

Université de Montréal

**Méthodologie pour la synthèse combinatoire
d'azapeptides:
application à la synthèse d'analogues aza-GHRP-6 en tant que
ligands du récepteur CD36**

par

Caroline Proulx

Département de Chimie

Université de Montréal

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D)

en Chimie

Juillet 2012

© Caroline Proulx, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Méthodologie pour la synthèse combinatoire d'azapeptides : application à la synthèse
d'analogues aza-GHRP-6 en tant que ligands du récepteur CD36

Présentée par :
Caroline Proulx

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Joelle N. Pelletier, présidente-rapporteuse
William D. Lubell, directeur de recherche
Andreea R. Schmitzer, membre du jury
David M. Perrin, examinateur externe
Joëlle Margot, représentante du doyen de la FAS

Résumé

Les azapeptides sont des mimes peptidiques où le carbone α d'un ou de plusieurs acides aminés est remplacé par un atome d'azote. Cette modification tend à stabiliser une conformation en repliement β en raison de la répulsion électronique entre les paires d'électrons libres des atomes d'azote adjacents et de la géométrie plane de l'urée. De plus, le résidu semicarbazide a une meilleure résistance face aux protéases en plus d'être chimiquement plus stable qu'une liaison amide. Bien que les propriétés des azapeptides en fassent des mimes peptidiques intéressants, leurs méthodes de synthèses font appel à la synthèse laborieuse d'hydrazines substituées en solution. Le peptide sécréteur d'hormone de croissance 6 (GHRP-6, His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) est un hexapeptide synthétique qui possède une affinité pour deux récepteurs distincts: les récepteurs GHS-R1a et CD36. Les travaux effectués au cours de mon doctorat qui seront détaillés dans cet ouvrage visent à atteindre deux objectifs: (1) le développement d'analogues du peptide GHRP-6 sélectif à un seul récepteur et (2) la mise au point d'une nouvelle méthodologie pour la synthèse combinatoire d'azapeptides.

En réponse au premier objectif, la synthèse parallèle de 49 analogues aza-GHRP-6 a été effectuée et certains candidats sélectifs au récepteur CD36 ont été identifiés. L'étude de leurs propriétés anti-angiogéniques, effectuée par nos collaborateurs, a également permis d'identifier des candidats intéressants pour le traitement potentiel de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Une nouvelle approche pour la synthèse combinatoire d'azapeptides, faisant appel à l'alkylation et la déprotection chimiosélective d'une sous-unité semicarbazone ancrée sur support solide, a ensuite été développée. La portée de cette méthodologie a été augmentée par la découverte de conditions permettant l'arylation régiosélective de cette sous-unité semicarbazone, donnant accès à treize nouveaux dérivés aza-GHRP-6 possédant des résidus aza-arylglycines aux positions D-Trp² et Trp⁴.

L'élaboration de conditions propices à l'alkylation et la déprotection chimiosélective de la semicarbazone a donné accès à une variété de chaînes latérales sur

l'acide aminé « aza » préalablement inaccessibles. Nous avons, entre autres, démontré qu'une chaîne latérale propargyl pouvait être incorporée sur l'acide aminé « aza ». Tenant compte de la réactivité des alcynes, nous avons ensuite élaboré des conditions réactionnelles permettant la formation *in situ* d'azotures aromatiques, suivie d'une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire sur support solide, dans le but d'obtenir des mimes de tryptophane. Sept analogues du GHRP-6 ont été synthétisés et testés pour affinité au récepteur CD36 par nos collaborateurs.

De plus, nous avons effectué une réaction de couplage en solution entre un dipeptide possédant un résidu aza-propargylglycine, du paraformaldehyde et une variété d'amines secondaires (couplage A³) afin d'accéder à des mimes rigides d'aza-lysine. Ces sous-unités ont ensuite été incorporées sur support solide afin de générer sept nouveaux azapeptides avec des dérivés aza-lysine à la position Trp⁴ du GHRP-6.

Enfin, une réaction de cyclisation *5-exo-dig* a été développée pour la synthèse de *N*-amino imidazolin-2-ones en tant que nouveaux mimes peptidiques. Leur fonctionnalisation par une série de groupements benzyles à la position 4 de l'hétérocycle a été rendue possible grâce à un couplage Sonogashira précédant la réaction de cyclisation. Les propriétés conformationnelles de cette nouvelle famille de composés ont été étudiées par cristallographie aux rayons X et spectroscopie RMN d'un térapeptide modèle. L'activité biologique de deux mimes peptidiques, possédant un résidu *N*-amino-4-méthyl- et 4-benzyl-imidazolin-2-one à la position Trp⁴ du GHRP-6, a aussi été examinée.

