

La RMN haute résolution à l'angle magique en chimie combinatoire

Guy Lippens*¹ chargé de recherche, **Jean-Michel Wieruszkeski*** ingénieur de recherche, **Ralf Warrass*** chercheur postdoctoral, **Pierre Rousselot-Pailley*** thésard, **Gérard Montagne*** technicien

Summary : *High resolution magic angle spinning NMR in combinatorial chemistry*

The development of rapid and robust analytical techniques is essential for the introduction of solid phase organic chemistry in the field of combinatorial chemistry. We describe here the technique of high resolution magic angle spinning NMR, which allows to obtain high quality homo- and heteronuclear spectra of resin bound molecules. Solvent signal suppression is possible through the diffusion filter, allowing a reaction monitoring without any purification step. The same method gives access to the detection and identification of impurities coming from secondary reactions on the resin. Finally, we evaluate the sensitivity criteria necessary for identification of the molecules on one individual bead.

Mots clés : *RMN HR MAS, chimie combinatoire, chimie organique en phase solide, suivi de réactions, impuretés.*

Key-words : *High resolution magic angle spinning (HR MAS) NMR, combinatorial chemistry, solid phase organic chemistry, reaction monitoring, impurity detection*

Les méthodes modernes de synthèse organique stéréosélective se trouvent au cœur de la découverte et du développement des médicaments. Afin de préparer les petites molécules qui seront des candidats médicaments pour demain, la chimie organique utilise des stratégies améliorées de synthèse, de meilleures méthodes de purification et des outils analytiques avancés. La synthèse organique en phase solide (SOPS), basée sur les idées originales de la synthèse peptidique en phase solide [1], contient des promesses pour augmenter d'une façon dramatique la diversité et le nombre de ces petites molécules [2].

SOPS est une méthode de choix pour la chimie combinatoire entre autre parce qu'elle mène facilement vers l'automatisation. Néanmoins, l'application de schémas de réaction connus en solution pour la chimie en phase solide n'est pas toujours évidente. A partir de cette expérience, il est clair que la détermination des conditions de réactions sera dans beaucoup de cas l'étape qui demandera le plus de temps, et ceci encore plus en chimie combinatoire où l'optimisation d'un schéma de réaction n'implique pas deux molécules mais deux classes de molécules.

Un désavantage important dans ce processus d'optimisation est le manque d'une méthode rapide et robuste pour analyser d'une façon quantitative les molécules sur le support solide, aussi bien pour les étapes intermédiaires que pour le produit final. L'analyse après coupure reste bien sûr possible, mais demande un investissement considérable en

temps. Pour des réactions plus complexes, la résonance magnétique nucléaire à haute résolution et à l'angle magique (RMN HR MAS) [3-8] se présente comme un nouvel outil analytique qui répond à cette question. En analysant les différentes étapes d'une banque combinatoire, Luo *et al.* ont démontré l'avantage décisif de la RMN HR MAS pour l'analyse des étapes plus complexes de la réaction [9] : avec les mêmes séquences d'impulsion que la RMN en solution, la méthode permet d'identifier tous les protons et carbones, comme la RMN en solution.

Après la publication initiale des spectres de bonne résolution d'une résine grâce à l'utilisation d'un gonflement correcte du gel et la rotation à l'angle magique (*cf. encadré*) [3-4], les groupes impliqués, dont le nôtre, ont cherché les critères physicochimiques du gonflement afin d'obtenir les meilleurs spectres. La conclusion basée sur l'expérience du chimiste est simple : le solvant qu'il utilise pour sa réaction est en général celui qui permet une bonne « injection de mobilité », et donc l'obtention de bons spectres. La mobilité rotationnelle des molécules sur le support solide n'est pas très différente de celle en solution, tandis que le polymère réticulé se comporte comme un vrai support solide, ce qui permet d'obtenir d'une façon sélective le spectre des premiers, tout en éliminant les signaux du polymère.

