *et al.* 2000]. Les alcaloïdes isolés de plantes sont des substances qui ont un attrait du point de vue pharmacologique. A cet égard, la michellamine B possède une activité intéressante dans la lutte contre le virus HIV [P. D. Hobbs, *et al.* 1996], alors que la (-)-antofine, la (-)-tylophorine et la (-)-ficuseptine C sont des agents antinéoplasiques efficaces [Furstner, A. *et al.* 2006]. Ces différents alcaloïdes naturels ont tous été synthétisés par le biais de la réaction de SM. De même l'ageladine A, un akénoïde de l'éponge marine *Agelas nakamurai* possédant une activité inhibitrice d'angiogénèse, a été synthétisée en employant le couplage de SM entre l'acide N-Boc-pyrryl-2-boronique et la chloropyridine [Meketa ML. *et al.* 2006].

La vancomycine est un antibiotique glycopeptidique naturel utilisé pour combattre les infections bactériennes Gram positives résistantes aux traitements à la pénicilline. Cette molécule possède un système biarylique. Or, il n'existe actuellement que trois voies de synthèse de la vancomycine dont deux utilisent le couplage de SM pour construire le système biarylique AB de la molécule (Schéma 21) [a) Nicolaou, KC. *et al.* 1998; b) Boger D. L., *et al.* 1999].

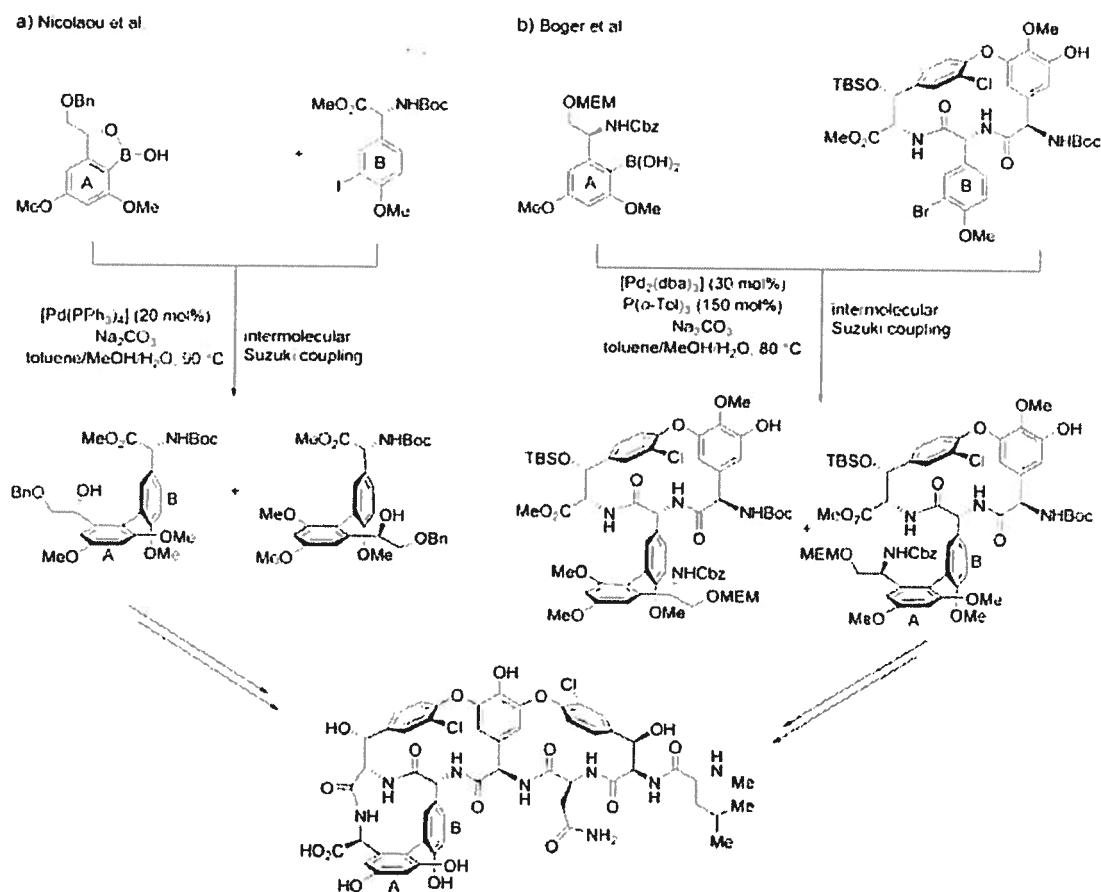


Schéma 21 : Approches de synthèse pour la formation du système biarylique A-B de la vancomycine reproduit de : a) Nicolaou *et al.* 1998; b) Boger *et al.* 1999. (Le schéma est

copié de Nicolaou KC *et al.* 2005)

Par ailleurs, les synthèses d'inhibiteurs non peptidiques des récepteurs de l'angiotensine II et de l'endothéline qui ont été décrites plus tôt, des dérivés de l'acide nicotinique ont été préparés par l'intermédiaire du couplage de SM [Fernandez JC. *et al.* 2005]. Ceux-ci sont utilisés afin de diminuer les concentrations des lipoprotéines athérogènes comme le LDL-cholestérol. La synthèse du Rofecoxib et de l'Etorocoxib, des inhibiteurs de la COX-II, et de l'acétate stéroïdal d'abiratérone, un inhibiteur du cytochrome humain P450_{17 α} [Anthony O. King, *et al.* 2004] fait également appel à la réaction de SM. De même, la pitavastatine, qui est un bloqueur efficace de la HMG-CoA réductase nécessite l'utilisation du couplage de SM pour sa synthèse [Miyachi, N. *et al.* 1993].

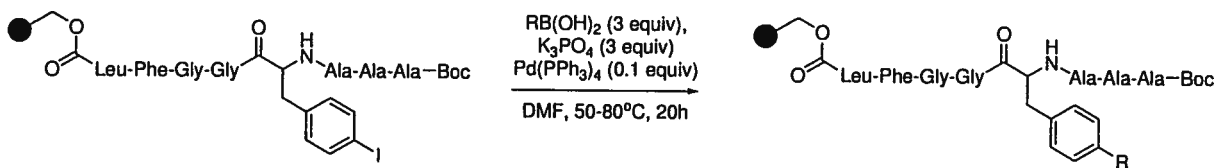
Enfin, les antibiotiques synthétiques composés d'un cycle β -lactame faisant partie de la famille des carbapénèmes tel que le SB 242784, un médicament utilisé pour le traitement de l'ostéoporose, sont également produits par une méthode faisant intervenir le couplage de SM [Yu, MS. *et al.* 1998]

Chapitre 2 : Résultats

Partie A : Article

I. Résumé en français de l'article

La réaction d'interconnexion de Suzuki-Miyaura (SM) est une des méthodes les plus efficaces pour la construction de liaisons C-C, un outil essentiel en synthèse organique. Cette étude a porté sur l'évaluation de l'utilisation de la réaction de SM afin de modifier des peptides construits en suivant une approche synthétique en phase solide, une stratégie qui, au meilleur de notre connaissance, n'a jamais été décrite dans la littérature. Pour ce faire, [Ala^{1,2,3}, Leu⁸]Enk lié à une résine polystyrène a été utilisé comme peptide-résine modèle. Les résidus aromatiques du peptide, soit Tyr⁴ et Phe⁷, ont été remplacés à tour de rôle par l'acide aminé Phe(*p*-I) afin d'avoir les conditions nécessaires pour effectuer la réaction de SM. Les conditions optimales de la réaction de SM se sont avérées être un mélange de K₃PO₄ employé comme base, de DMF comme solvant et de tétrakis Pd(PPh₃)₄ en tant que catalyseur. Par la suite, nous avons utilisé ces conditions optimisées afin de synthétiser une librairie d'analogues de l'enképhaline modifiée aux positions Tyr⁴ ou Phe⁷, en utilisant des dérivés variés de l'acide boronique.



Effectiveness of the Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reaction for Solid-Phase Peptide Modification

Ngoc-Duc Doan, Steve Bourgault, Myriam Létourneau and Alain Fournier*

Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides (LEMPP),
INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 245 boul. Hymus, Pointe-Claire,
QC, Canada H9R 1G6

* Corresponding author

Dr Alain Fournier

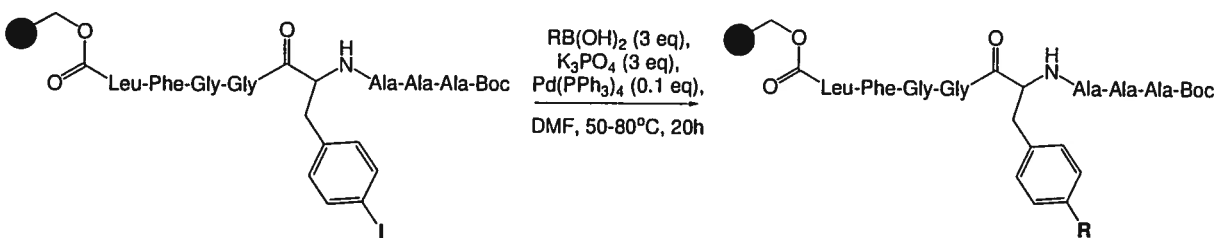
Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides
INRS – Institut Armand-Frappier, Université du Québec
245 boul. Hymus, Pointe-Claire, QC, Canada H9R 1G6

Contribution personnelle:

J'ai réalisé la totalité du travail en laboratoire et ai rédigé ce manuscrit. Steve Bourgault et Myriam Létourneau ont contribué au projet en procurant leur support et explications pour faciliter ma démarche scientifique. Ils ont également participé à la révision du manuscrit. Le Pr Alain Fournier a collaboré en émettant les bases de ce projet et a également corrigé cet article. Cet article est soumis pour publication à la revue scientifique *Journal of Combinatorial Chemistry*.

Abstract

The Suzuki-Miyaura (SM) cross-coupling reaction has recently become one of the most efficient methods for C-C bond construction opening a wide range of opportunities in organic synthesis. This study focused on the evaluation of the use of the SM reaction to modify peptides using a solid-phase synthesis approach, an avenue that was still not investigated intensively. We used as a peptide model [Ala^{1,2,3}, Leu⁸]Enk linked to a polystyrene support on which it was previously assembled. The aromatic residues Tyr⁴ and Phe⁷ of [Ala^{1,2,3}, Leu⁸]Enk were respectively substituted with *p*-iodo-Phe and a SM-related strategy was developed. Results indicated that the reaction conditions involving K₃PO₄ or Na₂CO₃ (base), DMF (solvent), Pd(PPh₃)₄ (catalyst) and in temperatures ranging from 50 to 80 °C during 20 h, were found as optimal. Finally applying those optimal conditions, a series of [Ala^{1,2,3}, Leu⁸]Enk analogs modified at Tyr⁴ or Phe⁷ positions, was synthesized using diverse boronic acid derivatives.



Abbreviations: SM, Suzuki-Miyaura; SPOS, solid-phase organic synthesis; SPPS, solid-phase peptide synthesis; SAR, structure-activity relationships; Enks, enkephalins; Met-Enk, methionine-enkephalin; Leu-Enk, leucine-enkephalin; Tyr(*t*-Bu), *O*-*tert*-butyl-tyrosine; Phe(*p*I), *p*-iodo-phenylalanine; BiP, 4-biphenylalanine; BOP, Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate; DIEA, diisopropylethylamine; TFA, trifluoroacetic acid; ACN, acetonitrile; DMF, *N,N*-dimethylformamide; DMSO, dimethylsulfoxide; THF, tetrahydrofuran; DCM, dichloromethane; NMP, *N*-methyl-2-pyrrolidinone; RP-HPLC, reverse-phase high-performance liquid chromatography; Fmoc, 9-fluorenylmethoxycarbonyl; MALDI-TOF, Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization - Time-Of-Flight; MS, mass spectrometry; Pd(PPh₃)₄, (tetrakis)(triphenylphosphine) palladium(0); PdCl₂(PPh₃)₂, dichlorobis(triphenylphosphine)palladium(II); PCy₃, tricyclohexylphosphine; *n*-Bu₄NI, tetrabutylammonium iodide; (Boc)₂O, di-*tert*-butyl dicarbonate; Boc, *tert*-butyloxycarbonyl.

Introduction

The use of transition metal-catalyzed reaction in organic synthesis allows C-C bond constructions and thus, provides a key step to build more complex molecules from simple precursors.¹ One of the most efficient methods for C-C bond construction is the Pd-catalyzed Suzuki-Miyaura (SM) cross-coupling reaction (or Suzuki coupling). The SM reaction consists in the coupling of a boronic acid derivative with an aryl or vinyl halide or triflate, in the presence of a palladium catalyst and a base. The main advantages of the Suzuki coupling are the mild reaction conditions, its environmentally safer character in comparison to most other organometallic reagents, and the commercial availability of large sets of boronic acids.² Moreover, the manipulation and removal of byproducts containing boron are easier compared to other organometallic reagents, especially in large-scale synthesis applications.³ After the original work of Suzuki and Miyaura⁴, the cross-coupling reaction opened a very wide range of opportunities in organic synthesis focusing on the preparation of several drug-like molecules. For instance, one of the first SM application in the pharmaceutical industry was the synthesis of Losartan, an angiotensin II receptor antagonist.⁵ This palladium-catalyzed reaction was also used as a key step in the preparation of various COX-II inhibitors, such as Rofecoxib and Etorocoxib, and also in the synthesis of the steroidal abiraterone acetate that is a potent inhibitor of human cytochrome P450_{17 α} .⁶ Furthermore, total syntheses of Tylophora alkaloids Cryptopleurine, (-)-Antofine, (-)-Tylophorine and (-)-Ficuseptine C, using palladium catalyzed cross-coupling reactions for the formation of the biphenyl scaffold was demonstrated.⁷ Suzuki coupling was also described as an efficient method for the construction of A-B biaryl system in the total synthesis of antibiotic Vancomycin.⁸

Recently, SM coupling was used successfully for studying structure-activity relationships (SAR) of bioactive compounds. As a matter of fact, a report described the solid-phase synthesis of non-peptidic endothelin receptor antagonists by applying the Suzuki reaction.⁹ Furthermore, a series of 13 derivatives of 5-substituted nicotinic acid was prepared in solid-phase with high yield and purity using the Suzuki coupling method.¹⁰

Also, SM cross-coupling reaction was used to generate unusual amino acid building blocks that were further incorporated in peptide structures to generate new molecules. For example, Collier *et al.*¹¹ found that an organoborane reagent was an excellent surrogate of the homoalanine anion and that it can be transformed into a range of unusual α -amino acids. Additionally, a general and efficient method to prepare C4-substituted dipeptide reverse-turn mimetics (unsaturated and saturated azabicyclo alkane amino acid derivatives) was developed by Zhang *et al.*¹² by using the Suzuki coupling reaction. A Pd-catalyzed coupling reaction of pinacolborane also allowed Nakamura *et al.*¹³ to develop a practical method for the synthesis of 4-borono-L-phenylalanine from L-tyrosine or 4-iodo-L-phenylalanine derivatives. Moreover, with microwave irradiation, unprotected 4-aryl phenylalanines were prepared in high yields within 5-10 min as free amino acids from the cross-coupling of 4-borono phenylalanine with aryl halides.¹⁴

Solid-phase synthesis via the Suzuki reaction of biarylalanine derivative libraries was also described.¹⁵ The application of the SM cross-coupling reaction to 4-iodo-L-phenylalanine-based peptides was first investigated by Kotha and Lahiri¹⁶, opening a new approach to produce unusual modified phenylalanine peptides. For example, dityrosine cross-linked peptide dimers were synthesized successfully.¹⁷ Also, surface protein

modifications via the SM coupling reaction was shown to be possible in aqueous solution under mild conditions.¹⁸ Furthermore, a study reported the solid-phase synthesis of a library of peptidomimetic inhibitors for the hepatitis C virus NS3 protease using the Mitsunobu and Suzuki cross-coupling reaction.¹⁹ Therefore, the SM coupling reaction was used frequently in association with different synthesis strategies. However, to the best of our knowledge, no reports describe the application of the SM reaction to modify peptides at the solid-phase synthesis step.