L'ensemble de ces travaux devrait contribuer à l'avancement des connaissances au niveau des facteurs structurels et conformationnels requis pour le développement d'azapeptides en tant que ligands du récepteur CD36. De plus, les résultats obtenus devraient encourager davantage l'utilisation d'azapeptides comme peptidomimétiques grâce à leur nouvelle facilité de synthèse et la diversité grandissante au niveau de la chaîne latérale des acides aminés « aza ».

Mots-clés: Azapeptides, mimes peptidiques, repliement β , GHRP-6, récepteur GHS-R1a, récepteur CD36, angiogénèse, semicarbazone, semicarbazide, *N*-alkylation, *N*-arylation,

aza-propargylglycine, cycloaddition 1,3-dipolaire, couplage A³, *N*-amino imidazolin-2-one.

Abstract

Aza-peptides are peptide mimics in which the CH α in one or more amino acids has been replaced with a nitrogen atom. Such a modification tends to induce β turn conformations in peptides, because of the consequences of lone-pair lone-pair repulsion between the two adjacent nitrogens and the planar geometry of the urea in the semicarbazide moiety. Furthermore, the semicarbazide increases protease resistance and is chemically more stable than its amide counterpart. Despite the potential advantages of using aza-peptides mimics, their synthesis has been hampered by the solution-phase construction of substituted hydrazines prior to their incorporation into peptide sequences. Growth Hormone Releasing Peptide 6 sequence (GHRP-6, His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) is a synthetic hexapeptide that binds to two distinct receptors: the Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a (GHS-R1a) and the Cluster of Differentiation 36 (CD36) receptor. The body of my Ph.D thesis has been generally targeted towards two objectives: (a) the development of aza-peptide analogs of GHRP-6 with enhanced receptor selectivity and (b) the elaboration of a new synthetic approach for combinatorial submonomer aza-peptide synthesis.

In response to the first objective, 49 aza-GHRP-6 derivatives were synthesized and evaluated for receptor binding and biological activity. From this library, certain candidates were identified which exhibited decreased affinity for the GHS-R1a receptor with maintained affinity for the CD36 receptor. Furthermore, in studying their anti-angiogenic properties, our collaborators have identified aza-GHRP-6 analogs, which caused a marked decrease in microvascular sprouting in choroid explants, as well as another displaying potential to increase angiogenesis.

A new approach for the combinatorial synthesis of aza-peptides was developed to better conduct SAR studies using aza-peptides. This method features the chemoselective alkylation and deprotection of a resin-bound semicarbazone building block. The scope of the methodology was further expanded by the development of reaction conditions for the

chemoselective *N*-arylation of this semicarbazone residue, yielding 13 aza-GHRP-6 derivatives with aza-aryl glycines residues at the D-Trp² and Trp⁴ positions.

The elaboration of a methodology based on the chemoselective alkylation and deprotection of a semicarbazone has allowed for greater aza-amino acid side chain diversity, enabling for example, the efficient incorporation of aza-propargylglycine residues into peptide sequences. Considering the reactivity of alkynes, we developed reaction conditions for *in situ* formation of aromatic azides, followed by a 1,3-dipolar cycloaddition reaction on solid support to yield aza-1-aryl,2,3-triazole-3-alanine residues as tryptophan mimics. Seven aza-GHRP-6 analogs were synthesized and subsequently tested for binding to the CD36 receptor by our collaborators.

Moreover, the coupling reaction between an aza-propargylglycine-containing dipeptide building block, paraformaldehyde and a variety of secondary amines (A³ coupling) was accomplished in solution to provide access to rigid aza-lysine mimics. These aza-dipeptides were subsequently incorporated at the Trp⁴ position of seven new aza-GHRP-6 analogues using a solid-phase protocol, and the resulting azaLys mimics were tested for binding towards the CD36 receptor.

Finally, conditions for a *5-exo-dig* cyclization of an aza-propargylglycine residue were developed to give *N*-amino imidazolin-2-ones as turn-inducing peptide mimics. Their modification at the 4 position was achieved using a Sonogashira coupling protocol prior to the cyclization step. The conformational properties of these new heterocyclic motifs were assessed by X-ray crystallography and NMR spectroscopy on a tetrapeptide model system. The incorporation of *N*-amino-4-methyl- and 4-benzyl-imidazolin-2-ones at the Trp⁴ position of GHRP-6 was further accomplished and the biological evaluation of the peptidomimetics was examined.