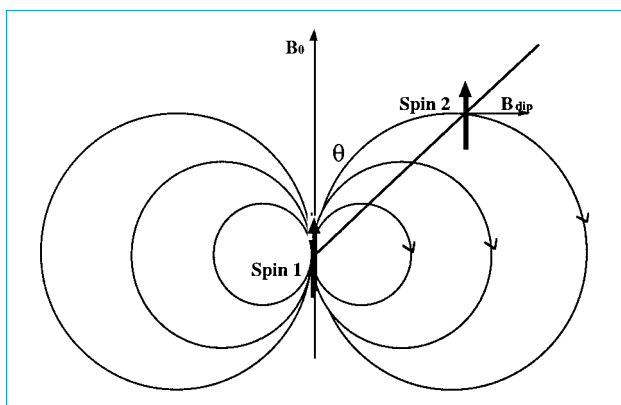
Nous avons montré que même avec une quantité de résine inférieure au milligramme (avec une charge normale de 0,4 mmole/g), on peut obtenir des spectres à une dimension satisfaisants dans la minute (*figure 1*). Dans une application classique de chimie combinatoire, on dispose facilement de plusieurs milligrammes de résine, et des spectres 2D (comme le TOCSY ou HSQC) peuvent être enregistrés en quelques heures, permettant une procédure d'identification

* UMR 8525, Institut de Biologie de Lille, Université de Lille II, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, BP 447, 59021 Lille Cedex.

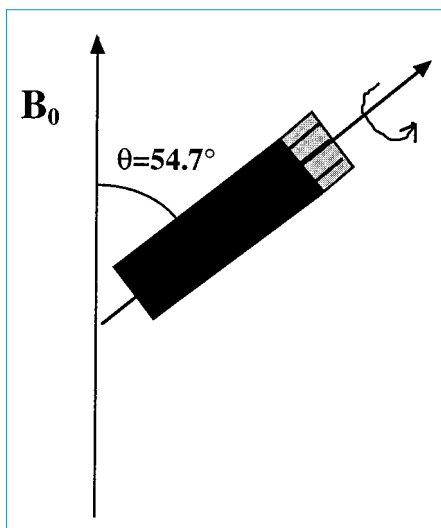
¹ Tél. : 03.20.87.12.29. Fax : 03.20.87.12.33.
E-mail : guy.lippens@pasteur-lille.fr

Encadré

La **qualité des spectres** obtenus sur les résines tient en ce que l'inhomogénéité présentée par l'échantillon de la résine, avec ses zones de polystyrène, de solvant, de molécule organique... peut être traitée formellement de la même façon que l'interaction dipolaire entre deux spins. Quand on représente le champs dipolaire graphiquement (voir ci-dessous), on s'aperçoit qu'il existe une orientation où il n'est pas nul (ce qu'il n'est qu'à l'infini), mais perpendiculaire à la direction imposée par le grand champs extérieur, réduisant ainsi à zéro l'interaction dipolaire, produit scalaire du champ et du moment magnétique associé au spin.



Lignes de champs dipolaire d'un spin 1 orienté selon la direction z de B_0 et à l'origine. Ce champs n'a plus de composante selon z quand l'angle θ est de $54,7^\circ$, solution de $3 \cos^2(\theta) - 1 = 0$.



Le rotor tourne autour d'un axe qui fait $54,7^\circ$ avec la direction du champs magnétique B_0 .

L'interaction dipolaire, qui conduit à des signaux très larges en RMN en phase solide (plusieurs dizaines de kHz), est moyennée à zéro en solution par suite des mouvements moléculaires rapides. De même, la **rotation à l'angle magique**

fait que chaque paire de spins se trouve en moyenne sous cette orientation magique. Si la vitesse de rotation est supérieure à l'interaction que l'on souhaite moyenné, des lignes fines résultent. L'élargissement des lignes dû aux inhomogénéités de l'échantillon, qui est de quelques centaines de Hz, impose une vitesse de rotation supérieure à 1 kHz, ce qui est facilement réalisable. Néanmoins, les largeurs de ligne obtenues par HR MAS NMR ne sont pas aussi fines que celles des mêmes molécules en solution, pour des raisons d'anisotropie de la susceptibilité magnétique.

Ile-Leu-Asn-Gly-HMBA-PS

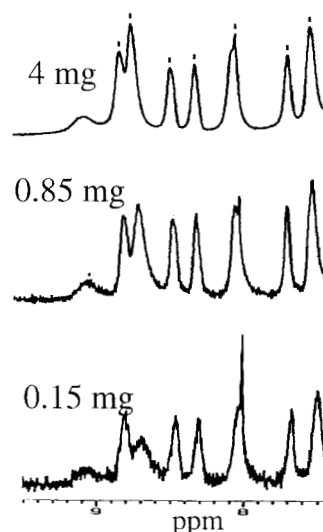


Figure 1 - Région amide du spectre proton d'un térapeptide Gly-Asn-Leu-Ile greffé par un bras moléculaire AHMB (acide hydroxyméthyle benzoïque) sur une résine de polystyrène/divinylbenzène 1%, gonflé dans le DMF- d_7 . L'acquisition a été faite en une minute sur un spectromètre Bruker DMX à 600 MHz.

identique à celle de la RMN en solution. L'intégration des spectres à une dimension, avec les précautions habituelles de temps de récupération suffisamment long, permet une quantification des molécules greffées.