Recently, solid-phase organic synthesis (SPOS) has become the groundwork for the combinatorial synthesis of drug-like small organic molecule libraries. Solid-phase synthesis exhibits numerous advantages over solution methods and during the last decade, several groups have made efforts to transfer to solid support, techniques that were originally developed for liquid phase.²⁰ In this respect, SPOS became the method of choice for the synthesis of various peptides. Because of their large spectrum of activities, peptides are among the most important bioactive compounds with applications in biomedical field as well as in nano-science.²¹ However, in most cases, because of poor bioavailability and metabolic susceptibility, modified peptides must be developed to be used for instance as drugs. Thus, to enhance receptor specificity and affinity, stability as well as biological activity of peptides, SAR studies through the development of peptide libraries proved to be an efficient method. Many strategies for the incorporation of chemical modifications were used, including the introduction of an aromatic ring, a heterocyclic moiety or another small molecule fragment into a peptide chain, in order to produce conformational constraints that can provide new physicochemical properties or either mimic or produce unusual secondary structures in a peptide.^{21a} In this line of view,

the application of the SM cross-coupling reaction to solid-phase peptide synthesis would offer a novel tool to generate peptide libraries useful for SAR studies. Thus, [Ala^{1,2,3}, Leu⁸]Enk (Ala-Ala-Ala-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) was chosen as a model peptide to evaluate the applicability of the SM reaction in solid-phase peptide chemistry.

In the present study, we describe the effectiveness of a solid-phase SM reaction strategy to modify an aromatic amino acid-containing peptide ([Ala^{1,2,3}, Leu⁸]Enk). The reaction conditions were first studied and then optimized by focusing on the Tyr⁴ position. Thereafter, the solid-phase SM reaction was applied to generate [Ala^{1,2,3}, Leu⁸]Enk analogs modified at positions Tyr⁴ and Phe⁷.

Results and discussion

Enkephalin analogs, N- α -Fmoc-[Ala^{1,2,3}, Phe(*p*I)⁴, Leu⁸]Enk and N- α -Fmoc-[Ala^{1,2,3}, Phe(*p*I)⁷, Leu⁸]Enk, were initially assembled on a Wang functionalized polystyrene resin using a BOP/DIEA coupling strategy. In parallel, N- α -Fmoc-[Ala^{1,2,3}, BiP⁴, Leu⁸]Enk and N- α -Fmoc-[Ala^{1,2,3}, BiP⁷, Leu⁸]Enk were also synthesized as standard peptides. Prior to the SM reaction, a small amount of peptide was cleaved and analyzed by RP-HPLC and MALDI-TOF MS. Results showed that all peptides were synthesized successfully with high purity and at the expected mass.

Our first attempts of Suzuki couplings were carried out with N- α -Fmoc-[Ala^{1,2,3}, Phe(*p*I)⁴, Leu⁸]Enk-Resin using 3 eq of phenylboronic acid, 0.1 eq of catalyst, 3 eq of base in various solvents, at 80 °C for 20 h. After cleavage, MS analysis indicated the presence of four compounds corresponding to the starting material N- α -Fmoc-[Ala^{1,2,3}, Phe(*p*I)⁴, Leu⁸]Enk and the expected product N- α -Fmoc-[Ala^{1,2,3}, BiP⁴, Leu⁸]Enk, in combination with their N- α -deprotected counterparts, H₂N-[Ala^{1,2,3}, Phe(*p*I)⁴, Leu⁸]Enk-OH and H₂N-[Ala^{1,2,3}, BiP⁴, Leu⁸]Enk-OH. Furthermore, from the HPLC analysis, we found that H₂N-[Ala^{1,2,3}, Phe(*p*I)⁴, Leu⁸]Enk-OH and H₂N-[Ala^{1,2,3}, BiP⁴, Leu⁸]Enk-OH were the major compounds in the crude peptide preparation (Figure1). Consequently, this data showed that the Fmoc protecting group was not stable to the Suzuki coupling conditions that were used, presumably because of the particular basic conditions and the high temperature. We did not attempt to carry out the reaction with the free N-terminal function because several studies suggested that the binding of unprotected amino groups

(-NH₂) to metal centers can retard the catalytic cycle.²² Instead of synthesizing a new peptide with Ala¹ being introduced under the Boc form, we removed the Fmoc moiety and replaced it with a Boc group using the (Boc)₂O anhydride (**Scheme 1**). Moreover, a recent study reported that H₂N-Phe(*p*I)-OH anchored to a Wang linker was not totally stable to Suzuki conditions because of the base-catalyzed hydrolysis.²³ Thus, the reaction was attempted a second time but with a Boc protection approach at the N-terminus. Results showed that this scheme is compatible with the SM reaction. Also, to confirm the stability of the linker under the SM conditions, the solution after Suzuki coupling was analyzed by MALDI-TOF MS and HPLC. No trace of peptide was found in the SM solution showing that N- α -Boc-[Ala^{1,2,3}, Phe(*p*I)⁴, Leu⁸]Enk supported on a Wang polystyrene resin is an adequate peptide-resin model to determine the optimal reaction conditions (**Scheme 2**).

Optimization of solid-phase Suzuki reaction conditions

Effect of base: In the Suzuki catalytic cycle, a base is used to generate a more reactive borate through coordination of a hydroxide ion with the boron atom that will react with Pd complex in a transmetalation process.²⁴ Previous results reported that the purity and selectivity of products obtained from a coupling reaction depend on the base and the catalyst used.⁴ Furthermore, the base must be chosen according to the solvent used. Strong bases such as NaOH, KOH or NaOCH₃ perform well in water or THF/H₂O solvent systems²⁵, whereas weaker bases such as K₂CO₃, K₃PO₄ and Na₂CO₃ are usually used in DMF.^{24b} These bases can be used as aqueous solutions, or as suspensions in

organic solvent.^{2f} To evaluate which base would give the highest level of coupling, phenylboronic acid and N- α -Boc-[Ala^{1,2,3}, Phe(*p*I)⁴, Leu⁸]Enk-resin were used in the presence of Pd(PPh₃)₄ at 55 °C (**Figure 2**). DMF was chosen as the solvent because of its good swelling properties for polystyrene resin. Results showed that coupling reactions performed very well in DMF with K₃PO₄ and Na₂CO₃ with yields of 88% and 75%, respectively. With a stronger base such as NaOH, the conversion was only 33% whereas with weaker bases, such as KOAc and CsHCO₃, 31% and 35% of coupling occurred respectively. Because all these bases, except for NaOH, were insoluble and used as suspension in DMF, we evaluated if a phase-transfer reagent could increase the rate of conversion. To do so, a suitable amount of a quaternary salt, *n*-Bu₄NI, was added to the reaction mixture. However, this approach did not improve the yields (data not shown). Similarly, a DMF-soluble organic base, DIEA, was used but it did not give satisfactory results with a poor reaction level and significant amounts of by-products were also formed. Thus, from the results, K₃PO₄ and Na₂CO₃ appeared as the more appropriate to pursue the study.

Effect of solvent: To investigate the effect of solvent on the rate of the Suzuki coupling, different organic solution conditions were used (DMF, NMP, DMSO, THF and 1,4-dioxane). All reactions were performed at 55 °C in the presence of K₃PO₄, and Pd(PPh₃)₄ for 20 h. Data (**Figure 3**) showed that the best results were obtained with DMF (conversion at 88%), whereas no trace of the derived product was found in the crude cleavage solution when using THF as solvent. Even DMSO that was shown to accelerate the cross-coupling reaction in solution phase gave only 14% of conversion. As well,

NMP, which is known as an excellent solvent in SPPS, as well as mixtures of NMP and DMSO (4:1) or NMP and DMF (1:1) did not lead to satisfactory yields. Those results might reflect the swelling properties of polystyrene resin and the peptide solvation capacity of each solvent.

Effect of temperature: In order to determine the optimal temperature for the solid-phase modification of N- α -Boc-[Ala^{1,2,3}, Phe(pI)⁴, Leu⁸]Enkephalin, the cross-coupling reaction was performed at temperatures ranging from 25 to 90°C in presence of Pd(PPh₃)₄ and K₃PO₄, in DMF for 20 h. Results (**Figure 4**) showed that the SM reaction performed well at temperatures between 55 °C and 90 °C, with yields varying from 75% to over 90%. On one hand, although at 90 °C the conversion of the iodo-peptide was very high (85%), many unknown by-products were produced. On the other hand, at temperatures up to 40°C, the conversion attained only approximately 47% for the iodo-peptide but no byproduct formation was observed. In fact, temperatures between 55 °C and 80 °C appeared optimal for producing the biaryl compound without generating a significant amount of byproducts. It was then postulated that a stronger catalyst could be used concomitantly with low temperatures to carry out the Suzuki reaction while avoiding side-products. In this view, PdCl₂(PPh₃)₂ was used but no improvement of the yield was observed (data not show).

Effect of catalysts and reaction time: Cross-coupling reactions were performed in DMF with K₃PO₄, at 55 °C but with different catalysts such as Pd(PPh₃)₄, PdCl₂(PPh₃)₂ and a mixture of PdCl₂ (1 eq) and PCy₃ (2 eq). The best results were obtained with Pd(PPh₃)₄

(conversion : 88%) (Table 1). $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ gave similar results (86%), but significant amounts of unknown by-products were also formed, while $\text{PdCl}_2/\text{PCy}_3$ gave only 45% of conversion. Although PdCl_2 is considered as a weak catalyst, the latter results was somewhat surprising because Shen²⁶ established that a bulky and electron-rich phosphine, such as PCy_3 , is a potent Pd catalyst ligand for the cross-coupling of boronic acid with aryl halides. Thus, according to Shen, tricyclohexylphosphine (PCy_3) would facilitate the oxidative addition step of the catalytic cycle and favor the formation of a catalytically active monophosphine Pd complex.

In fact, a few studies had already shown that PCy_3 is a very efficient ligand for Suzuki couplings in mild conditions.²⁷ Therefore, in this work, the weak activity of $\text{PdCl}_2/\text{PCy}_3$ catalyst might come from the poor solubility of PdCl_2 in DMF. Its replacement with another palladium salt such as $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ might overcome this problem. Nevertheless, with the commercial availability of $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ and its potent catalytic activity, this material was considered as highly satisfactory within the context of our study.

Using the base, solvent, catalyst and temperature - optimized conditions for solid-phase peptide modification via SM coupling, we also evaluated the time course of the reaction. Results showed that only 30% of peptide conversion was completed in the first 6 h of reaction, whereas after 12 h, the reaction yield had reached 66%. At 20 h, 88% of biaryl compound was obtained and longer time (48 h) did not increase significantly the yield of conversion (Table 1). In fact, with longer reaction times, side-reactions were generally accelerated. From these results, optimized conditions were found to be DMF as the

solvent, K_3PO_4 or Na_2CO_3 as the base and $Pd(PPh_3)_4$ as the catalyst. The reaction can be carried out at 80 °C for 20 h.

Solid-phase synthesis of an Enkephalin analog library using the Suzuki-Miyaura reaction

Because the conversion of N- α -Boc-[Ala^{1,2,3}, Phe(*p*)⁴, Leu⁸]Enk to N- α -Boc-[Ala^{1,2,3}, BiP⁴, Leu⁸]Enk was successfully achieved using the optimized conditions of the SM reaction described above, we applied these conditions for the preparation of an Enk analog library containing modifications at position Tyr⁴ or Phe⁷, using various boronic acid derivatives.

The study was even extended to several substitutions of boronic acids containing both electron-donating and electron-withdrawing moieties. A summary of the data obtained with Enk analogs modified at position 4 is given in **Table 2**. From these results, it seems that electron-withdrawing substrates were more reactive than their electron-donating counterparts. Similar results were also shown in previous studies. In fact, these moieties would determine the formation rate of the activated boronic-acid-palladium-ligand complex. Thus methoxyphenylboronic acid was completely un-reactive in SM reaction conditions (entry 3), whereas, the coupling with methylesterphenylboronic acid gave 87% of conversion (entry 6). All attempts to carry out the reaction with mecaptophenylboronic acid were also unsuccessful (entry 4) probably due to the strong thiophilicity of palladium resulting in a poisoning effect by the sulfur atom.³² Moreover, the catalyst

poisoning effect was also observed in the presence of amine functions.³⁰ Thus, the SM coupling of 3-aminophenylboronic acid gave only 14% of conversion with Pd(PPh₃)₄ as catalyst, moreover, many byproducts were also formed (entry 7). On the other hand, the introduction of a strong electron-withdrawing group, NO₂, to the aromatic ring of phenylboronic acid gave an excellent reaction yield (88%, entry 8). No peptide conversion via SM reaction was achieved with carboxyphenylboronic acid unless its acid function was protected with a methyl ester. This protection improved the conversion from 0% to 87% without any detectable trace of hydrolysis that would have produced the corresponding carboxy-substituted product.

We also investigated the conditions for synthesizing some heteroaromatic derivatives of H₂N-[Ala^{1,2,3}, Leu⁸]Enk-OH. It was found that 3-pyridineboronic acid gave 93% of conversion in the presence of PdCl₂(PPh₃)₂ (entry 10) while the 4-pyridineboronic acid (entry 9) was completely un-reactive under the same conditions. Hence, it was reasoned that the 4-pyridineboronic acid should be more reactive than 3-pyridineboronic acid because of the increased electronegativity of the nitrogen atom when located at a *para*-position. In fact, this phenomenon was also observed in previous studies, however with 2-bromopyridine.^{28a,30-31} As mentioned before, the presence of a sulfur atom can retard the reaction rate by poisoning the Pd-catalyst. Surprisingly, 2-thiopheneboronic acid gave an excellent yield of conversion (entry 13) under our SM conditions. However, it was observed that significant amounts of unknown by-products were also formed. The same observation was also found with 2-furanboronic acid though this boronic acid was less active than the previous one (entry 12). On the other hand, it was found that 3-

furanboronic acid remained almost un-reacted under the coupling conditions (entry 11). In this study, we also carried out the SM reaction of iodo-peptide-resins with alkylboronic acid. Two boronic acid derivatives were studied, *trans*-2-chloromethylvinylboronic acid and 2-methylvinylboronic acid. Results showed that the halogen-substituted *trans*-2-chloromethylvinylboronic acid was easy to couple, whereas the non-substituted 2-methylvinylboronic acid was coupled to an extent of only 12%.

For all boronic acid derivatives that were used in this study, similar results were obtained for the solid-phase modification of N- α -[Boc-Ala^{1,2,3}, Leu⁸]Enk-resin at the Phe⁷ position (**Table 2**). This data showed that in the model peptide that was used, the vicinity of the polystyrene matrix, as observed with Phe⁷, had no major steric hindrance effect on the formation of the activated-boronic acid-palladium-ligand complex.

Conclusion:

In summary, we have developed a convenient strategy for the solid-phase modification of peptides through the SM cross-coupling reaction. Because peptides contain reactive groups that could interfere with the application of the SM reaction, it is more appropriate to perform the reaction on solid-phase while the peptide is still bearing all the protecting groups. It was found that the Fmoc moiety was not stable to the conditions used for the Suzuki reaction and had to be replaced with a Boc-protecting group. The methodology for the SM solid-phase modification of peptides was then optimized through the study of the influence of temperature, base, catalyst, solvent and reaction time on the reaction yield. It was found that the best results were obtained with Pd(PPh₃)₄ as catalyst, 2M aqueous solution of K₃PO₄ (or Na₂CO₃) as base, DMF as solvent and temperature ranging from 50 °C-80 °C for 20 h.

This general procedure can be used for the solid-phase synthesis of large libraries of modified phenylalanine peptide analogs for SAR studies. As an example, using optimized conditions, a series of [Ala^{1,2,3}, Leu⁸]Enk analogs modified at position Tyr⁴ or Phe⁷ was synthesized with high yields and purity allowing their easy isolation. Additional studies are actually performed with more complex peptides to verify the compatibility of the SM method with peptide sequences containing reactive amino acids such as methionine, cysteine, histidine and tryptophane. The development of SM cross-coupling reaction conditions suitable for all peptide sequences would then result in a new tool available for post-synthesis peptide modifications.