Taken together, these results should lead to a better understanding of the structural and conformational factors responsible for binding and biological activity of azapeptide ligands of the CD36 receptor. Furthermore, the submonomer approach for azapeptide synthesis developed should promote the use of azapeptides as peptide mimics, given its accessibility and the increased aza-amino acid side-chain diversity available.

Keywords: Azapeptides, peptide mimicry, β turn, GHRP-6, GHS-R1a receptor, CD36 receptor, angiogenesis, semicarbazone, semicarbazide, *N*-alkylation, *N*-arylation, azapropargylglycine, 1,3-dipolar cycloaddition (click chemistry), A^3 coupling, *N*-amino imidazolinones.

Note

Cette thèse étant rédigée par article, je tiens à préciser ma contribution à chacun des chapitres qui la compose. D'abord, j'ai entièrement rédigé l'introduction de ma thèse (Chapitre 1), inspirée d'une revue de la littérature pour laquelle j'ai effectué une contribution majeure en tant que première auteure.

L'article du chapitre 2, décrivant la synthèse et l'évaluation biologique de 49 analogues azapeptides de GHRP-6, a été entièrement rédigé par moi-même, sous la supervision du Pr William D. Lubell et du Pr Huy Ong. J'ai effectué la synthèse et la purification de 34 des 49 composés étudiés ainsi que les études de dichroïsme circulaire. Dr Damien Boeglin, un ancien postdoc du groupe du Pr William D. Lubell, a synthétisé les premiers 15 dérivés aza-GHRP-6. Mes collaboratrices Petra Pohankova (laboratoire de Pr Huy Ong) et Émilie Picard (laboratoire de Pr Sylvain Chemtob) ont effectué les tests d'affinité et d'activité angiogénique, respectivement.

Les résultats décrits dans le chapitre 3 ont été largement effectués en collaboration avec Dr David Sabatino, un ancien postdoc du groupe du Pr William D. Lubell. Celui-ci a optimisé les premières étapes de synthèse (activation et alkylation). J'ai ensuite joint mes efforts au siens afin de terminer le développement de la méthodologie (déprotection) et explorer l'étendue de la méthodologie.

L'article du chapitre 4, décrivant le développement d'une méthodologie pour la *N*-arylation de semicarbazones pour la synthèse de mimes peptidiques de GHRP-6 avec résidus aza-arylglycines, a été entièrement rédigé par moi-même, sous la direction du Pr William D. Lubell. Les résultats décrits dans cet article ont été obtenus exclusivement par moi-même.

Les résultats inclus dans le chapitre 5, portant sur la dérivation de résidus aza-propargyglycines par des réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire (Partie A) et un couplage A^3 (Partie B), ont été majoritairement obtenus par moi-même. J'ai rédigé l'article dans la première partie du chapitre dans sa totalité, sous la supervision du Pr William D. Lubell.

L'ensemble des résultats décrits dans cet article a été effectué par moi-même. Les résultats décrits dans la deuxième partie du chapitre ont été largement obtenus par moi-même, avec contribution d'une stagiaire d'été Anna Tomberg, sous ma supervision.

L'article du chapitre 6, qui décrit le développement d'une approche synthétique pour l'obtention de *N*-amino imidazolin-2-ones et leur évaluation en tant que nouveau type de mime peptidique, a été entièrement rédigé par moi-même, sous la supervision du Pr William D. Lubell. L'ensemble des résultats, à l'exception des mesures d'affinité (Michael Pruneau, laboratoire du Pr Jean-François Masson) et d'activité biologique (Patrick Lambert-Lanteigne, laboratoire du Pr Huy Ong), a été entièrement obtenu par moi-même.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iv
Note.....	vii
Table des matières.....	ix
Liste des figures.....	xiv
Liste des schémas.....	xviii
Liste des tableaux.....	xx
Liste des abréviations.....	xxii
Remerciements.....	xxix
Dédicace.....	xxx
Chapitre 1 : Introduction	
1.1 L'utilisation de peptides en tant que médicaments.....	2
1.2 Repléments β et peptidomimétisme.....	3
1.3 Les azapeptides en tant que mimes peptidiques.....	6
1.3.1 Les propriétés conformationnelles des azapeptides.....	7
1.3.1.1 Études théoriques.....	8
1.3.1.2 Cristallographie aux rayons X.....	11
1.3.1.3 Spectroscopie RMN et IR des azapeptides.....	14
1.3.2 Stabilité et résistance aux protéases des azapeptides. Applications à la synthèse d'inhibiteurs de cystéine- et sérines-protéases.....	15
1.3.3 Les azapeptides en tant que ligands de récepteurs.....	18
1.4 Méthodes de synthèse d'azapeptides.....	22
1.4.1 Activation de l'extrémité <i>N</i> -terminale d'un peptide.....	23
1.4.2 Activation de l'hydrazide.....	25
1.5 Conclusion et résumé de la thèse.....	28