L'identification et la quantification des produits de réaction étant possibles, on peut suivre l'avancement d'une réaction sans coupure des molécules de la résine. Nous avons démontré ceci par deux expériences différentes [10] : d'abord, une réaction d'Horner-Emmons directement dans le rotor, dans un solvant deutéré, et ensuite, la même expérience dans un récipient standard avec prélèvement de quelques milligrammes de résine à des moments précis de la réaction. La première expérience, malgré sa simplicité conceptuelle, ne représente pas de conditions réalistes de réaction - la petite taille du rotor (100 μ l, dans un rotor plein), l'impossibilité de contrôler l'atmosphère de réaction, l'effet de la rotation (3 000 tours par seconde !)..., peuvent tous influencer la cinétique. Dans la deuxième expérience, la résine rincée et séchée était regonflée dans un solvant deutéré, et la comparaison de l'intégrale du signal correspondant au produit formé avec un standard soluble permet une quantification du produit de réaction.

Dans la robotisation de la synthèse parallèle, une fraction importante du temps est perdue dans les étapes de rinçage, lavage et séchage des résines. Ceci est également le cas pour l'analyse par RMN HR MAS, où les trois étapes prennent facilement quelques heures. L'étape de lavage et rinçage, même si elle enlève les molécules qui n'ont pas réagi, ne suffit pas, car les solvants organiques que l'on utilise couramment en SOPS possèdent facilement plusieurs signaux intenses, qui ne peuvent pas être supprimés facilement par les techniques standard de la RMN en solution. Afin de résoudre ce problème, nous avons exploité la nature insoluble du polymère : les molécules qui ont réagi ont, par définition, perdu leur degrés de liberté translationnelle, tout en

maintenant leur liberté rotationnelle (autrement, la RMN HR MAS ne serait pas possible), contrairement aux molécules restées en solution ou aux molécules du solvant. Utilisant un filtre de diffusion décrit pour la RMN en solution, nous pouvons supprimer sélectivement les signaux de ces dernières, sans sacrifier les signaux RMN des molécules ancrées (figure 2) [11]. Le même filtre de diffusion peut être introduit dans toute séquence 2D, permettant l'identification des molécules greffées avec un échantillon prélevé directement du ballon de réaction (figure 3). Ainsi, le suivi de la réaction devient facile : on transfère quelques milligrammes de suspension dans un rotor, on enregistre le spectre avec le filtre de diffusion, et après quelques minutes, on peut quantifier l'état d'avancement de la réaction en comparant l'intégrale du produit formé avec un signal commun au produit de départ et produit final. Cette facilité ne peut même pas être obtenue en chimie en phase homogène, car ici, la séparation des molécules attachées et réactifs solubles ne demande aucune étape de purification mais est faite par l'expérience RMN - les avantages chimiques de la SOPS se transforment en avantage analytique !