Experimental:

Materials: All Fmoc-protected amino acids such as Leu, Phe, Gly, Ala and Tyr(*t*-Bu) were obtained from Matrix Innovation Inc. (Montreal, QC), except for Phe(*p*I) and Wang resin that were from ChemImpex International (Wood Dale, IL). Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate (BOP) and diisopropylethylamine (DIEA) were also purchased from Matrix. Biograde trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from PSIG (Montreal, QC). Acetonitrile (ACN), N,N-dimethylformamide (DMF), dimethyl sulfoxide (DMSO), tetrahydrofuran (THF), 1,4-dioxane and dichloromethane (DCM) were obtained from Fisher Scientific (Nepean, ON). All other compounds such as the boronic acid derivatives, bases, palladium catalysts and N-methylpyrrolidone (NMP) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville ON).

Peptide synthesis: All peptide-resins were synthesized using a semiautomatic homemade solid-phase synthesizer, according to a protocol using standard Fmoc chemistry. The first amino acid (Leu) was attached to the Wang resin using 2,6-dichlorobenzoyl chloride and pyridine following a method previously published by Sieber.³² Then, the coupling of each amino acid (3 eq) was performed in DMF using BOP (3 eq) and DIEA (3 eq) as reagents for 30 min. Deprotection of the Fmoc-protecting group was achieved with 20% piperidine in DMF. After the last amino acid (Ala) coupling, the Fmoc-protecting group was removed and replaced with a Boc-protecting group using (Boc)₂O anhydride (20 eq)

and DIEA (20 eq) coupling in DMF for 2h at room temperature. Peptide-resin was dried under vacuum and stored at -20°C until the SM reaction was applied.

General procedure for optimization of solid-phase Suzuki-Miyaura reaction: A mixture of 10mg [Ala^{1,2,3}, Phe(*p*-I)⁴, Leu⁸]Enk linked to resin (1 eq), phenylboronic acid (3 eq), Pd-catalyst (0.1 eq), 2M alkaline aqueous solution (3 eq) in degassed organic solvent (2 ml) was heated and stirred for times varying from 4 to 48 hours. After the reaction, the peptide-resin was thoroughly washed with DMF (x3), H₂O (x3), MeOH (x2), DMF (x3) and then DCM (x3). The modified peptides were deprotected and cleaved from the solid support using TFA containing 5% (v/v) water. The cleavage reaction was carried out for 2 h at room temperature. The solution was then filtered, and the resin was washed with an equal volume of TFA. After evaporation of TFA, a small volume of 60% ACN in water containing 0.06% TFA (v/v) was added to the remaining material. Crude peptides were then precipitated in de-ionized water and lyophilized. The coupling reaction was monitored by HPLC and MALDI-TOF MS. The conversion rate was determined using the area under the curve corresponding to the desired product in function of the total area under the curve corresponding to the starting peptide (measured at $\lambda = 212$ nm).

Peptide characterization: Crude lyophilized peptides were analyzed by analytical reverse-phase HPLC using a Phenomenex Jupiter Proteo C₁₈ (4 μ m; 90Å) column (250 x 4.60 mm) connected to a Beckman 128 solvent module coupled to a Beckman 168 PAD detector (Beckman Couter, Inc., Fullerton, CA). The flow rate was at 1.0 mL/min, and the elution of the peptide was carried out with a linear gradient of 0% to 60% B in 30

min, in which A was TFA 0.06% in water and B was ACN. The crude peptides were also characterized by MALDI-TOF mass spectrometry (Voyager DE spectrometer, Applied Biosystems, Foster City, CA). The laser was set at 337 nm, and an acceleration voltage of 25 kV was applied. The matrix for peptide inclusion and ionization was α -cyano-4-hydroxycinnamic acid.

Solid-phase synthesis of an Enkephalin analog library: A mixture of 200mg iodo-peptide-resin (1 eq), boronic acid derivative (3 eq), Pd(PPh₃)₄ (0.1 eq), 2 M aqueous solution of K₃PO₄ (or Na₂CO₃) (3 eq) in degassed DMF (20 mL) was stirred for 20 h at 80 °C. After successive washings with DMF (x3), H₂O (x3), MeOH (x2), DMF (x3) and DCM (x3), the modified peptides were cleaved from the solid support using TFA/water (95:5) for 2 h at room temperature. The solution was filtered, and the resin was washed with an equal volume of TFA. After evaporation of TFA, peptides were solubilized in a small volume of 60% ACN in water containing 0.06% TFA. Crude peptides were precipitated in de-ionized water and lyophilized. The coupling reaction was monitored by HPLC and MALDI-TOF MS. The coupling conversions were determined by analytical RP-HPLC of the crude product ($\lambda = 212$ nm).

Figure captions

Figure 1: HPLC (A) and MALDI-TOF MS (B) profile of the initial product (in black) and of the reaction mixture obtained after the SM reaction and the subsequent acid cleavage (in red). Theoretical masses of [Ala^{1,2,3}, BiP⁴, Leu⁸]Enk and [Ala^{1,2,3}, Phe(*p*-I)⁴, Leu⁸]Enk are 827.6 and 874.4, respectively.

Figure 2: Influence of the base on the conversion rate of reaction of N- α -Boc-[Ala^{1,2,3}, Phe(*p*I)⁴, Leu⁸]Enk with phenylboronic acid using solid-phase SM coupling conditions. Reaction conditions: PheB(OH)₂ (3 eq), bases (3 eq), Pd(PPh₃)₄ (or PdCl₂(PPh₃)₂, 0.1 eq), DMF, 55 °C, 20 h. The percentage of coupling conversion was determined by analytical RP-HPLC of the crude product ($\lambda = 212$ nm).

Figure 3: Influence of the solvent on the conversion rate of reaction of N- α -Boc-[Ala^{1,2,3}, Phe(*p*I)⁴, Leu⁸]Enk with phenylboronic acid using solid-phase SM coupling conditions. Reaction conditions: PheB(OH)₂ (3 eq), K₃PO₄ (3 eq), Pd(PPh₃)₄ (or PdCl₂(PPh₃)₂, 0.1 eq), in an organic solvent, 55 °C, 20 h. The percentage of coupling conversion was determined by analytical RP-HPLC of the crude product ($\lambda = 212$ nm).

Figure 4: Influence of the temperature on the conversion rate of reaction of N- α -Boc-[Ala^{1,2,3}, Phe(*p*I)⁴, Leu⁸]Enk with phenylboronic acid using solid-phase SM coupling conditions. Reaction conditions: PheB(OH)₂ (3 eq), K₃PO₄ (3 eq), Pd(PPh₃)₄ (or PdCl₂(PPh₃)₂, 0.1 eq), DMF, 25-90 °C, 20 h. The percentage of coupling conversion was determined by analytical RP-HPLC of the crude product ($\lambda = 212$ nm).

Table 1: Influence of catalyst and reaction time on the conversion rate of reaction of N- α -Boc-[Ala^{1,2,3}, Phe(*p*I)⁴, Leu⁸]Enk with phenylboronic acid using solid-phase SM coupling conditions.^a

No	Catalysts	Time (h)	Conversion (%) ^a
1	Pd(PPh ₃) ₄	4	28
2	Pd(PPh ₃) ₄	6	30
3	Pd(PPh ₃) ₄	12	66
4	Pd(PPh ₃) ₄	20	88
5	Pd(PPh ₃) ₄	48	91 ^b
6	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	20	86 ^b
7	PdCl ₂ /PCy ₃ ^c	20	45

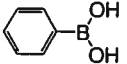

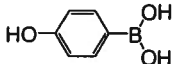
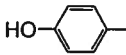
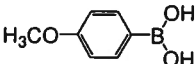
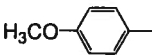
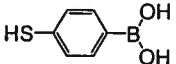
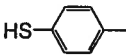
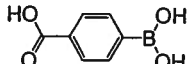
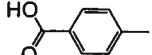
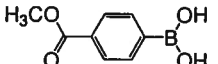
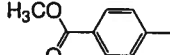
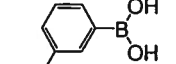
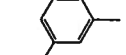
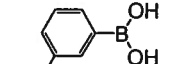
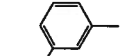
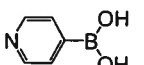

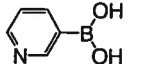

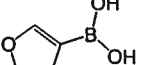

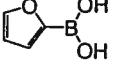

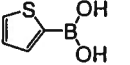

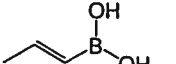

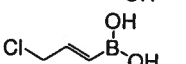
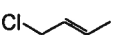
The influence of time on the conversion rate was determined using iodo-peptide-resin (1 eq), PheB(OH)₂ (3 eq), K₃PO₄ (3 eq), 0.1 eq Pd(PPh₃)₄ and reaction mixture was stirred in DMF, at 55 °C, for time varying from 4 h to 48 h. The influence of catalysts on conversion rate was also determined using three different catalysts such as Pd(PPh₃)₄, Pd(PPh₃)₄ and a mixture of PdCl₂/PCy₃ (1:2) within 20 h.

^{a)} The percentage of coupling conversion was determined by analytical RP-HPLC of the crude product ($\lambda = 212$ nm).

^{b)} unknown by-products were also formed.

^{c)} ratio: 1 eq/2 eq

Table 2: Modification of [Ala^{1,2,3}, Phe(pI)⁴, Leu⁸]Enk at Tyr⁴ and Phe⁷ positions via solid-phase SM reaction.

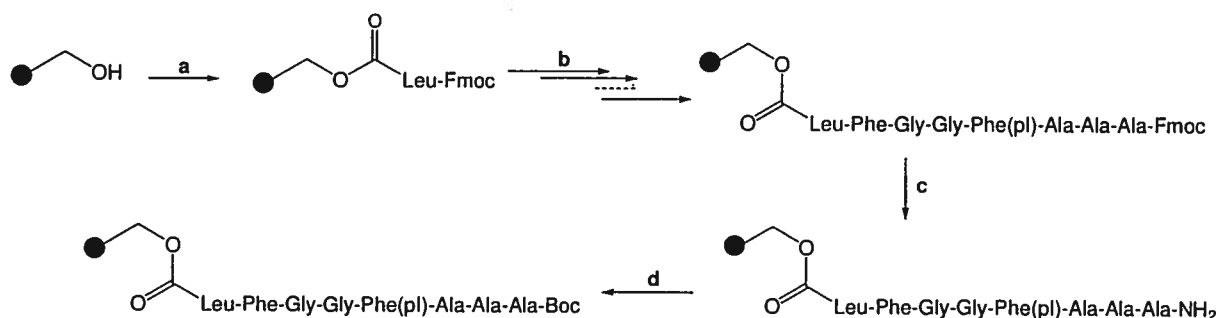
Entry	Boronic acid	Base	Catalyst	R	Conversion (%) ^a	
					at Tyr ⁴	at Phe ⁷
1		K ₃ PO ₄	Tetrakis		87	88
2		K ₃ PO ₄	Tetrakis		73	61
3		K ₃ PO ₄	Tetrakis PdCl ₂ (PPh ₃) ₂		0	0
4		Na ₂ CO ₃	Tetrakis PdCl ₂ (PPh ₃) ₂		0	0
5		Na ₂ CO ₃	Tetrakis PdCl ₂ (PPh ₃) ₂		0	0
6		K ₃ PO ₄	Tetrakis		87	70
7		Na ₂ CO ₃	Tetrakis PdCl ₂ (PPh ₃) ₂		14 ^b	nd ^b
8		Na ₂ CO ₃	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂		88	84
9		Na ₂ CO ₃	Tetrakis PdCl ₂ (PPh ₃) ₂		0	0
10		Na ₂ CO ₃	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂		93	90
11		K ₃ PO ₄ Na ₂ CO ₃	Tetrakis		5	5
12		Na ₂ CO ₃	Tetrakis		60 ^b	36 ^b
13		Na ₂ CO ₃	Tetrakis		72 ^b	66 ^b
14		K ₃ PO ₄	Tetrakis		12	5
15		K ₃ PO ₄	Tetrakis		81	79

Conditions: RB(OH)₂ (3 eq), K₃PO₄ (3 eq), Pd(PPh₃)₄ (or PdCl₂(PPh₃)₂, 0.1 eq), DMF, 80 °C, 20 h.

^a) As determined by analytical RP-HPLC of the crude product (λ = 212 nm)

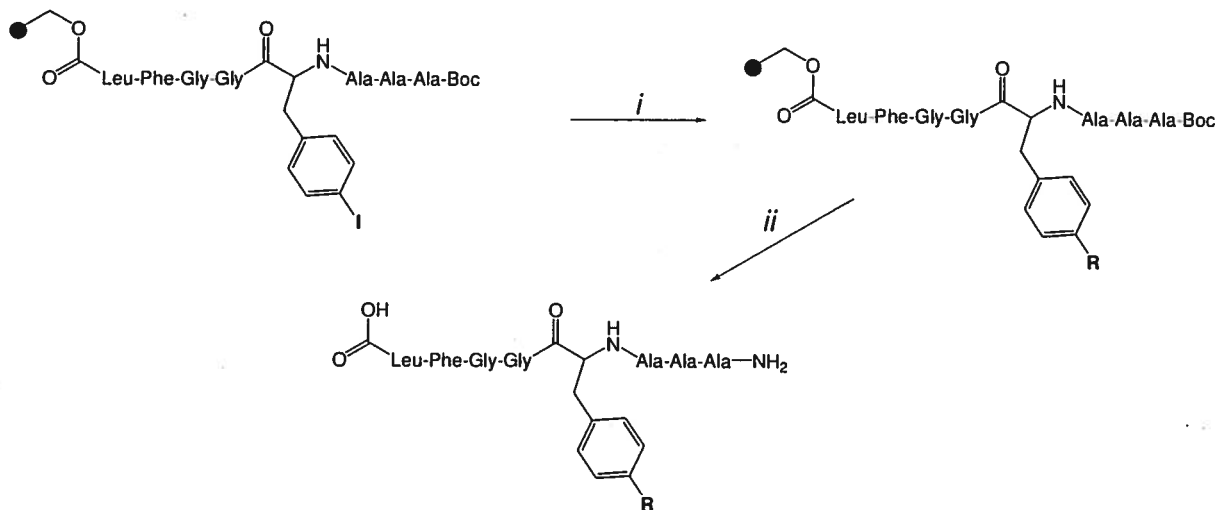
^b) Significant amounts of unknown by-products were also formed; nd: not determined

Scheme 1: Synthesis of Boc-[Ala^{1,2,3}, Phe(*p*I)⁴, Leu⁸]Enk-resin



Conditions: **a)** 1. N,α-Fmoc-Leu-OH, pyridine, 2,6-dichlorobenzoyl chloride, DMF, 20 h, rt ; 2. Benzoyl chloride, pyridine, DMF, 2 h, rt ; **b)** 1. piperidine/DMF (1 :4) 2 min, then 15 min, rt; n times; 2. N,α-Fmoc-AA-OH, BOP, DIEA, DMF, 1 h, rt ; **c)** piperidine/DMF (1 :4) 2 min, then 15 min, rt; **d)** (Boc)₂O, DIEA, DMF, 2 h, rt.

Scheme 2: General procedure for solid-phase modification of [Ala^{1,2,3}, Phe(*p*I)⁴, Leu⁸]Enk via Suzuki cross-coupling reaction



Conditions: *i*) $RB(OH)_2$ (3 eq), base (3 eq), catalyst (0.1 eq) in an organic solvent at 50-80 °C, for 20 h. *ii*) TFA/H₂O (95:5) (v/v).

Acknowledgments: Financial support was obtained from the CIHR. N-D.D. is the recipient of a studentship from the Fondation Armand-Frappier.