Chapitre 2

2.1 Développement du peptide sécréteur d'hormone de croissance 6.....	31
2.1.1 Historique	31
2.1.2 Découverte du récepteur GHS-R1a et de son ligand naturel, la ghréline.....	33
2.1.2.1 GHRP-6 et le récepteur GHS-R1a.....	33
2.2 Découverte de l'affinité du GHRP-6 pour un second récepteur: le récepteur CD36.....	34
2.2.1 GHRP-6 et le récepteur CD36 comme cible thérapeutique.....	35
2.3 Problématique adressée dans l'article 1.....	36

Article 1:

Proulx, C.; Picard, E.; Boeglin, D.; Pohankova, P.; Chemtob, S.; Ong, H.; Lubell, W. D. Azapeptide Analogs of the Growth Hormone Releasing Peptide 6 as Cluster of Differentiation 36 Receptor Ligands with Reduced Affinity for the Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a. *J. Med. Chem.* **2012**, 55(14), 6502-6511.

Abstract.....	38
Keywords.....	38
Introduction.....	38
Results and Discussion.....	41
Conclusion.....	53
Experimental Section.....	53
Acknowledgments.....	60
Abbreviations used.....	60
References.....	60
2.4 Conclusion et perspective.....	66

Chapitre 3

3.1 Principe de chimie combinatoire: application à la synthèse peptidique.....	68
3.1.1 Synthèse de peptide en parallèle.....	68
3.1.2 Technique de partage et mélange (« split and mix »).....	70
3.1.3 Automation du processus de synthèse peptidique sur support solide.....	72
3.2 Synthèse combinatoire de peptidomimétiques.....	72

3.2.1 Diversification de sous-unités communes sur résine : synthèse de larges banques de peptidomimétiques.....	74
3.2.1.1 Approche « submonomer » pour la synthèse de peptoïde.....	74
3.2.1.2 Synthèse de « librairies de librairies » sur support solide.....	75
3.2.2 Diversification de sous-unités communes sur résine: incorporation de chaînes latérales sur support solide.....	77
3.3 Problématique sous étude.....	79
3.4 Résultats.....	80
3.4.1 Développement d'une approche « submonomer » pour la synthèse combinatoire d'azapeptides sur support solide.....	80
3.5 Conclusion et perspectives.....	85
Chapitre 4	
4.1 Importance des résidus arylglycines.....	88
4.2 Précédents de la littérature.....	90
4.2.1 Arylation de glycines protégées.....	90
4.2.2 <i>N</i> -arylation de carbazates et de <i>N</i> -acyles hydrazines.....	91
4.2.3 <i>N</i> -arylation de <i>N</i> -Boc hydrazones.....	93
4.2.4 Exemples d'arylations sur support solide.....	94
Article 2	
Proulx, C.; Lubell, W. D. Copper-Catalyzed <i>N</i> -Arylation of Semicarbazones for the Synthesis of Aza-Arylglycine-Containing Aza-Peptides. <i>Org. Lett.</i> 2010 , 12(13), 2916-2919.	
Abstract.....	97
Article.....	97
Acknowledgment.....	104
References.....	104
4.3 Informations supplémentaires à l'article 2 : Études comparatives entre [azaPhe ⁴]-GHRP-6, [aza-(phenylgly) ⁴]-GHRP-6 et [aza-(3-indolylgly) ⁴]-GHRP-6.....	106

4.4 Conclusion et perspectives.....	107
-------------------------------------	-----

Chapitre 5

5.1 La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire.....	110
---	-----

5.2 Les triazoles et le petidomimétisme.....	111
--	-----

5.2.1 Les triazoles comme isostères de liaisons amides.....	111
---	-----

5.2.2 Les triazoles comme isostères d'imidazoles et d'indoles.....	115
--	-----

5.2.2.1 Les triazoles en tant qu'isostères d'imidazoles pour la synthèse d'analogues d'histidine.....	115
---	-----

5.2.2.2 Les triazoles substitués par des groupements aryles en tant qu'isostères d'indoles pour la synthèse d'analogues de tryptophane.....	117
---	-----

5.3 La formation d'azotures <i>in situ</i> pour la synthèse de triazoles.....	117
---	-----

Article 3

Proulx, C.; Lubell, W. D. Aza-1,2,3-triazole-3-alanine Synthesis via Copper-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloaddition on Aza-progargylglycine. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*(15), 5385-5387.