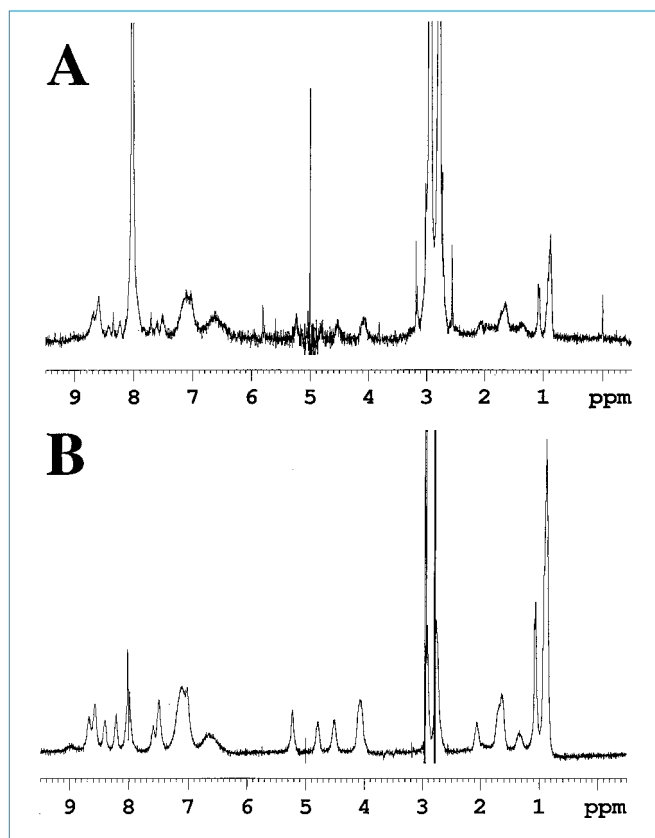


Figure 2 - Spectre de 0,15 mg de la même résine en DMF-h7, (a) avec une séquence à une impulsion et (b) avec le filtre de diffusion. Le nombre d'accumulations est identique pour les deux spectres.

Une autre question que l'on peut poser à une technique analytique est la détection, identification et quantification des impuretés. Avec un système artificiel de glutamate et pyroglutamate greffés simultanément sur un dipeptide préalablement synthétisé sur une résine, nous avons démontré qu'avec 10 mg de résine, 1 % d'impureté pouvait être détecté et identifié après 12 heures d'acquisition à la fréquence de 600 MHz (figure 4) [12]. Pouvoir discriminer très

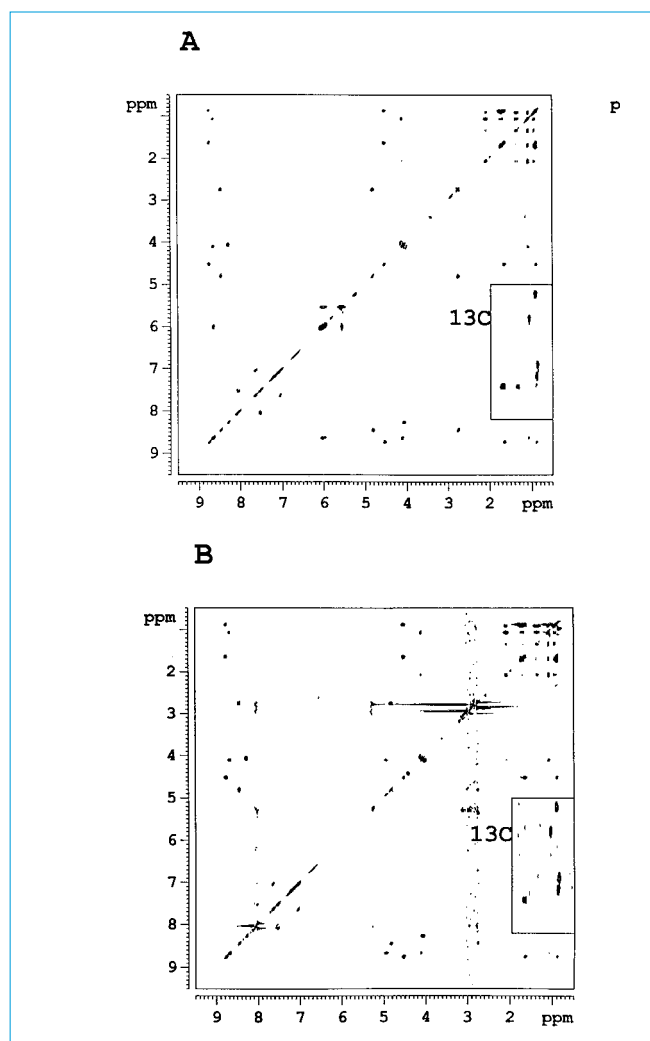


Figure 3 - Spectres à 2 dimensions (TOCSY, avec, en insert, la région des méthyles d'un spectre HSQC 1H-13C) de 2,5 mg de la même résine (a) en DMF-d7 et (b) en DMF-h7, où le solvant a été éliminé grâce au filtre de diffusion.