References:

- (1) (a) Tsuji, J. *Palladium reagents and catalysts* Wiley, Chichester, **1996**. (b) Diederich, F.; Stang, P.J. (Eds), *Metal-catalyzed cross-coupling reaction*, Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- (2) (a) Miyaura, N.; Yanagi, T.; Suzuki, A. *Synth. Commun.* **1981**, 11, 513-520. (b) Suzuki, A. *Pure Appl. Chem.* **1991**, 63, 419-422. (c) Martin, A.R.; Yang, Y. *Acta Chem. Scand.* **1993**, 47, 221-230. (d) Suzuki, A. *Pure Appl. Chem.* **1994**, 66, 213-222. (e) Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483. (f) Stanforth, S.P. *Tetrahedron*, **1998**, 54, 263-303. (g) Miyaura, N. *Advances in Metal-organic Chemistry*; Libeskind, L.S. (Ed) Jai: London, **1998**, vol. 6, 187-243. (h) Suzuki, A. *Organomet. Chem.* **1999**, 576, 147-168. (i) Suzuki, A. In *Organoboranes for Synthesis. ACS Symposium Series 783*; Ramachandran, P.V.; Brown, H.C. Eds; American Chemical Society: Washington DC, **2001**, 80-93. (j) Suzuki, A. *J. Organomet. Chem.* **2002**, 653, 83-90.
- (3) Kotha, S.; Lahiri, K; Kashinath, D. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 9633-9695.
- (4) (a) Miyaura, N.; Yamada, Y.; Suzuki, A. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 3437-3440. (b) Miyaura, N.; Yamada, Y.; Suginome, H.; Suzuki, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 972-980.
- (5) Larsen, RD *et al.* *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 6391-6394
- (6) Anthony O. King and Nobuyoshi Yasuda, *Topics Organomet. Chem.* **2004**, 6: 205-245.
- (7) Furstner, A.; Kennedy, J. W. *J. Chem. Eur. J.* **2006**, 12(28), 7398-7410

- (8) Nicolaou, K.C.; Natarajan, S.; Hui Li, Jain, N.F.; Hughes, R.; Solomon, M.E.; Ramanjulu, J. M.; Boddy, C. N. C.; Takayanagi, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*(19), p. 2708-2714.
- (9) Lange, U. E. W.; Braje, W. M.; Amberg, W.; Kettschau, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1721-1724.
- (10) Fernandez, J-C.; Sole-Feu, L. ; Fernandez-Forner, D. ; de la Figuera, N. ; Forns, P.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 581-585.
- (11) (a) Collier, P. N.; Patel, I.; Taylor, R. J. K. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5953. (b) Collier, P. N.; Campbell, A. D.; Patel, I.; Taylor, R. J. K. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7115.
- (12) Zhang, J.; Xiong, C.; Wang, W.; Ying, J.; Hrubby, V. J. *Org. Lett.*, **2002**, *4*(23), 4029-4032.
- (13) Nakamura, H.; Fujiwara, M.; Yamamoto, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2000**, *73*, 231-235.
- (14) Gong, Y.; He, W. *Org. Lett.* **2002**, *4* (22), 3803-3805.
- (15) (a) Nielsen, T. E.; Le Quement S.; Meldal, M. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 7959-7962. (b) Vázquez-Campos, S.; St.-Hilaire, P. M.; Damgaard, D.; Meldal, M. *QSAR Comb. Sci.*, **2005**, *24*(8), 913-922.
- (16) (a) Kotha, S.; Lahiri, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2887-2890. (b) Kotha, S.; and Lahiri.. K. *Biopolymers*, **2003**, *69*, 517-528.
- (17) (a) Yoburn, J.C.; Vranken, D.L.V.; *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2817-2820. (b) Ojia Skaff, Jolliffe, K. A.; Hutton, C. A. *J. Org. Chem.*; **2005**, *70*(18), 7353-7363.

- (18) Ojida, A.; Tsutsumi, H.; Kasagi, N.; Hamachi, I. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 3301-3305.
- (19) Poupart, M.-A.; Cameron, D. R.; Chabot, C.; Ghire, E.; Goudreau, N.; Goulet, S.; Poirier, M.; Tsantrizos, Y. S. *J. Org. Chem.*; **2001**; *66*(14); 4743-4751.
- (20) Thompson, L.A. ; Ellman, J.A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555-600.
- (21) (a) Sewald, N.; Jakubke, HD. *Peptides: Chemistry and Biology*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2002**. (b) Gao, XY; Matsui, H. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2037-2050.
- (22) (a) Billingsley, KL.; Anderson, KW.; Buchwald, SL. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3484-3488. (b) Itoh, T.; Mase, T. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3573-3577. (c) Wagaw, S.; Buchwald, S. L. *J. Org. Chem.* **1996**; *61*(21), 7240-7241.
- (23) Colombo, A. ; Fernandez, JC. ; de la Figuera, N. ; Fernaez-Forner, D. ; Forns, P. ; Albericio F. *QSAR Comb. Sci.* **2005**, *24*(8), 913-922.
- (24) (a) Matos, K.; Soderquist, JA. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 461-470. (b) Echavarren, AM.; Cardenas, DJ. *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions, 2nd Edition.* **2004** WILEY-VCH Verlage GmbH&Co. KGaA, Weinheim. ISBN 3-257-30518-1.
- (25) Bumagin, NA.; Bykov, VV. *Tetrahedron* **1997**, *53* (42), 14437-14450.
- (26) Shen, W.; *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5575-5578.
- (27) (a) Littke, A.F.; Dai, C.; Fu, G.C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4020-4028. (b) McClure, M. S.; Glover, B.; McSorley, E.; Millar, A.; Osterhout, M. H.; Roschangar, F. *Org. Lett.*; **2001**; *3*(11); 1677-1680.
- (28) (a) Phan, N.T.S.; Khan, J.; Styring, P. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 12065-12073. (b) Yamada, Y.M.A.; Takeda, K.; Takahashi, H.; Ikegami, S. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*,

- 7733-7741. (c) Grushin, V.V. and Alper, H. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 1047-1062. (d) Bge, B.; Eaborn, C.; Walton, D. R. M. *J. Organomet. Chem.* **1974**, *82*, 327.
- (29) (a) Singhal, A.; Jain, V. K. *J. Organomet. Chem.* **1995**, *494*, 75-80. (b) Miyauchi, Y.; Watanabe, S.; Kuniyasu, H.; Kurosawa, H. *Organometallics* **1995**, *14*, 5450-5453. (c) Ruiz, J.; Giner, J.; Rodriguez, V.; Lopez, G.; Casabo, J.; Molins, E.; Miravittles, C. *Polyhedron* **2000**, *19*, 1627-1631. (d) Savarin, C.; Srogl, J.; Liebeskind, L. S. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3229-3231. (e) Redon, R.; Torrens, H.; Wang, Z.; Morales-Morales, D. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *654*, 16-20.
- (30) Feuerstein, M. ; Doucet, H. ; Santelli, M. *J. Organomet. Chem.* **2003**, *687*, 327-336.
- (31) (a) Feuerstein, M.; Doucet, H.; Santelli, M. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*(33), 5659-5662. (b) Parry, P. R.; Wang, C.; Batsanov, A. S.; Bryce, M. R.; Tarbit, B. *J. Org. Chem.*; **2002**; *67*(21); 7541-7543. (c) Molander, G. A.; Biolatto, B. *J. Org. Chem.* **2003**; *68*(11); 4302-4314.
- (32) Sieber, P. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*(49), 6147-6150.

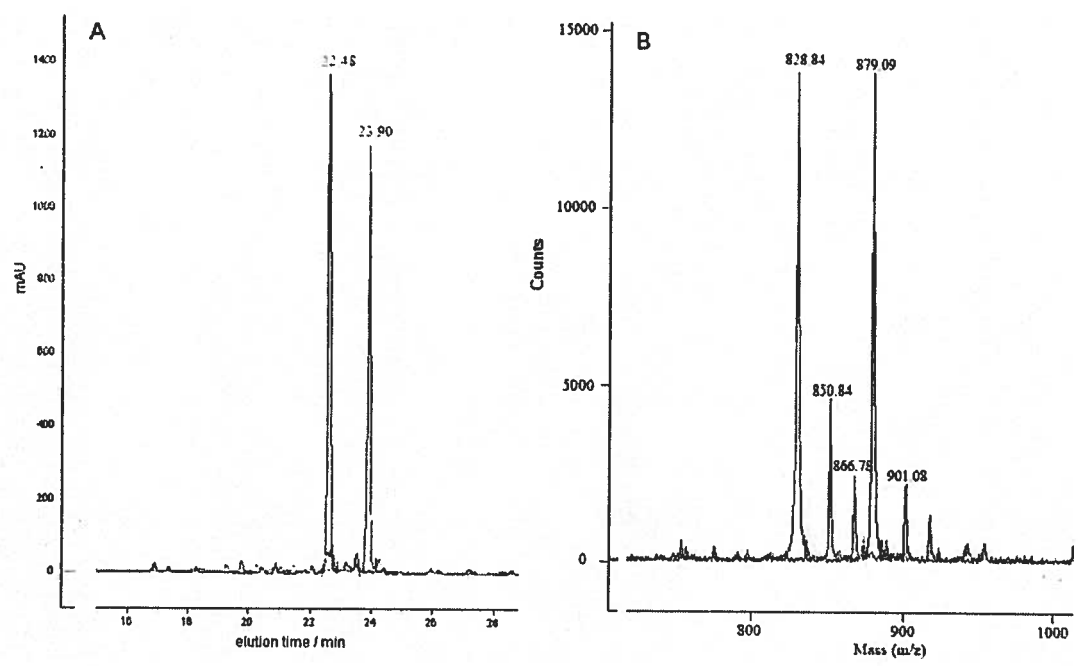


Figure 1

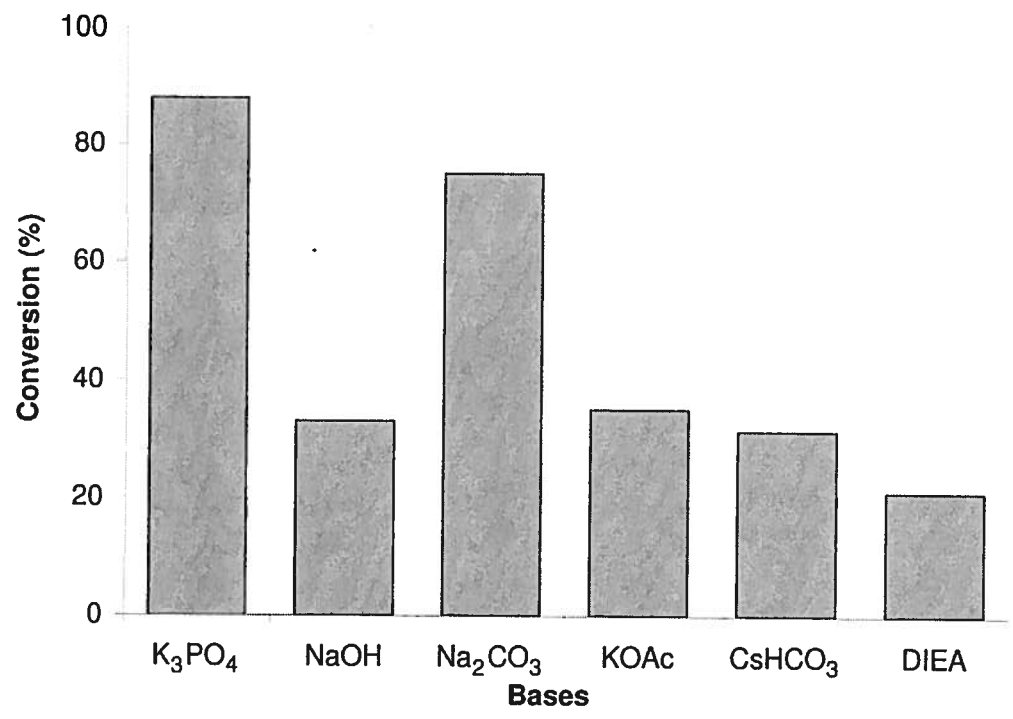


Figure 2

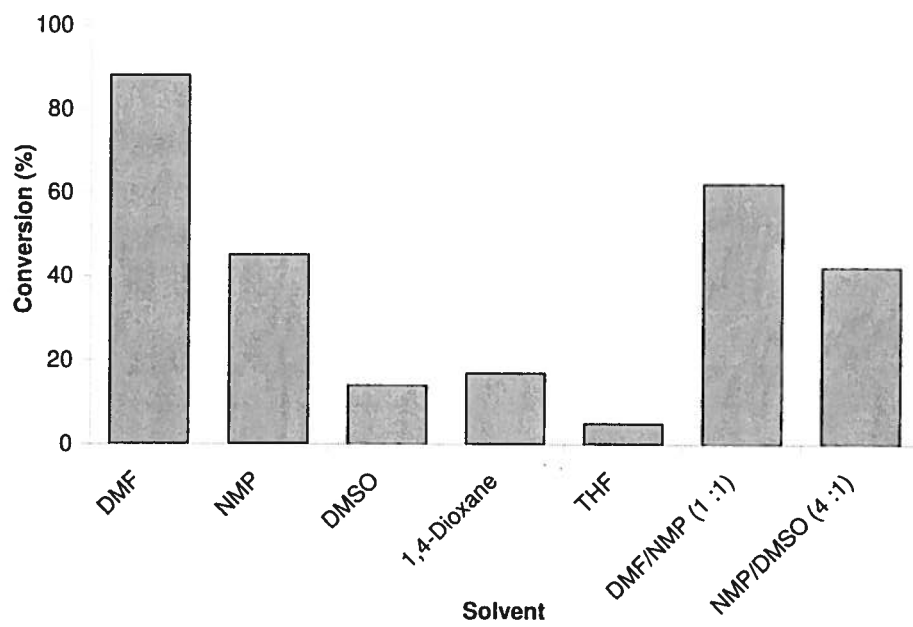


Figure 3

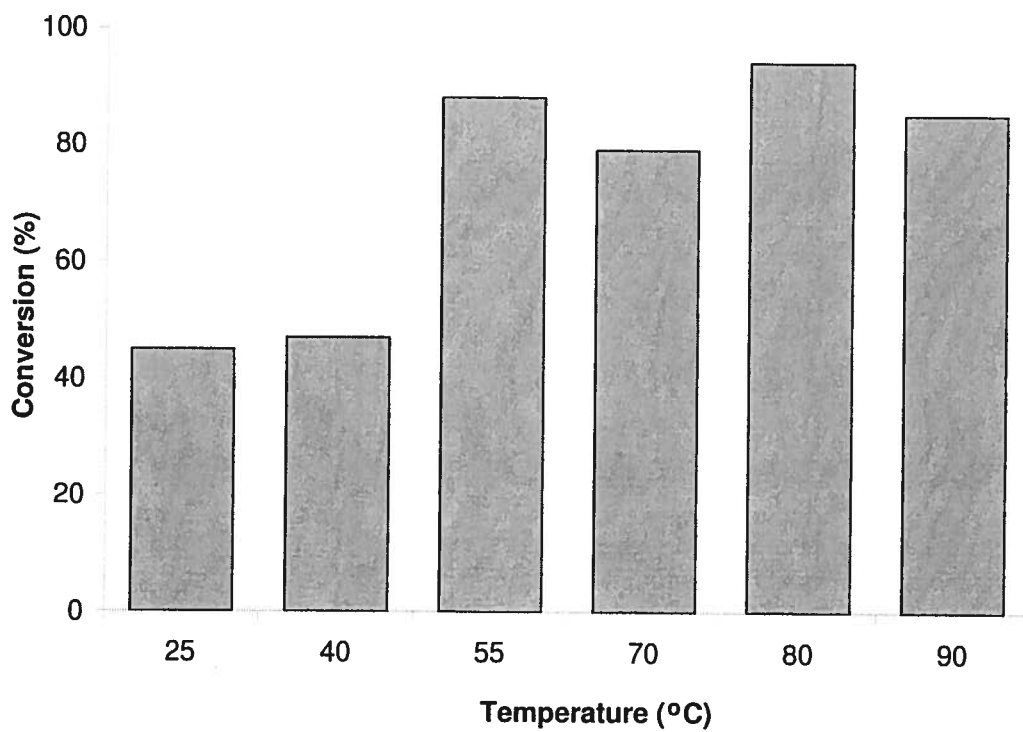


Figure 4

Partie B : Modification de l'ET-1(9-21) à la position Tyr¹³ : le rôle du Tryptophane

Pour évaluer l'application de la réaction de SM dans la modification de peptides contenant des résidus chimiquement sensibles tels que Cys, Met, His et Trp, le peptide *N*- α -Fmoc-[Cys(Acm)^{11,15}, Phe(*p*I)¹³]ET-1(9-21) a été initialement synthétisé en phase solide en utilisant la chimie Fmoc. Le groupement protecteur Fmoc de l'amine terminale a ensuite été enlevé par un traitement avec une solution de pipéridine/DMF (1 :4) (v/v), à la température de la pièce. L'amine a ensuite été protégée par le groupement Boc au moyen d'une réaction avec du (Boc)₂O et du DIEA dans du DMF, pendant 2 h à la température ambiante. Le peptide *N*- α -Fmoc-[Cys(Acm)^{11,15}, Bip¹³]ET-1(9-21) a été également synthétisé selon le même protocole. Une petite quantité de chacun des peptides a été clivée par un traitement de 2h dans une solution TFA/éthanedithiol/eau (95 :2.5 :2.5) (v/v) et le produit brut a été caractérisé par HPLC à l'échelle analytique et spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Les résultats indiquent que les peptides synthétisés correspondent aux produits attendus et ont une pureté supérieure à 95%.