Abstract.....	121
---------------	-----

Article.....	121
--------------	-----

Experimental Section.....	126
---------------------------	-----

Acknowledgment.....	127
---------------------	-----

References.....	127
-----------------	-----

5.4 Informations supplémentaires à l'article 3 : affinité des dérivés [aza-1-aryl,2,3-triazole-3-alanine ⁴]-GHRP-6 pour le récepteur CD36.....	129
--	-----

5.5 Les lysines <i>N</i> (ϵ)-substituées.....	132
--	-----

5.6 Mimes de lysines à conformation restreinte.....	132
---	-----

5.6.1 Utilisation de la <i>p</i> -(aminométhyl)-Phe en chimie médicinale.....	133
---	-----

5.7 La réaction de couplage A ³ sur support solide.....	134
--	-----

5.8 Résultats.....	135
--------------------	-----

5.8.1 Efforts vers la réaction de couplage A ³ sur support solide.....	135
---	-----

5.8.2 Efforts vers la réaction de couplage A ³ en solution.....	138
--	-----

5.8.2.1 Synthèse de l'aza-dipeptide en solution et réaction de couplage A ³	139
5.8.2.2 Incorporation des synthons aza-Lys-D-Phe sur support solide.....	141
5.8.2.3 Analyses conformationnelles des azapeptides 240a-f par dichroïsme circulaire.....	142
5.8.2.4 Affinité des azapeptides 240a-f pour le récepteur CD36.....	143
5.9 Conclusion et perspective.....	144
Chapitre 6	
6.1 GHRP-6 et les α -amino- et β -amino γ -lactames.....	147
6.2 Cyclisation 5- <i>exo dig</i> de propargylurées et <i>O</i> -propargylcarbamates.....	149
Article 4	
Proulx, C.; Lambert-Lanteigne, P.; Pruneau, M.; Masson, J.-F.; Ong, H.; Lubell, W. D. <i>N</i> -Amino imidazolin-2-one Peptide Mimics: Diversity-Oriented Synthesis, Conformational Analysis and Bioactivity. Prêt à être soumis.	
Abstract.....	153
Introduction.....	154
Results and Discussion.....	156
Conclusion.....	170
Experimental Section.....	171
Acknowledgements.....	191
References.....	192
6.3 Conclusion et perspective.....	199
Chapitre 7	
7.1 Conclusion générales.....	201
Partie expérimentale	205

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1	(a) Représentation des angles dièdres dans un peptide. (b) Structures secondaires des peptides et protéines possibles.....	3
Figure 1.2	Repliement β	4
Figure 1.3	Exemples de contraintes favorisant la conformation de repliements β	6
Figure 1.4	Structure de Zoladex et Atazanavir.....	7
Figure 1.5	Représentation d'un repliement β induit par l'introduction d'un acide aminé « aza ».....	8
Figure 1.6	Énergie relative pour les rotamères de configuration Z,Z	9
Figure 1.7	Structure cristalline N,N' -diformylhydrazine co-cristallisé avec de l'éther 18-couronne-6.....	9
Figure 1.8	Repliements de type I et II induit par la proline à la position $i + 1$ ou $i + 2$ vs repliement de type VI induit par l'azaproline à la position $i + 2$	14
Figure 1.9	Interactions NOE détectées pour les repliements de type I et II.....	15
Figure 1.10	Équilibre conformationnel chez les substrats et inhibiteurs, et sélection conformationnelle proposée pour les protéases.....	16
Figure 1.11	Mécanisme postulé pour l'inhibition des protéases à sérines et à cystéines par les azapeptides.....	17
Figure 1.12	Exemples de ligands azapeptides agonistes ou antagoniste de récepteurs.....	20
Figure 1.13	Schéma rétrosynthétique pour la synthèse d'azapeptides.....	22
Figure 1.14	Méthodes possibles pour la synthèse d'azapeptides connues (a, b, et d) et développée dans le contexte de mon doctorat (c).....	24
Figure 1.15	Résumé schématique des chapitres 3-6 de la thèse.....	29
Chapitre 2		
Figure 2.1	Développement du GHRP-6 à partir de la Met-encéphaline.....	31