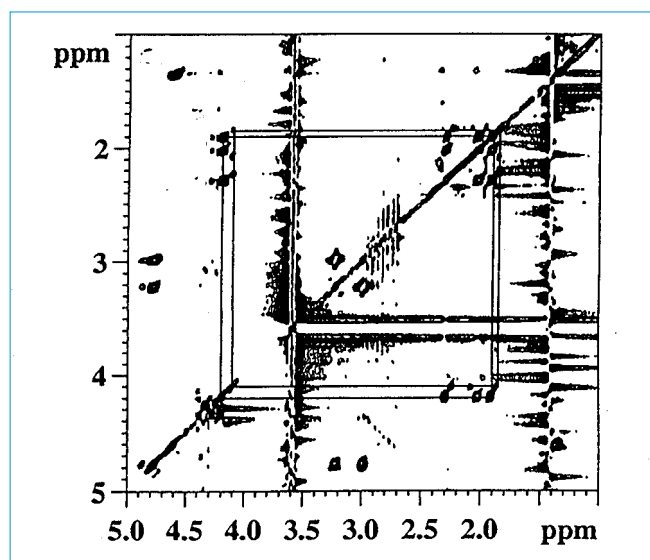


Figure 4 - Spectre TOCSY d'une résine contenant 99 % de tripeptide Ala-Phe-Glu, et 1 % de Ala-Phe-pyroglutamate. La détection et l'identification du système de spins de la pyroglutamate sont possibles après une nuit à 600 MHz, avec 10 mg de résine.

tôt dans le développement d'un produit des conditions de réactions qui mènent vers des réactions secondaires et donc des impuretés est d'une grande importance, car plusieurs cas sont connus où un résultat positif dans l'étape suivante de criblage n'était pas dû au produit attendu mais à un produit d'une réaction secondaire.

Les applications de la RMN HR MAS décrites ci-dessus concernent surtout l'optimisation des réactions de la SOPS - une autre application est l'identification des molécules sur une bille individuelle de résine. Dans le cadre d'une approche « split-and-mix » suivie d'un test biochimique sur les billes, comme développée par le groupe de Carlsberg [13], l'analyse de la structure moléculaire sur la bille pourrait éviter des stratégies de marquage de la bille. Malheureusement, la faible sensibilité de la RMN en général la rend a priori incompatible avec le nanomole de produit sur une bille individuelle. Travailler avec une molécule enrichie en ^{13}C sur une résine permet de détecter le signal des molécules sur une bille [14], mais l'attribution totale d'une molécule sans connaissance préalable du résultat paraît difficile. Des approches avec des macrobilles ou avec des dendrimères augmentant la charge de la bille ont été décrites [15], mais il nous semble que, du fait de sa faible sensibilité, la RMN reste un mauvais compétiteur d'autres techniques analytiques comme la spectrométrie de masse ou la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

En **conclusion**, nous croyons qu'il existe de nombreuses applications potentielles pour la RMN HR MAS en synthèse organique en phase solide, et que l'outil accélèrera le pro-

cessus d'optimisation, étape cruciale dans son application à la chimie combinatoire. Ainsi, les méthodes de RMN HR MAS rentreront dans les laboratoires de SOPS comme un outil indispensable, équivalent de la RMN en solution pour la chimie organique en phase homogène.

Références et note

- [1] Merrifield B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, p. 2149-2154.
- [2] Une liste de références exhaustive de la SOPS en chimie combinatoire peut être trouvée à l'adresse <http://www.5z.com/divinfo/>.
- [3] Fitch W.L., Detre G., Holmes C.P., Shoorely J.N., Keifer P.A., *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, p. 7955-7956.
- [4] Anderson R.C., Stokes J.P., Shapiro M.J., *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, p. 5311-5314.
- [5] Pop I., Dhalluin C., Depréz B., Melnyk P., Lippens G., Tartar A., *Tetrahedron*, **1996**, 52, p. 12209 - 12222.
- [6] Keifer P.A., *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, p. 1558-1559.
- [7] Riedl R., Tappe R., Berkessel A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, p. 8994-9000.
- [8] Ruhland R., Andersin K., Pedersen H., *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, p. 9204-9211.
- [9] Luo Y., Ouyang X., Armstrong R.W., Murphy M.M., *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, p. 8719-8722.
- [10] Warrass R., Lippens G., *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, p. 2946-2950.
- [11] Warrass R., Wieruszkeski J.-M., Lippens G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, p. 3787-3788.
- [12] Rousselot-Pailley P., Maux D., Wieruszkeski J.-M., Martinez J., Aubagnac L., Lippens G., *Tetrahedron*, sous presse.
- [13] Rademann J., Grötli M., Meldal M., Bock K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, p. 5459-5466.
- [14] Sarkar S.K., Garigipati R.S., Adams J.L., Keifer P.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, p. 2305-2306.
- [15] Porsch M., Schlotterbeck G., Tseng L.-H., Albert W., Rapp W., *Angew. Chemie*, **1996**, 108, p. 3034-3036.