La réaction de SM avec *N*- α -Fmoc-[Cys(Acm)^{11,15}, Phe(*p*I)¹³]ET-1(9-21) a été effectuée en phase solide au moyen des conditions optimales déterminées pour *N*- α -Boc-[Ala^{1,2,3}, Phe(*p*I)⁴, Leu⁸]Enk. L'acide boronique utilisé dans cette expérience a été l'acide phénylboronique. Après clivage, le peptide brut a été caractérisé par HPLC à l'échelle analytique et MALDI-TOF MS. Les résultats de ces analyses ont montré qu'il y a trois produits principaux formés ayant respectivement des masses moléculaires de 72 Da, 144 Da, et 271 Da de moins que le peptide de départ. Ces masses correspondent

respectivement au peptide $\text{H}_2\text{N}-[\text{Phe}(p\text{I})^{13}]\text{ET}-1(9-21)$ qui a perdu 1 groupement Acm, 2 Acm, et 2 Acm en combinaison avec un atome d'iode (**Figure 3**). Les mêmes trois produits sont formés lorsque des conditions de réaction plus douces sont utilisées. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le clivage du groupement Acm en présence du catalyseur de palladium. Pour confirmer cette hypothèse, le peptide $N,\alpha\text{-Boc-ET}-1(9-21)$, ayant des résidus Cys(Acm) aux positions 11 et 15, a été utilisé pour effectuer la réaction de SM conduisant au même résultat. En conclusion, le groupement protecteur Acm n'est pas stable dans les conditions de la réaction de SM.

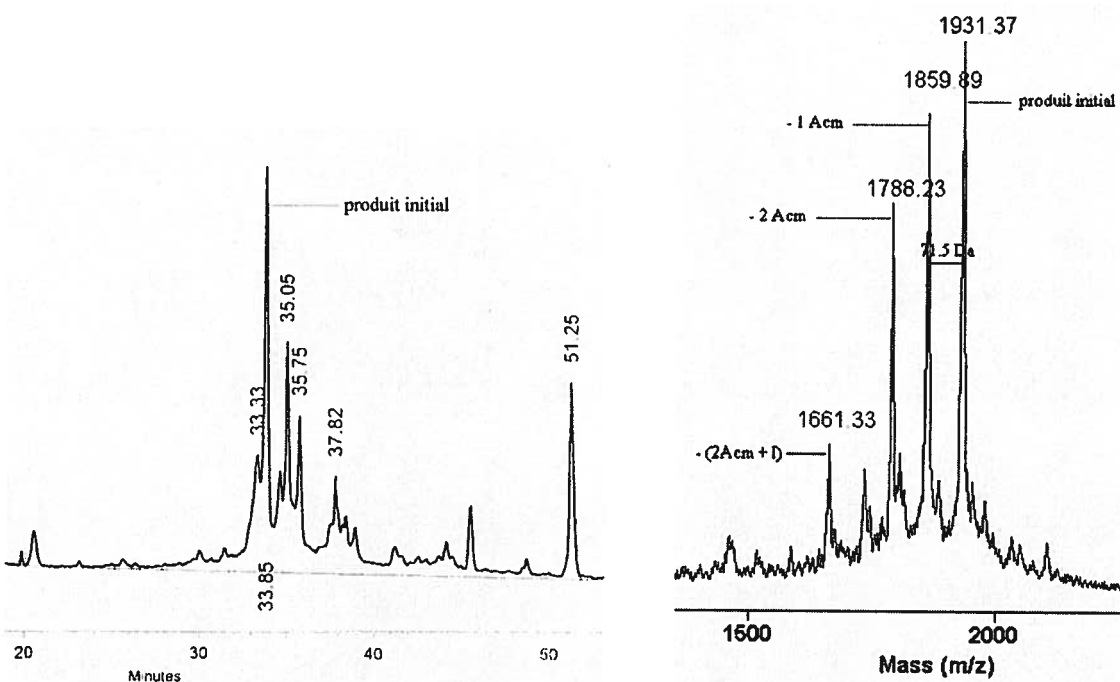


Figure 3 : Chromatogramme de l'analyse HPLC et spectre de masse du mélange de peptides après la réaction de SM effectuée sur le peptide $N\text{-}\alpha\text{-Fmoc-}[\text{Cys}(\text{Acm})^{11,15}, \text{Phe}(p\text{I})^{13}]\text{ET}-1(9-21)$ obtenu par MS MALDI-TOF.

Le groupement protecteur Acm étant clivé dans les conditions de la réaction de SM, le groupement fonctionnel SH des résidus Cys est libéré ce qui empoisonne le catalyseur de

palladium et bloque la réaction de SM. Pour éviter la libération du groupement SH, il est nécessaire de remplacer le groupement protecteur Acn.

Une courte étude a donc été entamée afin de déterminer quel groupement protecteur des Cys serait stable dans ces conditions. Pour ce faire, les peptides Pep1 à Pep3 ont été synthétisés en phase solide, avec des résidus Cys ayant des groupements protecteurs différents tel que présenté au Tableau 2.

Tableau 2 : Peptides synthétisés pour évaluer la compatibilité des conditions de SM avec différentes combinaisons d'acides aminés

N°	Peptides	Séquence
1	Pep1	Cys(<i>t</i> -Bu)-Val-Phe(<i>p</i> -I)-Ser-Ser-Pro-Thr-Arg-Pro-Ala
2	Pep2	Cys(Trt)-Val-Phe(<i>p</i> -I)-Ser-Ser-Pro-Thr-Arg-Pro-Ala
3	Pep3	Cys(S-benzyl)-Val-Phe(<i>p</i> -I)-Ser-Ser-Pro-Thr-Arg-Pro-Ala
4	Pep4	Met-Val-Phe(<i>p</i> -I)-Ser-Ser-Pro-Thr-Arg-Pro-Ala
5	Pep5	His-Val-Phe(<i>p</i> -I)-Ser-Ser-Pro-Thr-Arg-Pro-Ala
6	Pep6	Trp(Boc)-Cys(Trt)-Val-Phe(<i>p</i> -I)-Ser-Ser-Pro-Thr-Arg-Pro-Ala

Les analyses par HPLC et par spectrométrie de masse des 3 peptides (Pep1 à Pep3) après avoir effectué la réaction de SM indiquent la formation du produit désiré, soit les peptides suivant : [Bip³]Pep1, [Bip³]Pep2 et [Bip³]Pep3. Autrement dit, les groupements protecteurs *t*-Bu, Trt et benzyl sur les Cys sont stables. De ces trois groupements protecteurs, le Trt est directement compatible avec un protocole de synthèse peptidique en chimie Fmoc. Il a donc été choisi pour poursuivre l'étude.

Il est connu que l'atome de soufre est un « agent toxique » pour les métaux de transition. En effet, en formant un complexe stable avec le métal de transition il inactive celui-ci. Afin de vérifier si la réaction de SM est utilisable pour des peptides contenant des résidus avec un atome de soufre sur la chaîne latérale, le peptide Pep4 contenant le résidu Met a été synthétisé. Les résultats ont montré que le résidu Met est totalement stable dans ces conditions. De plus, le couplage de l'acide phénylboronique a bien fonctionné donnant le produit avec un bon rendement et une bonne pureté. Ce résultat était d'ailleurs attendu car les 3 peptides contenant une cystéine substituée (Pep1 à Pep3) s'étaient montrés compatibles avec la réaction de SM.

En présence de palladium(II), His est aussi un résidu qui pourrait être problématique. En effet, en milieu acide, une hydrolyse de liaison peptidique X-Y dans des segments X-Y-His a été observée par l'intermédiaire de la formation d'un complexe avec le palladium(II) [Milouin M.N. *et al.* 2003]. Par contre, ce type de réaction dans une solution basique en présence de Pd(II) n'avait pas été démontré. A cet égard, le peptide Pep5 (Tableau 2) a été utilisé comme modèle. Le couplage de SM de l'acide phénylboronique sur le peptide Pep5 a donné le produit attendu. Ainsi, le résidu His serait compatible avec les conditions de la réaction de SM.

Puis, les peptides $N\text{-}\alpha\text{-Boc-[Phe}(p\text{-I})^{13}\text{]ET-1(9-21)}$ et $N\text{-}\alpha\text{-Boc-[BiP}^{13}\text{]ET-1(9-21)}$, ayant leurs résidus Cys¹¹ et Cys¹⁵ protégés par le groupement Trt, ont été synthétisés en chimie Fmoc. Après l'analyse par HPLC et MALDI-TOF MS des produits de synthèse, une petite quantité des peptides liés au support solide a été utilisée pour la réaction de SM. Le

chromatogramme HPLC du mélange réactionnel n'a révélé qu'un seul produit (majoritaire) qui cependant possédait une masse moléculaire de 34.4 Da inférieure à celle du peptide initial (**Figure 5**). Étant donné que ce produit secondaire est formé sur les deux peptides indépendamment de la présence du résidu Phe(I), il semble que le produit formé soit le résultat d'une réaction avec un résidu autre que celui en position 13 du peptide.

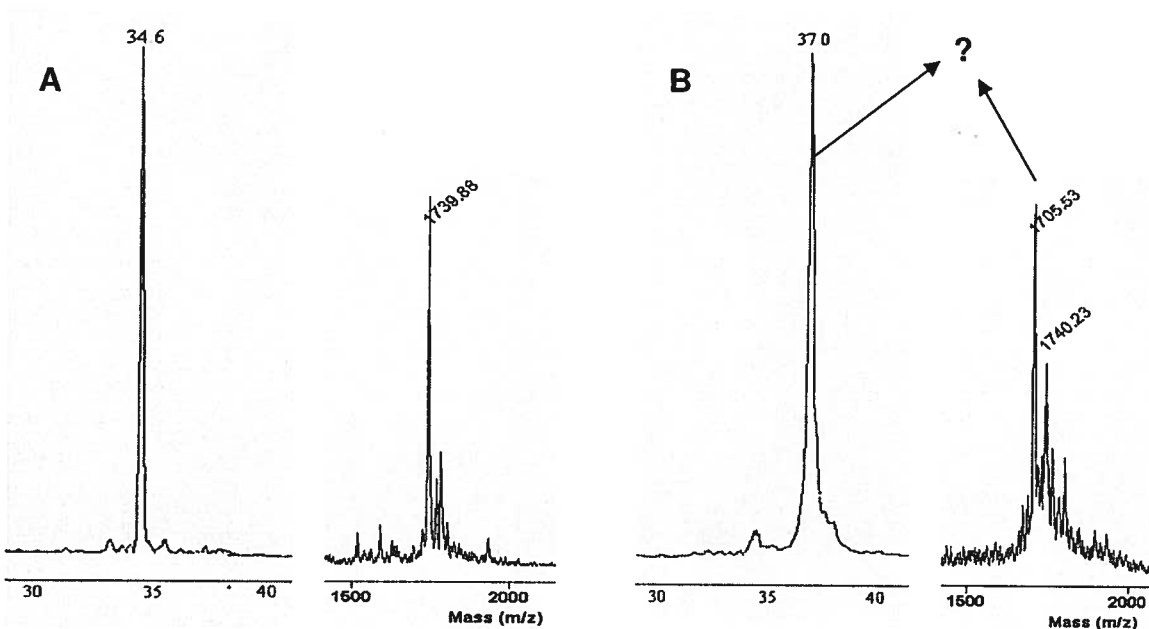


Figure 5: Chromatogrammes de l'analyse HPLC et MALDI-TOF MS du produit initial $[BiP^{13}]ET-1(9-21)$ (A) et du mélange réactionnel obtenu après la réaction SM (B).

Parmi les acides aminés sensibles, le Trp est souvent sujet à des réactions secondaires. Le peptide Pep6 a été synthétisé en incorporant un Trp(Boc) en position N-terminale du peptide Pep2. Alors que le peptide Pep2 s'est révélé stable dans les conditions de la réaction de SM, permettant la formation du produit désiré lors du couplage de l'acide phénylboronique, nos résultats indiquent qu'il y a une réaction particulière qui s'effectue sur le peptide Pep6. La masse moléculaire du produit secondaire formé est de 34 Da

inférieure à celle du produit initial ce qui peut laisser penser que le Trp puisse jouer un rôle dans cette réaction. Par contre, aucune modification n'a été observée sur le Boc-Trp(Boc)-résine placé dans des conditions de la réaction de SM. D'autres études sont nécessaires afin de caractériser cette réaction secondaire.

Chapitre III : Discussion et conclusion

Le développement de médicaments de type peptidique va probablement aller en augmentant étant donné que les peptides sont des molécules qui possèdent une haute affinité et spécificité, tout en ayant un profil de toxicité plus bas que la plupart des petites molécules pharmacologiques. De plus, les peptides sont plus stables aux variations de température et ils possèdent, à cause de leur taille, une meilleure pénétration des tissus par rapport aux protéines. Par contre, leur utilisation est limitée par leur demi-vie courte causée par une élimination rénale accélérée et un manque de stabilité *in vivo* suite à leur dégradation par différentes protéases. Pour améliorer le profil bio-pharmacologique d'un peptide, les modifications chimiques sont une option privilégiée. Par conséquent, le design rationnel de tels médicaments peptidiques exige de prendre en considération des paramètres biologiques comme le métabolisme, l'absorption et le transport, non seulement par la circulation systémique mais dans les organes spécifiques et au travers des barrières membranaires. Il est également nécessaire d'obtenir des données structurales et d'identifier les parties de la molécule responsables de son activité biologique. Ces résultats peuvent alors être exploités pour concevoir des molécules performantes pharmacologiquement.

Parmi les modifications post-synthèses connues qui pourraient être appliquées à la chimie peptidique, les réactions de SM, de Heck, et de Stille sont particulièrement intéressantes parce qu'elles utilisent un catalyseur de Pd(0) qui est relativement inerte vis-à-vis la structure polyamide des peptides et qui est compatible avec leur caractère multifonctionnel (a) M. J. Burk, *et al.* 1994; b) O. Seitz, *et al.* 1995; c) J. H. Lai, *et al.* 1998; d) T. L. Hudgens, *et al.* 1999; e) S. Kotha, *et al.* 2001]. La réaction de SM est

actuellement exploitée en chimie combinatoire et à l'occasion, elle a aussi été utilisée afin de modifier des peptides en solution. La phénylalanine a d'ailleurs été fréquemment choisie comme échafaudage dans la synthèse combinatoire pour les études de type structure-activité. A ce jour, il ne semble pas y avoir d'études montrant l'utilisation de cette réaction afin de modifier des peptides lors de la synthèse en phase solide. La synthèse organique en phase solide offre plusieurs avantages par rapport aux méthodes en solution : rendement élevé grâce à l'utilisation de réactifs en excès, l'élimination des réactifs et des sous-produits par simple lavage, minimisation des pertes physiques lors de synthèse en plusieurs étapes et le processus est facilement automatisable. À cet égard, ce travail contribue au développement de l'utilisation de la réaction de SM dans la synthèse de peptides en phase solide. La mise au point de cet outil de synthèse sera un atout supplémentaire pour les études structure-activité des peptides.