Figure 2.2	Conformation la plus stable du GHRP-6 basé sur des calculs d'énergie.....	32
Figure 2.3	Les récepteurs du GHRH et GHS-R1a et la libération synergique d'hormone de croissance.....	33
Figure 2.4	Récepteur CD36.....	35
Article 1		
Figure 1	Anti-angiogenic Effect of CD36 Mediators.....	50
Figure 2	Circular dichroism spectra in water of azapeptides 15 and 34 compared with GHRP-6.....	52
Chapitre 3		
Figure 3.1	Photos de « pins » et « lanternes ».....	69
Figure 3.2	Représentation schématique des « sachets de thé » et photo de kan IRORI™.....	69
Figure 3.3	a) technique une-bille-un-composé. b) technique de synthèse en parallèle.....	70
Figure 3.4	Stratégie pour l'identification tardive de composés par l'usage d'étiquettes moléculaires.....	71
Figure 3.5	Structure d'oligourées et oligocarbamates.....	73
Figure 3.6	Stratégie utilisée par O'Donnell <i>et al.</i> pour l'incorporation d'acides aminés non naturels sur support solide.....	78
Figure 3.7	Acides aminés non naturels et peptides possédant un ou plusieurs acides aminés non naturels.....	78
Figure 3.8	Stratégie conceptuelle pour la synthèse d'azapeptide sur support solide.....	80
Figure 3.9	Tracé LCMS à 214 nm de l'azapeptide [AzaPhe ⁴]-GHRP-6 brut.....	83
Chapitre 4		
Figure 4.1	Substrats possédant des résidus arylglycines.....	88
Figure 4.2	Fonctionnalisation C-H d'une glycine en N-terminale d'un tripeptide.....	90
Article 2		
Figure 1	Synthesis aza-peptide bearing indolyl moieties.....	99

Figure 2	Circular dichroism spectra of GHRP-6 with [aza arylgly ²]- and with [aza-aryl gly ⁴]-GHRP-6 analogues in water.....	103
Chapitre 5		
Figure 5.1	Utilisation d'aza-1-aryl,2,3-triazole-3-alanine comme mimes de tryptophanes.....	109
Figure 5.2	Utilisation de triazoles comme isostères non-classiques de liaisons amides <i>Z</i> (a) et <i>E</i> (b).....	111
Figure 5.3	(a) RNase A. (b) Repliement β de type VI induit par les résidus Asn ¹¹³ -Pro ¹¹⁵ et stratégie pour mimer la liaison amide cis à l'aide d'un 1,2,3-triazole 1,5-disubstitué.....	112
Figure 5.4	(a) substitution K ₁₅ L ₁₆ par un acide aminé ϵ avec noyau triazole. (b) cristallographie à rayons X du faisceau torsadé d'hélices α obtenu avec noyau triazole.....	114
Figure 5.5	Oligomère de triazoles adoptant la conformation de ruban β	114
Figure 5.6	Cartes de densités électroniques des régioisomères les plus stables pour l'histidine et l'analogue 1,2,3-triazole.....	116
Figure 5.7	Inhibiteurs de l'IDO1 basé sur le squelette 4-phenyl-1,2,3-triazole et arrimage moléculaire (docking).....	117
Article 3		
Figure 1	1,2,3-triazole-3-alanine and aza-1,2,3-triazole-3-alanine residues.....	122
Figure 2	Representative LCMS traces of intermediate 5a and peptide 8a using MeOH/H ₂ O eluant (0-80 % MeOH) containing 0.1% formic acid.....	123
Figure 3	Circular dichroism in water of azapeptides 8a-g and native GHRP-6.....	125
Figure 5.8	Mécanisme proposé de la réaction de couplage A ³ catalysée par le cuivre.....	130

Figure 5.9	Utilisation de aza-(aminométhyl <i>N,N</i> -disubstitué)propargyl glycines comme mimes de lysine.....	131
Figure 5.10	Structure et affinités du composé EP8031 pour les récepteurs GHSR-1a et CD36.....	131
Figure 5.11	Exemples de mimes de lysine à conformation restreinte.....	133
Figure 5.12	Structure de l'analogue somatostatine des-AA ^{1,2,5} -[D-Trp ⁸ , IAmp ⁹]	134
Figure 5.13	Dipeptides azaLys synthétisés.....	140
Figure 5.14	Dichroïsme circulaire des azapeptides 240a-f et du peptide parent GHRP-6.....	143
Chapitre 6		
Figure 6.1	Stratégie envisagée pour la synthèse de <i>N</i> -amino imidazolin-2-ones.....	147
Figure 6.2	Structures d' α -amino γ -lactames et de β -amino γ -lactames.....	148
Figure 6.3	Conception du mime peptidique [4-benzyl <i>N</i> -amino-imidazolin-2-one ⁴]-GHRP-6 en tant qu'hybride d'azapeptide et de lactame de Freidinger.....	149
Figure 6.4	Stratégies pour la cyclisation <i>5-exo dig</i> de propargylurées ou <i>O</i> -propargyl carbamates.....	150
Article 4		
Figure 1	Use of benzoic acid hydrazide- and heterocycle-peptide hybrids as rigid frameworks for controlling folding.....	154
Figure 2	Conception of <i>N</i> -amino-imidazolin-2-one turn mimics.....	155
Figure 3	X-ray structures of <i>N</i> -acyl amino imidazolin-2-one <i>iso</i> -propyl amide 14	160
Figure 4	NH chemical shift variation versus DMSO-d ₆ percentage in CDCl ₃ /DMSO-d ₆ mixtures for 14	162
Figure 5	Circular dichroism spectra in water of 31a and 31b compared with GHRP-6, [azaPhe ⁴]- and [azaTyr ⁴]-GHRP-6.....	169

Liste des schémas

Chapitre 1

Schéma 1.1	Utilisation d'un groupement protecteur temporaire (Hmb) pour la synthèse d'azapeptides.....	25
Schéma 1.2	Synthèse d'azapeptides via l'utilisation de <i>N</i> -Boc-aza ¹ -dipeptides esters....	25
Schéma 1.3	Protocole général pour la synthèse d'azapeptides sur support solide.....	26
Schéma 1.4	Synthèse de carbazates <i>N</i> -alkyl fluoren-9-ylméthyle.....	27

Chapitre 2

Article 1

Scheme 1	Representative synthesis of 15	42
----------	---	----

Chapitre 3

Schéma 3.1	(a) Synthèse en solution des monomères requis pour la synthèse d'oligourées sur support solide. (b) Synthèse d'oligourées sur support solide.....	73
Schéma 3.2	Approche « submonomer » pour la synthèse de peptoïdes.....	75
Schéma 3.3	Synthèse de peptidomimétiques par alkylations successives d'amides.....	76
Schéma 3.4	Synthèse d'urées et de thiourées cycliques sur support solide.....	77
Schéma 3.5	Approche « submonomer » pour la synthèse d'azapeptides.....	83

Chapitre 4

Schéma 4.1	Exemples de <i>N</i> -arylations et <i>N</i> -alkenylations régiosélectives de <i>N</i> -acyles hydrazines.....	92
Schéma 4.2	<i>N</i> -arylation de <i>N</i> -Boc-hydrazone catalysée au cuivre.....	93
Schéma 4.3	Essais vers la <i>N</i> -arylation sur support solide catalysée au cuivre de diverses fonctionnalités.....	94

Article 2

Scheme 1	Synthesis of [aza-arylglycine] GHRP-6 analogs.....	100
Scheme 2	Solution-Phase <i>N</i> -arylation of Aza-Glycinyl-phenylalanine Isopropylamide.....	101

Chapitre 5

Schéma 5.1	(a) Utilisation de chimie « click » pour la synthèse convergente de mimes peptidiques adoptant une conformation en repliement β . (b) conformation la plus stable déterminée par modélisation moléculaire.....	112
Schéma 5.2	Utilisation de chimie « click » pour la synthèse convergente de mimes peptidiques adoptant une conformation en ruban β	113
Schéma 5.3	Préparation d'histidines <i>N</i> -substituées à partir de la propargylglycine.....	115
Schéma 5.4	Construction d'amino-triazolodiazepinone (Ata) comme mimes d'histidine.....	115
Schéma 5.5	Exemples de stratégies utilisées pour la génération in situ d'azotures suivi par une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire.....	118
Schéma 5.6	Synthèse de triazole via cyclisation 1,3-dipolaire et formation in situ d'azoture d'aryles.....	119