Notre premier essai, effectué avec le $N\text{-}\alpha\text{-Fmoc-[Ala}^{1,2,3}, \text{Phe(pI)}^4, \text{Leu}^8\text{]Enk}$ -résine a donné 3 produits outre le produit initial $N\text{-}\alpha\text{-Fmoc-[Ala}^{1,2,3}, \text{Phe(pI)}^4, \text{Leu}^8\text{]Enk}$, soit le produit désiré $N\text{-}\alpha\text{-Fmoc-[Ala}^{1,2,3}, \text{BiP}^4, \text{Leu}^8\text{]Enk}$, aussi que les analogues $N\text{-}\alpha$ -déprotégés, $\text{H}_2\text{N-[Ala}^{1,2,3}, \text{Phe(pI)}^4, \text{Leu}^8\text{]Enk-OH}$ et $\text{H}_2\text{N-[Ala}^{1,2,3}, \text{BiP}^4, \text{Leu}^8\text{]Enk-OH}$. De tous ces produits, le $\text{H}_2\text{N-[Ala}^{1,2,3}, \text{Phe(pI)}^4, \text{Leu}^8\text{]Enk-OH}$ est le composé majoritaire du mélange, selon l'analyse du chromatogramme HPLC à l'échelle analytique. Sa formation peut être expliquée par le clivage prématuré du groupement protecteur Fmoc dans les conditions basiques utilisées pour la réaction de SM. La présence d'une amine non protégée peut retarder le cycle catalytique par la formation d'un complexe entre ce groupe fonctionnel libre et le palladium. La vérification de cette hypothèse a nécessité la

substitution du groupement Fmoc par Boc. Suite à l'enlèvement du groupement Fmoc par un mélange de pipéridine/DMF, le couplage du groupement Boc s'est effectué en utilisant le $(\text{Boc})_2\text{O}$ tel que présenté au Schéma 22.

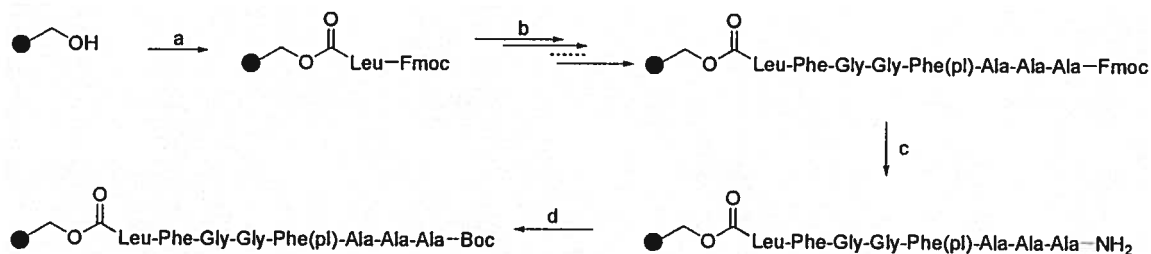


Schéma 22 : Synthèse de N,α -Boc-[Ala^{1,2,3}, Phe(pI)⁴, Leu⁸]Enk-résine

Conditions: **a**) 1. N,α -Fmoc-Leu-OH, pyridine, chlorure de 2,6-dichlorobenzoyle, DMF, 20 h, rt ; 2. chlorure de benzoyle, pyridine, DMF, 2h, rt ; **b**) 1. pipéridine/DMF (1 :4) 2 min, 15 min, rt; n fois; 2. N,α -Fmoc-AA-OH, BOP, DIEA, DMF, 1 h, rt ; **c**) pipéridine/DMF (1 :4) 2 min, 15 min, rt; **d**) $(\text{Boc})_2\text{O}$, DIEA, DMF, 2 h, rt.

Lors de synthèses combinatoires de dérivés de phénylalanine par la réaction de SM en phase solide, Colombo *et al.* [Colombo A., *et al.* 2005] ont trouvé que le lien ester entre le résidu C-terminal et le support solide est facilement hydrolysé sous les conditions basiques de la réaction. Nous avons vérifié la présence de peptides dans la solution réactionnelle par spectrométrie de masse. Aucune trace de peptide libre n'a été détectée, de sorte que la résine Wang semble être un support adéquat pour les chaînes peptidiques dans les conditions de la réaction de SM. Ainsi, le peptide N,α -Boc-[Ala^{1,2,3}, Phe(pI)⁴, Leu⁸]Enk supporté sur une résine de polystyrène de type Wang est apparu comme un modèle approprié de peptide-résine pour déterminer les conditions optimales de la réaction de SM.

A cette fin, l'influence de la base, du solvant, du catalyseur, de la température et du temps de réaction sur le rendement réactionnel a été étudiée. L'acide phénylboronique a été utilisé pour cette optimisation. Le taux de conversion a été calculé en utilisant le pourcentage l'aire sous la courbe des produits désirés et initiaux tel qu'observé par des profils HPLC analytiques du produit brut (UV à 212 nm).

Six bases différentes, K_3PO_4 , NaOH, Na_2CO_3 , KOAc, $CsHCO_3$ et DIEA ont été évaluées. Ainsi, le DMF a été choisi comme solvant à cause de sa bonne propriété de gonflement de polystyrène. Le tétrakis $Pd(PPh_3)_4$ a été également utilisé en tant que catalyseur et la réaction s'est effectuée pendant 20 h à 55 °C, avec agitation sous une atmosphère d'azote. Les résultats ont indiqué que la réaction s'effectue très bien dans ces conditions, avec le K_3PO_4 ou le Na_2CO_3 comme base, avec des rendements de 88% et 75% respectivement. Ces résultats concordent bien avec les données déjà rapportées dans la littérature. En effet, la pureté et la sélectivité des produits obtenus suite à la réaction de SM dépendent de la base et du catalyseur utilisés [a) Miyaura, N. *et al.* 1979; b) Miyaura, N. *et al.* 1985]. De plus, des bases fortes comme le NaOH, le KOH ou le $NaOCH_3$ donnent de bons résultats dans l'eau ou dans un mélange d'eau et de THF (tétrahydrofurane), alors que des bases plus faibles comme le K_2CO_3 , le K_3PO_4 et le Na_2CO_3 sont normalement utilisées dans du DMF [Echavarren, AM. *et al.* 2004]. Les bases peuvent être utilisées en solution aqueuse ou en suspension dans des solvants organiques. Par contre, la résine de polystyrène utilisée dans cette étude était extrêmement hydrophobe, l'eau ne peut être utilisée comme solvant.

Le gonflement d'une résine dans le mélange réactif est un facteur important en synthèse organique sur phase solide. Généralement, plus la résine est gonflée dans un solvant plus la réaction est favorisée. À cet égard, nous avons étudié l'influence du solvant sur la réaction de SM en phase solide en utilisant le: DMF, NMP, DMSO, THF et 1,4-dioxane. Toutes les réactions ont été effectuées à 55 °C en présence de K_3PO_4 et $Pd(PPh_3)_4$, pendant 20 h. Le fait que les réactions réalisées dans le THF et le 1,4-dioxane n'aient pas donné de bons rendements, n'a pas été outre mesure surprenant. Par contre, l'utilisation du NMP, un excellent solvant en synthèse peptidique, n'a pas donné un rendement adéquat. De plus, des mélanges de NMP/DMSO (4:1) ou de NMP/DMF (1:1), qui sont des solvants efficaces pour la synthèse peptidique en phase solide sur résine de polystyrène, étant donné leur pouvoir de solvation, ont également donné des rendements insuffisants. En fait, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le DMF avec 88% de conversion. Ce résultat s'accorde bien avec les résultats retrouvés dans la littérature.

Le choix du catalyseur est également crucial. Il faut prendre en considération la réactivité du catalyseur, sa propension à favoriser des réactions secondaires et son coût en fonction entre autres de la facilité à le régénérer. $Pd(PPh_3)_4$ est le catalyseur le plus communément utilisé dans ces réactions. Bien que, $Pd(OAc)_2$ et $PdCl_2$ /phosphine sont aussi utilisés afin de générer un catalyseur de palladium(0) facilement réduit *in situ*. Dans ce travail, trois catalyseurs différents ont été évalués, soit : $Pd(PPh_3)_4$, $PdCl_2(PPh_3)_2$ et $PdCl_2/2.PCy_3$. De bons rendements ont été obtenus avec le $Pd(PPh_3)_4$ et le $PdCl_2(PPh_3)_2$, mais l'utilisation du $PdCl_2(PPh_3)_2$ comme catalyseur a emmené la formation de produits secondaires.

D'autre part, le PdCl₂ est considéré comme un catalyseur faible mais la présence du ligand PCy₃ augmente généralement sa réactivité. Malgré cela, des résultats médiocres ont été obtenus avec ce catalyseur. Pourtant, Shen *et al.* [Shen, W. 1997] ont démontré que la tricyclohexylphosphine (PCy₃) peut faciliter l'étape d'addition oxydante du cycle catalytique et favoriser la formation du complexe catalytique actif de monophosphine de palladium(0). De plus, des études récentes ont montré que la tricyclohexylphosphine (PCy₃) est un ligand très efficace dans la réaction de SM dans des conditions douces. Le faible rendement obtenu dans la présente (45%) pourrait être expliqué par la solubilité limitée du PdCl₂ dans le DMF.

Afin de déterminer le temps nécessaire à la réaction, des échantillons de peptide-résine ont été prélevés après 4 h, 8 h, 12 h, 24 h et 48 h de réaction. Les résultats ont montré qu'après 20 h, 88% des produits ont été transformés et qu'un temps de réaction plus long n'augmentait pas de manière significative le rendement de la réaction.

Finalement, afin de déterminer la température optimale pour la modification en phase solide de *N*- α -Boc-[Ala^{1,2,3}, Phe(*p*)⁴, Leu⁸]Enk, la réaction a été effectuée à des températures variant entre 25 et 90 °C, en présence de Pd(PPh₃)₄ et de K₃PO₄, dans du DMF pendant 20 h. La conversion du produit initial s'est bien déroulée à des températures se situant entre 55 °C et 90 °C, avec des rendements supérieurs à 75%. Par contre, à 90 °C, on observe également la formation de produits secondaires.

Nous avons développé une stratégie applicable pour la modification en phase solide des peptides par la réaction de SM. Puisque les peptides contiennent des groupements réactifs qui pourraient interférer avec la réaction de SM, il est plus approprié d'exécuter celle-ci en phase solide tandis que tous les groupements des chaînes latérales du peptide sont protégés. Nous avons constaté que le groupement protecteur Fmoc n'était pas stable dans les conditions utilisées. Une fois optimisées les conditions par l'utilisation du DMF comme solvant, du K_3PO_4 ou du Na_2CO_3 comme base et de $Pd(PPh_3)_4$ comme catalyseur pour une réaction de 20 h à 80 °C, nous avons poursuivi notre étude avec l'évaluation des rendements de différents acides boroniques. Puisque le K_3PO_4 forme difficilement une suspension dans le DMF, nous avons préféré dans certain cas l'usage du Na_2CO_3 . De même, le $PdCl_2(PPh_3)_2$ a également été employé pour certaines réactions.

L'étude a donc été élargie par l'analyse du comportement de la réaction de SM lors de substitutions par divers d'acides boroniques contenant des groupements électro-donneurs ou électro-attracteurs. Il semble que les dérivés de l'acide phénylboronique possédant un groupement électro-attracteur sur le cycle aromatique soient plus réactifs que ceux avec un groupement électro-donneur. En effet, l'acide 4-méthoxyphénylboronique a été complètement inactif dans ces conditions, tandis que le couplage avec l'acide 4-méthylcarboxyphénylboronique a obtenu 87% de conversion. De plus, le couplage avec l'acide 3-aminophénylboronique donne un faible rendement, tandis que l'introduction d'un groupement NO_2 à la position *mé*ta du cycle aromatique de l'acide phénylboronique donne une excellente conversion (98%). Aucune réaction n'est produite avec l'acide carboxyphénylboronique, mais la protection du groupement carboxyle a permis de faire

passer le rendement à 87%. Ces résultats semblent indiquer que la nature de l'acide boronique à coupler peut déterminer la vitesse de formation du complexe actif formé par l'acide lui-même, le palladium et son ligand. Enfin, toutes les tentatives pour effectuer la réaction avec l'acide mercapto-phénylboronique n'ont pas réussi. La forte thiophilicité du palladium suivi de l'empoisonnement du catalyseur par l'atome de soufre est probablement à l'origine de ce phénomène.

Ces conditions ont également été appliquées en synthèse de dérivés hétéroaromatiques de $H_2N-[Ala^{1,2,3}, Leu^8]Enk-OH$. En théorie, l'acide 4- ou 2-pyridineboronique devrait favoriser davantage l'addition oxydante qui est normalement l'étape déterminante de la réaction, que l'acide 3-pyridineboronique, en raison de la plus grande électronégativité de l'atome d'azote une fois situé en position *para*. Toutefois, les résultats ont montré que l'acide 3-pyridineboronique donne un rendement de conversion beaucoup plus élevé, avec 94% de transformation, tandis que l'acide 4-pyridineboronique s'est révélé complètement inactif dans des conditions similaires. Un résultat semblable a déjà été décrit dans la littérature. En effet, Phan N.T.S. *et al.* ayant effectué la réaction de SM entre l'acide phénylboronique et des bromo-aryles, ont observé que celle-ci s'effectue très bien avec le 3-bromopyridine tandis que le 2-bromo-pyridine était presque inactif [a) Phan, N.T.S. *et al.* 2005; b) Yamada, Y.M.A. *et al.* 2003; c) Grushin, V.V. and Alper, H. 1994]. Cette même tendance dans la réactivité entre des isomères aux positions 2- et 3- a également été observée par d'autres groupes de recherche, bien que la différence de réactivité entre les deux isomères de la pyridine ait été beaucoup moins significative [a) Feuerstein, M. *et al.* 2001; b) Parry, P. R. *et al.* 2002; c) Molander, G. A. *et al.* 2003; d)

Feuerstein, M. *et al.* 2003]. Il est alors possible que les isomères 2- et 4- de la pyridine soient capables de former un complexe avec le catalyseur de palladium et empêchent ainsi le couplage de SM. Il est intéressant de noter que des résultats similaires ont été observés avec l'acide 2-furaneboronique (60% de conversion) et l'acide 3-furaneboronique (presqu'inactif). Le couplage de l'acide 2-thiophèneboronique a donné un rendement élevé sous les conditions optimales de la réaction de SM (72%). Néanmoins, la formation de produits secondaires en quantité appréciable a aussi été observée. Il est possible qu'une interaction entre le substrat et l'atome métallique survienne pendant un des états de transition du cycle catalytique, ce qui provoquerait l'apparition de ces sous-produits. Cependant, le processus réactionnel complet reste toujours à élucider. Enfin, la réaction de SM avec des acides alkylboroniques a également été étudiée sur l'iodo-peptide-résine. Les résultats obtenus indiquent que l'acide *trans*-2-chlorométhylvinylboronique est facilement couplé tandis que l'acide 2-méthylvinylboronique donne seulement 10% de conversion.

Des résultats similaires ont été obtenus pour la modification en phase solide de *N*- α -Boc-[Ala^{1,2,3}, Leu⁸]Enk-résine à la position Phe⁷. Par contre, il semble qu'il y ait un encombrement stérique qui désavantage la réaction de SM lors de modifications à la position Phe⁷. En effet, le rendement des conversions obtenues avec cette position est plus bas que celui observé lors des modifications effectuées en position Tyr⁴.

En conclusion, ce procédé général pourrait être appliqué à la synthèse en phase solide de bibliothèques d'analogues peptidiques modifiés sur un résidu de phénylalanine. En

conséquence, une appréciation plus globale de la stratégie doit être réalisée et c'est pourquoi des études additionnelles ont ensuite été poursuivies avec des peptides plus complexes, afin de vérifier la compatibilité de la méthode de SM avec des séquences de peptide contenant des acides aminés sensibles tels que la méthionine, la cystéine, l'histidine et le tryptophane. La réaction a d'abord été effectuée dans les conditions optimales trouvées préalablement avec le peptide *N*- α -Boc-[Cys(Acm)^{11,15}, Phe(*p*I)¹³]ET-1(9-21) lié à une résine de polystyrène de type Wang. Les études initiales ont indiqué que le groupement protecteur Acm n'était pas stable dans les conditions de la réaction de SM. Ce phénomène peut être expliqué par le clivage du groupement protecteur Acm en présence du Pd(0), ce qui libère le groupe SH de la Cys qui est alors capable d'empoisonner le catalyseur de palladium, ce qui bloque la réaction. L'étude des groupements protecteurs pouvant être appliqués à la réaction de SM a aussi été réalisée avec des peptides modèles contenant des résidus Cys porteur de groupements protecteurs différents. De plus, des peptides courts contenant les résidus Met, His ou Trp ont également été synthétisés afin d'étudier leur influence et donc leur compatibilité avec la réaction de SM dans la modification de peptides complexes. La réaction s'est bien déroulée avec les peptides contenant Met, Cys ou His tandis que le mélange de peptides après la réaction de SM impliquant avec le peptide contenant le Trp ne contenait pas le peptide attendu. En fait, un peptide non désiré, possédant une masse de 34 Da inférieure à celle du produit attendu a été produit. Un résultat similaire a également été obtenu avec le peptide *N*- α -Boc-[Phe(*p*I)¹³]ET-1(9-21).

Étant donné que la même réaction secondaire s'est produite en soumettant le peptide *N*- α -Boc-[Cys(Trt)^{11,15}, BiP¹³]ET-1(9-21) aux conditions de la réaction de SM, il peut être conclu que cette perte de masse s'effectue indépendamment de la présence du résidu Phe(I). Donc, la nature et l'endroit où se produit cette modification reste encore à être élucidée.

En terminant, le développement de conditions de la réaction de SM appropriées à toutes les séquences peptidiques est un objectif à atteindre afin d'augmenter les outils disponibles pour la modification post-synthèse des peptides.

References :

- Albericio F, Chinchilla R, Dodsworth DJ, Najera C: New trends in peptide coupling reagents. *Org Prep Proced Int* **2001**, 33:203-303.
- Albericio F. Solid-Phase Preparation of a Library Based on a Phenylalanine Scaffold. *QSAR Comb. Sci.* **2005**, 24(8) 913-922.
- Anderson JC, Namli H, Roberts CA. Investigations into ambient temperature biaryl coupling reactions. *Tetrahedron* **1997**, 53:15123.
- Annis I, Hargittai B., et Barany G. Disulfide bond formation in peptides, *Methods Enzymol.* **1997** ; 289 : 198-221.
- Anthony O. King and Nobuyoshi Yasuda. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions in the Synthesis of Pharmaceuticals. *Topics Organomet. Chem.* **2004**, 6: 205-245.
- Aratani N., Osuka A. Synthesis of *meso-meso* Linked Hybrid Porphyrin Arrays by Pd-Catalyzed Cross-Coupling Reaction. *Org. Lett.* **2001**, 3, 4213.
- Armstrong R.W., Beau J.-M, Cheon SH., Christ W.J., Fujioka H., Ham W.-H., Hawkins L. D., Jin H., Kang S. H., Kishi Y., Martinelli M. J., McWhorter W. J., Mizuno Jr., M., Nakata M., Stutz A. E., Talamas F. X., Taniguchi M., Tino J. A., Ueda K., Uenishi J.-I., White J. B., Yonaga M. Total synthesis of a fully protected. palytoxin carboxylic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 7525 – 7530.
- Armstrong R.W., Beau J.-M, Cheon SH., Christ W.J., Fujioka H., Ham W.-H., Hawkins L. D., Jin H., Kang S. H., Kishi Y., Martinelli M. J., McWhorter W. J., Mizuno Jr., M., Nakata M., Stutz A. E., Talamas F. X., Taniguchi M., Tino J. A., Ueda K., Uenishi J.-I., White J. B., Yonaga M. Total synthesis of palytoxin carboxylic acid and palytoxin amide. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 7530 – 7533.
- Baudoin O., Guenard D., Gueritte F. Palladium-Catalyzed Borylation of Ortho-Substituted Phenyl Halides and Application to the One-Pot Synthesis of 2,2'-Disubstituted Biphenyls. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 9268.
- Bellina F., Carpita A., Rossi R. Palladium Catalysts for the Suzuki Cross-Coupling. *Synthesis* **2004**, 15, 2419-2440.

- Blaydes JP., Vojsek B., Bloomberg GB., Hupp TR. The development and use of phospho-specific antibodies to study protein phosphorylation. *Methods Mol. Biol.* **2000** ; 99 : 177-189.
- Bo Z., Qiu J., Schluter AD. Synthesis of Aryl/Alkyl Building Blocks for Dendrimer and Hyperbranched Polymer Synthesis. *Org. Lett.* **2004**, 6(5):667-669.
- Boger D. L., Miyazaki S., Kim S. H., Hu J. W., Loiseleur O., Castle S. L. Diastereoselective Total Synthesis of the Vancomycin Aglycon with Ordered Atropisomer Equilibriations. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3226 – 3227.
- Boojamra C.G., K.M. Burowand Ellman J.A. An expedient and high-yielding method for the solid-phase synthesis of diverse 1,4-benzodiazepine-2,5-diones. *J. Org. Chem.* **60**, **1995**, 5742.
- Borek, F.; Stupp, Y.; Fuchs, S.; Sela, M. Relation between optical configuration and immunogenicity of synthetic polypeptides. *Biochem. J.* **1965**, 96, 577-582.
- Bringmann G, Götz R, Keller PA, Walter R, Boyd MR, Lang F, Garcia A, Walsh JJ, Tellitu I, Bhaskar KV, Kelly TR. A Convergent Total Synthesis of the Michellamines. *J Org Chem* **1998**, 63:1090.
- Brown HC., Molander GA. Vinylic organoboranes. 2. Improved procedures for the protonolysis of alkenyldialkylboranes providing a simplified stereospecific synthesis of (Z)-alkenes. *J Org Chem* **1986**, 51:4512.
- Burk, M. J. Lee, J. R. Martínez, J. P. A Versatile Tandem Catalysis Procedure for the Preparation of Novel Amino Acids and Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 10847-10848.
- Carpino L, El-Faham A, Minor CA, Albericio F: Advantageous applications of azabenzotriazole (triazolopyridine)-based coupling reagents to solid-phase peptide synthesis. *Chem Comm* **1994**: 201-203.
- Carpino LA, El-Faham A: Tetramethylfluoroformamidinium hexafluorophosphate: a rapid-acting peptide coupling reagent for solution and solid phase peptide synthesis. *J Am Chem Soc* **1995**, 117, 5401-5402.
- Carpino LA, Ionescu D, El-Faham A, Beyermann M, Henklein P, Hanay C, Wenschuh H, Bienert M: Complex polyfluoride additives in Fmoc-amino acid fluoride coupling

- processes. Enhanced reactivity and avoidance of stereomutation. *Org Lett* **2003**, *5*, 975-977.
- Carpino LA, Xia J, El-Faham A: 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-5-azabenzotriazole. *J Org Chem* **2004**, *69*: 54-61.
- Chorev, M.; Goodman, M. A dozen years of retro-inverso peptidomimetics. *Acc. Chem. Res.*, **1993**, *26*, 266-273.
- Chorev, M.; Goodman, M. Recent developments in retro peptides and proteins--an ongoing topochemical exploration. *Trends Biotechnol.*, **1995**, *13*, 438-445.
- Chi, S. M.; Choi, J.-K.; Yum, E. K.; Chi, D. Y. Palladium-catalyzed functionalization of 5- and 7-azaindoles. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 919.
- Collier, P. N.; Patel, I.; Taylor, R. J. K. A concise, stereoselective synthesis of meso-2,6-diaminopimelic acid (DAP). *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5953.
- Collier, P. N.; Campbell, A. D.; Patel, I.; Taylor, R. J. K. The direct synthesis of novel enantiomerically pure alpha-amino acids in protected form via Suzuki cross-coupling. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7115.
- Collis GE., Burrell AK., Officer DL. β -Terthiophene aldehyde and phosphonate: key building blocks for the synthesis of functionalised conducting polymers. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8733.
- Colombo A., Fernandez JC., de la Figuera N., Fernandez-Fornier D., Forns P., and Echavarren, AM.; Cardenas, DJ. *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions*, 2nd Edition. **2004** WILEY-VCH Verlage GmbH&Co. KGaA, Weinheim. ISBN 3-257-30518-1.
- Corbet JP., Mignani G. *Selected Patented Cross-Coupling Reaction Technologies*, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2651-2710.
- Dai WM., Mak WL. Enantioselective epoxidation of olefins catalyzed by two novel chiral poly-salen-Mn(III) complexes. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 10277.
- Dang TT., Rasool N., Dang TT., Reinke H., Langer P. Synthesis of tetraarylthiophenes by regioselective Suzuki cross-coupling reactions of tetrabromothiophene. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 845-847.
- Dupont J., Pfeffer M., Spencer J. Co-ligand involvement in ground and excited states of electron rich polypyridyl platinum(II) complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, 1917.

- Farina V., Krishnamurthy V., Scott W. J. In *Organic Reactions*; Paquette, L. A., Ed.; John Wiley & Sons: Inc.: New York, **1997**; pp 1-652.
- Fernandez J-C., Sole-Feu L., Fernandez-Forner D., de la Figuera N., Fornes P., Albericio F. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 581-585.
- Fraley M.E. and Rubino R.S. Suzuki coupling reaction for the solid-phase preparation of 5-substituted nicotinic acid derivatives. *Tetrahedron Lett.* **38**, 3365 (**1997**).
- Frenette R., Friesen R.W. Biaryl synthesis via Suzuki coupling on a solid support. *Tetrahedron Lett.* **35**, **1994**, 9177.
- Feuerstein M., Doucet H., Santelli M. Efficient coupling of heteroaryl bromides with arylboronic acids in the presence of a palladium-tetrakisphosphine catalyst. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*(33), 5659-5662.
- Feuerstein M., Doucet H., Santelli M. Efficient coupling of heteroaryl halides with arylboronic acids in the presence of a palladium-tetrakisphosphine catalyst. *J. Organomet. Chem.* **2003**, *687*, 327-336.
- Furstner A., Kennedy J. W. J. Total Syntheses of the Tylophora Alkaloids Cryptopleurine, (-)-Antofine, (-)-Tylophorine, and (-)-Ficuseptine C. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*(28), 7398-7410.
- Gill, T. J.; Hanna, J. G.; Doty, P. Role of Optical Isomers in Determining the Antigenicity of Synthetic Polypeptides. *Nature*, **1963**, *197*, 746-747.
- Gong, Y.; He, W. Direct synthesis of unprotected 4-aryl phenylalanines via the Suzuki reaction under microwave irradiation. *Org. Lett.* **2002**, *4* (22), 3803-3805.
- Goodman, M.;Ro, S. In *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*; Wolff, M. E., Ed.; John Wiley and Sons, Inc: New York, **1995**; Vol. 20, pp. 803-861.
- Goodson FE., Wallow TI., Novak BM. Mechanistic Studies on the Aryl-Aryl Interchange Reaction of $ArPdL_2I$ (L = Triarylphosphine) Complexes. *J Am Chem Soc* **1997**, *119*:12441.
- Goodson FE., Wallow TI., Novak BM. Application of "Transfer-Free" Suzuki Coupling Protocols toward the Synthesis of "Unambiguously Linear" Poly(*p*-phenylenes). *Macromolecules* **1998**, *31*:2047.

- Grasa G. A., Viciu M. S., Huang J., Zhang C., Trudell M. L., Nolan S. P. Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions mediated by palladium/imidazolium salt systems. *Organometallics* **2002**, *21*, 2866.
- Gregory J. Capitosti, Carol D. Guerrero, David E. Binkley, Cheruvallil S. Rajesh, and David A. Modarelli. Efficient Synthesis of Porphyrin-Containing, Benzoquinone-Terminated, Rigid Polyphenylene Dendrimers. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 247-261.
- Grushin V.V. and Alper H. Transformation of chloroarenes, catalyzed by transition-metal complexes. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 1047-1062.
- Grushin VV. Thermal Stability, Decomposition Paths, and Ph/Ph Exchange Reactions of $[(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{Pd}(\text{Ph})\text{X}]$ (X = I, Br, Cl, F, and HF_2). *Organometallics* **2000**, *19*:1888.
- Guiles JW., Johnson, SG. and Murray, WV. Solid-Phase Suzuki Coupling for C-C Bond Formation. *J. Org. Chem.* *61*, **1996**, 5169.
- Haug, BE.; Stensen, W.; Svendsen, JS. Application of the Suzuki-Miyaura cross-coupling to increase antimicrobial potency generates promising novel antibacterials. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, *17*(8), 2361–2364.
- Herrmann W. A., Böhm V. P. W., Reisinger C.-P. Application of palladacycles in Heck type reactions. *J. Organomet. Chem.* **1999**, *576*, 23.
- Hird M., Seed AJ., Toyne KJ. Novel and unexpected deamination during the palladium-catalysed cross-coupling of haloanilines and arylboronic acids. *Synlett* **1999**, 438.
- Hobbs P. D., Upender V., Liu J., Pollart D. J., Thomas D.W., Dawson M. I. The first stereospecific synthesis of michellamine B. *Chem. Commun.* **1996**, 923–924.
- Hoye TR, Chen M, Hoang B, Mi L, Priest OP. Total Synthesis of Michellamines A-C, Korupensamines A-D, and Ancistrobrevine B. *J Org Chem* **1999**, *64*:7184.
- Hua DH., McGill JW., Ueda M., Stephany HA. *J. Organomet. Chem.* **2001**, *637*, 832.
- Hudgens, T. L., Turnbull, K. D. C-methylation of phenols, tyrosine derivatives, and a tyrosine containing peptide. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2719-2722.
- Jie Yan , Min Zhu, Zhongshi Zhou. Rapid microwave-promoted catalyst- and base-free suzuki-type coupling reaction in water. *Chemistry*, **2006**, *9*, 2060-2062.
- Johnson CN., Stemp G., Anand N., Stephen SC., Gallagher T. Palladium(0)-Catalysed Arylations using Pyrrole and Indole 2-Boronic Acids. *Synlett* **1998**, 1025.

- Johnson CR., Braun MP. A two-step, three-component synthesis of PGE1: utilization of .alpha.-iodo enones in Pd(0)-catalyzed cross-couplings of organoboranes. *J Am Chem. Soc* **1993**, 115:11014.
- Johnson JA., Sames D. C-H Bond Activation of Hydrocarbon Segments in Complex Organic Molecules: Total Synthesis of the Antimitotic Rhazinilam. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6321.
- Kaiser, E. *et al.* "Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides", *Anal. Biochem.*, vol. 34, pp. 595-598 (**1969**).
- Kates, S. A.; Solé, N. A.; Albericio, F.;Barany, G. In *Peptides: Design, synthesis, and biological activity* ; Basava, C. and Anantharamaiah, G. M., Ed.; Birkhäuser: Boston, **1994**; Vol. 4, pp. 39-58; Wiley, R. A.
- Karl Matos and John A. Soderquist. Alkylboranes in the Suzuki-Miyaura Coupling: Stereochemical and Mechanistic Studies. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 461-470.
- Kawanaka Y, Ono N, Yoshida Y, Okamoto S, Sato F. *J Chem. Soc, Perkin Trans.* **1996**, 1 715.
- Kotha, S.; Lahiri, K. A new approach for modification of phenylalanine peptides by Suzuki-Miyaura coupling reaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 2887-2890.
- Kotha, S.; and Lahiri. K. Application of the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction for the modification of phenylalanine peptides. *Biopolymers*, **2003**, 69, 517-528.
- Kothare MA., Ohkanda J., Lockman JW., Qian Y., Blaskovich MA., Sebt SM., Hamilton AD. Development of a Tripeptide Mimetic Strategy for the Inhibition of Protein Farnesyltransferase. *Tetrahedron* **2000**, 56, 9833.
- Kuvila HG., Reuwer JF., Mangravite JA. Photolytic Decomposition of Aryldiazonium Salts. The *p*-Dimethylaminophenoxy Radical. *J Am Chem Soc* **1964**, 86:2666.
- Kuvilla HG., Nahabedian KV. Electrophilic Displacement Reactions. X. General Acid Catalysis in the Protodeboronation of Areneboronic Acids¹⁻³, (2159-2163), XI. Solvent Isotope Effects in the Protodeboronation of Areneboronic Acids¹⁻³, (2164-2166), XII. Substituent Effects in the Protodeboronation of Areneboronic Acids¹⁻³, (2167-2174). *J Am Chem Soc* **1961**, 83.
- Marx V: Watching peptide drugs group up. *Chem Eng News*, **2005**, 83(11),17-24.

- Majo VJ., Prabhakaran J., Mann JJ., and Kumar JSD. An efficient palladium catalyzed synthesis of 2-arylbenzothiazoles. *Tetrahedron Letters*, 44 (47), **2003**, 8535-8537.
- McClure MS., Glover B., McSorley E., Millar A., Osterhout MH., Roschangar F. Regioselective Palladium-Catalyzed Arylation of 2-Furaldehyde. *Org. Lett.* **2001**, 3, 1677.
- McClure MS., Roschangar F., Hodson SJ., Millar A., Osterhout MH. A Practical One-Pot Synthesis of 5-Aryl-2-Furaldehydes. *Synthesis* **2001**, 1681.
- McElroy WT., DeShong P. Synthesis of the CD-ring of the anticancer agent streptonigrin: studies of aryl-aryl coupling methodologies. *Tetrahedron* 62, **2006**, (29), 6945-6954.
- Meketa ML., Weinreb SM. Total Synthesis of Ageladine A, an Angiogenesis Inhibitor from the Marine Sponge *Agelas nakamura*. *Org. Lett.* **2006**, vol 8, No 7, 1443-1446.
- Milouin M.N., Kosti M.N. Palladium(II) Complex as a Sequence-Specific Peptidase: Hydrolytic Cleavage under Mild Conditions of X-Pro Peptide Bonds in X-Pro-Met and X-Pro-His Segments. *JACS* **2003**, 125, 781-788.
- Miyachi N., Yanagawa Y., Ywasaki H., Ohara Y., Hiyama T. A novel synthetic method of HMG-CoA reductase inhibitor NK-104 via a hydroboration-cross coupling sequence. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34 : 8267.
- Miyaura, N.; Yamada, Y.; Suzuki, A. A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 3437-3440.
- Miyaura, N.; Yamada, Y.; Suginome, H.; Suzuki, A. Novel and Convenient Method for the Stereospecific and Regiospecific Synthesis of Conjugated Alkadienes and Alkynes Via the Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of 1-Alkenylboranes with Bromoalkenes and Bromoalkynes. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 972-980.
- Miyaura N, Ishiyama T, Sasaki H, Ishikawa M, Satoh M, Suzuki A. Palladium-catalyzed inter- and intramolecular cross-coupling reactions of B-alkyl-9-borabicyclo[3.3.1]nonane derivatives with 1-halo-1-alkenes or haloarenes. Syntheses of functionalized alkenes, arenes, and cycloalkenes via a hydroboration-coupling sequence. *J Am. Chem. Soc* **1989**, 111: 314.

- Miyaura N., Suzuki A. *Main Group Met. Chem.* **1987**, 295.
- Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483.
- Miyaura, N. *Advances in Metal-organic Chemistry*; Libeskind, LS. (Ed) Jai: London, **1998**, vol. 6, 187-243.
- Miyaura N. Organoborones. *Top. Curr. Chem.* **2002**, 219, 11.
- Molander G. A., Biolatto B. Palladium-Catalyzed Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions of Potassium Aryl- and Heteroaryltrifluoroborates. *J. Org. Chem.* **2003**; 68(11); 4302-4314.
- Muzzi CM., Medforth CJ., Voss L., Cancilla M., Lebrilla C., Ma JG., Shelnutt JA., Smith KM. Synthesis and characterization of 1,4-dichlorospiropentadiene. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 6159.
- Lai J. H., Marsilje T. H., Choi S., Nair S. A., Hangauer D. G. The Design, Synthesis and Activity of Pentapeptide pp60c-src Inhibitors Containing L-phosphotyrosine Mimics. *J. Pept. Res.* **1998**, 51, 271-281.
- Lakshman MK., Keeler JC., Hilmer JH., Martin JQ. Palladium-Catalyzed C-N Bond Formation: Facile and General Synthesis of *N*⁶-Aryl 2'-Deoxyadenosine Analogues. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6090.
- Lakshman MK., Hilmer JH., Martin JQ., Keeler JC., Dinh YQV., Ngassa FN., Russon LM. Palladium Catalysis for the Synthesis of Hydrophobic C-6 and C-2 Aryl 2'-Deoxynucleosides. Comparison of C-C versus C-N Bond Formation as well as C-6 versus C-2 Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7779.
- Lange UEW., Braje WM., Amberg W, Ketschau G. Solid-Phase synthesis of endothelin receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 1721-1724.
- Larhed M., Lindeberg G., and Hallberg A. Rapid microwave-assisted Suzuki coupling on solid-phase. *Tetrahedron Lett.* **37**, **1996**, 8219.
- Larsen, RD *et al.* A convenient catalyst system for microwave accelerated cross-coupling of a range of aryl boronic acids with aryl chlorides. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 6391-6394.
- Larsen, RD *et al.* Efficient Synthesis of Losartan, A Nonpeptide Angiotensin II Receptor Antagonist. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 6391-6394.

- Lee C-W., Chung YJ. Facile synthesis of 3-arylpyrroles by tandem Suzuki-dehydrogenation reaction. *Tetrahedron Lett* **2000**, 41:3423.
- Lloyd-Williams P, Albericio F, Giralt E: Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins. Boca Raton, Florida: CRC; **1997**.
- Lötter A.N.C., Pathak R., Sello TS., Fernandes MA., van Otterlo WAL., and de Koning CB. Synthesis of the dibenzopyrrocoline alkaloid skeleton: indolo[2,1-a]isoquinolines and related analogues. *Tetrahedron*, **63**(10), **2007**, 2263-2274.
- Nakamura, H.; Fujiwara, M.; Yamamoto, Y. A Practical Method for the Synthesis of Enantiomerically Pure 4-Borono-L-phenylalanine. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2000**, **73**, 231-235.
- Nicolaou KC., Natarajan S., Hui Li, Jain NF., Hughes R., Solomon M.E., Ramanjulu J. M., Boddy C. N. C., Takayanagi M. Total Synthesis of Vancomycin Aglycon - Part 1: Synthesis of Amino Acids 4-7 and Construction of the AB-COD Ring Skeleton. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, **37**(19), p. 2708-2714. Part 2: Synthesis of Amino Acids 1-3 and Construction of the AB-COD-DOE Ring Skeleton. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, **37**(19), p. 2714-2716.
- Nicolaou LC., Bulger BG., Sarlah D. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions in Total Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, **44**, 4442-4489.
- Ojia Skaff, Jolliffe KA., Hutton CA. Synthesis of the Side Chain Cross-Linked Tyrosine Oligomers Dityrosine, Trityrosine, and Pulcherosine. *J. Org. Chem.*; **2005**, **70**(18), 7353-7363.
- Ojida A. , Tsutsumi H., Kasagi N., Hamachi I. Suzuki coupling for protein modification. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, **46**, 3301-3305.
- Old DW., Wolfe JP., Buchwald SL. A Highly Active Catalyst for Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions: Room-Temperature Suzuki Couplings and Amination of Unactivated Aryl Chlorides. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, **120**: 9722.
- Parry P. R., Wang C., Batsanov A. S., Bryce M. R., Tarbit B. Functionalized Pyridylboronic Acids and Their Suzuki Cross-Coupling Reactions To Yield Novel Heteroarylpyridines. *J. Org. Chem.*; **2002**; **67**(21); 7541-7543.
- Pietre S.R. and Baltzer S. A new approach to the solid-phase Suzuki coupling reaction. *Tetrahedron Lett.* **38**, **1997**, 1197.

- Phan N.T.S., Khan, J. Styring, P. Polymer-supported palladium catalysed Suzuki–Miyaura reactions in batch and a mini-continuous flow reactor system. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 12065-12073.
- Portony M., Milstein D. Mechanism of aryl chloride oxidative addition to chelated palladium(0) complexes. *Organometallics* **1993**, *12*:1665.
- Poupart MA., Cameron DR., Chabot C., Ghire E., Goudreau N., Goulet S., Poirier M., Tsantrizos Y. S. Solid-Phase Synthesis of Peptidomimetic Inhibitors for the Hepatitis C Virus NS3 Protease. *J. Org. Chem.*; **2001**; *66*(14); 4743-4751.
- Thompson, L.A. ; Ellman, J.A. Synthesis and application of small molecule libraries. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555-600.
- Takakura H., Noguchi K., Sasaki M., Tachibana K. Synthetic Studies on Ciguatoxin: A Highly Convergent Synthesis of the GHIJKLM Ring System Based on B-Alkyl Suzuki Coupling. *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1124-1127; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1090-1093.
- Taylor PN., O'Connell MJ., McNeill LA., Hall MJ., Aplin RT., Anderson HL. Insulated Molecular Wires: Synthesis of Conjugated Polyrotaxanes by Suzuki Coupling in Water. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3456.
- Tse M. K., Zhou ZY., Mak TCW., Chan KS. Regioselective Bromination and Subsequent Suzuki Cross-Coupling of Highly Electron Deficient 5,10,15,20-Tetrakis(trifluoromethyl)porphyrin. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 7779.
- Rich, D. H. Peptidomimetics derived from natural products. *Med. Res. reviews*, **1993**, *13*, 327.
- Rossi R., Carpita A., Quirici MG. Dienic sex pheromones : Stereoselective syntheses of (7E,9Z)-7,9-dodecadien-1-yl acetate, (E)-9,11-dodecadien-1-yl acetate, and of (9Z), 11E)-9,11-tetradecadien-1-yl acetate by palladium-catalyzed reactions. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 2617-2673.
- Sabatino G, Mulinacci B, Alcaro MC, Chelli M, Rovero P, Papini AM: Assessment of new 6-Cl-HOBt based coupling reagents for peptide synthesis. Part 1: Coupling efficiency study. *Lett Peptide Sci* **2003**, *9*:119-123.

- Saito S., Kano T., Hatanaka K., Yamamoto H. 2,6-Bis(2-alkylphenyl)-3,5-dimethylphenol as a New Chiral Phenol with C_2 -Symmetry. Application to the Asymmetric Alkylation of Aldehydes. *J Org Chem* **1997**, 62:5651-5656.
- Sasaki M., Fuwa H., Inoue M., Tachibana K. New strategy for convergent synthesis of trans-fused polyether frameworks based on palladium-catalyzed Suzuki cross-coupling reaction. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 9027-9030.
- Sasaki M., Fuwa H., Ishikawa M., Tachibana K. A General Method for Convergent Synthesis of Polycyclic Ethers Based on Suzuki Cross-Coupling: Concise Synthesis of the ABCD Ring System of Ciguatoxin. *Org. Lett.* **1999**, 1, 1075-1077.
- Sasaki M., Noguchi K., Fuwa H., Tachibana K. Convergent synthesis of an HIJK ring model of ciguatoxin via Suzuki cross-coupling reaction. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 1425-1428.
- Schoevaers AM, Kruizinga W, Zijlstra RWJ, Veldman N, Spek AL, Feringa BL. Toward a Switchable Molecular Rotor. Unexpected Dynamic Behavior of Functionalized Overcrowded Alkenes. *J Org Chem* **1997**, 62: 4943.
- Seitz O., Kunz H. A novel allylic anchor for solid-phase synthesis-synthesis of protected and unprotected O-glycosylated Mucin-type glycopeptides. *Angew. Chem.* 1995, **107**, 901-903; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 803-805.
- Sewald, N.; Jakubke, HD. *Peptides: Chemistry and Biology*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2002**
- Shen W. Palladium catalyzed coupling of aryl chlorides with arylboronic acids. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5575-5578.
- Shuji Yasuike, Weiwei Qin, Yoshiyuki Sugawara and Jyoji Kurita. Suzuki-type cross-coupling reaction of pentavalent triarylantimony diacetates with arylboronic acids without a base. *Tetrahedron Letters*, 48(4), **2007**, 721-724.
- Spivey AC., Fekner T., Spey SE. Axially Chiral Analogues of 4-(Dimethylamino)pyridine: Novel Catalysts for Nonenzymatic Enantioselective Acylations. *J Org. Chem.* **2000**, 65:3154-3159.
- Suh E. M., Kishi Y. Synthesis of Palytoxin from Palytoxin Carboxylic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 11205 – 11206.

- Suzuki, A. Recent advances in the cross-coupling reactions of organoboron derivatives with organic electrophiles. *Organomet. Chem.* **1999**, *576*, 147-168.
- Suzuki, A. Cross-coupling reactions via organoboranes. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *653*, 83-90.
- Wallow T. I., Novak B. M. Highly Efficient and Accelerated Suzuki Aryl Couplings Mediated by Phosphine-Free Palladium Sources. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5034-5037.
- Watanabe T, Miyaura N, Suzuki A. Synthesis of Sterically Hindered Biaryls ... Acids or their Esters with Haloarenes. *Synlett* **1992**, 207-210.
- Watt PM. Screening for peptide drugs from the natural repertoire of biodiverse protein folds. *Nat Biotechnol* **2006**, *24*, 177-183.
- Weber, S. J.; Greene, D. L.; Sharma, S. D.; Yamamura, H. I.; Kramer, T. H.; Burks, T. F.; Hruba, V. J.; Hersh, L. B.; Davis, T. P. Distribution and analgesia of [3H][D-Pen2, D-Pen5]enkephalin and two halogenated analogs after intravenous administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1991**, *259*, 1109-1117.
- Weber, S. J.; Abbruscato, T. J.; Brownson, E. A.; Lipkowski, A. W.; Polt, R.; Misicka, A.; Haaseth, R. C.; Bartosz, H.; Hruba, V. J.; Davis, T. P. Assessment of an in vitro blood-brain barrier model using several [Met5]enkephalin opioid analogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1993**, *266*, 1649-1655.
- Weskamp T., Kohl F. J., Hieringer W., Gleich D., Herrmann W. Highly Active Ruthenium Catalysts for Olefin Metathesis: The Synergy of N-Heterocyclic Carbenes and Coordinatively Labile Ligands. *A. Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2416-2419.
- Wolfe JP., Singer RA., Yang BH., Buchwald SL. Highly Active Palladium Catalysts for Suzuki Coupling Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*:9550-9561.
- Wong KT., Wang CF., Chou CH., Su YO., Synthesis and Properties of Novel Thiophene-Based Conjugated Homologues: 9,9-Diphenylfluorene-Capped Oligothiophenes. *Org. Lett.* **2002**, *4*(25), 4439-4442.
- Wright SW., Hageman DL., McClure LD. Fluoride-Mediated Boronic Acid Coupling Reactions. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*: 6095-6097.
- Yamada Y.M.A., Takeda K., Takahashi H., Ikegami S. Highly Active Catalyst for the Heterogeneous Suzuki-Miyaura Reaction: Assembled Complex of Palladium and Non-Cross-Linked Amphiphilic Polymer. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7733-7741.

- Yan YY., Widhalm M. Synthesis and application of macrocyclic binaphthyl ligands with extended chiral bias. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 3607-3610.
- Yoburn JC., Vranken DLV. Synthesis of Dityrosine Cross-Linked Peptide Dimers Using the Miyaura-Suzuki Reaction. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2817-2820.
- Yoo S., Seo J., Yi K. and Gong Y. Triphenylphosphine/germanium(IV) chloride combination: A new agent for the reduction of α -bromo carboxylic acid derivatives. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *38*, 1203-1206.
- Yu L., Lindsey JS. Investigation of two rational routes for preparing p-phenylene-linked porphyrin trimers. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9285-9298.
- Yu MS., de Lyon LL., McGuire MA., Botha G. Synthesis of 2-dienylindole, SB 242784, by a three-component palladium-catalyzed coupling reaction. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*; 9347-9350.
- Zhang J., Xiong C., Wang W., Ying J., Hruby V. J., Stereoselective Bromination-Suzuki Cross-Coupling of Dehydroamino Acids To Form Novel Reverse-Turn Peptidomimetics: Substituted Unsaturated and Saturated Indolizidinone Amino Acids. *Org. Lett.*, **2002**, *4*(23), 4029 -4032.