Article 3

Scheme 1	Synthesis of [Aza-1,2,3-triazole-3-alanine]GHRP-6 analogs.....	123
Schéma 5.7	Couplage A ³ sur support solide.....	135
Schéma 5.8	Étape de déprotection de l'hydrazone suite à la réaction de couplage A...	137
Schéma 5.9	Essais vers une réaction tardive de couplage A ³ sur résine.....	138
Schéma 5.10	Synthèse d'aza-dipeptide en solution.....	139
Schéma 5.11	Réaction de couplage A ³ en solution.....	140
Schéma 5.12	Synthèse sur support solide des peptidomimétiques [azaLys ⁴]-GHRP-6 240a-f	141

Chapitre 6

Article 4

Scheme 1	Synthesis of <i>N</i> -acyl amino imidazolin-2-one <i>iso</i> -propyl amide 14	159
Scheme 2	(a) Synthesis of ketone 20 using Sonagashira coupling conditions. (b) Synthesis of alkyne 22 via the alkylation route.....	164
Scheme 3	Solid-phase incorporation of <i>N</i> -amino imidazolin-2-ones 4 and 26a at the Trp ⁴ -D-Phe ⁵ position of GHRP-6.....	167

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1.1	Valeurs idéales des angles dièdres pour les repliements β	4
Tableau 1.2	Données cristallographiques d'azapeptides modèles.....	12

Chapitre 2

Article 1

Table 1	Retention times, purity and mass of GHRP-6 analogs.....	43
Table 2	IC ₅₀ Binding Values for GHS-R1a and CD36 Receptors of GHRP-6 Analogues.....	45

Chapitre 3

Tableau 3.1	Caractérisation des analogues aza-GHRP-6 synthétisés.....	84
-------------	---	----

Chapitre 4

Article 2

Table 1	<i>N</i> -arylation at residue positions 2 and 4 of GHRP-6.....	99
Table 2	Yields and Purities of Aza-Arylglycine-Containing GHRP-6 analogues 10a-f and 6a-g	102
Tableau 4.1	Affinités de [aza-(Phenylgly) ⁴]GHRP-6 (6a) et [aza-(3-Indolylgly) ⁴]GHRP- 6 (6f) pour les récepteurs GHS-R1a et CD36.....	106

Chapitre 5

Article 3

Table 1	LCMS conversions of the aryl azide formation/1,3-dipolar cycloaddition step.....	124
Table 2	Yields and purities of GHRP-6 azapeptides 8a-g	125
Tableau 5.1	Affinités relatives des dérivés [aza-1,2,3-triazole-3-alanine ⁴]-GHRP-6 pour le récepteur CD36 mesurées par SPR.....	129
Tableau 5.2	Résultats (conversion) de la réaction de couplage A ³ sur support solide.....	136
Tableau 5.3	Rendements et caractérisation des peptidomimétique 240a-f	142

Tableau 5.4	Valeurs de K_d (μM) relatives des azapeptides 240a-f déterminées par SPR.....	143
-------------	---	-----

Chapitre 6

Article 4

Table 1	Synthesis of <i>N</i> -amino imidazolin-2-one building block 4	158
Table 2	ϕ and ψ dihedral angles (in degrees) for ideal β -II, β -II', and γ -turns compared with those from crystal structures of 14-17	161
Table 3	Sonogashira coupling of aryl iodides and aza-propargylglycine dipeptide 1	163
Table 4	Synthesis of substituted <i>N</i> -amino imidazolin-2-one building blocks.....	166
Table 5	Yields and purities of GHRP-6 analogs 31a and 31b	168
Table 6	Binding values for GHRP-6 analogs 31a and 31b	170

Liste des abréviations

[α]	rotation spécifique [en (deg ml/ g dm)]
Å	Angstrom
Ac	acétyle
Ac ₂ O	anhydride acétique
AcOH	acide acétique
ACE	<i>angiotensine converting enzyme</i>
Agl	α -amino γ -lactame
Ala	alanine
Amp	<i>p</i> -aminométhyl-phénylalanine
Aph	<i>p</i> -amino-phénylalanine
Ar	aryle
Arg	arginine
Asn	asparagine
Asp	acide aspartique
Ata	<i>amino-triazolodiazepinone</i>
AzaXaa	acide aminé « aza »
Bn	benzyle
BDZ	benzodiazépine
Bgl	β -amino γ -lactame
Bip	biphényle
BOC	<i>tert</i> -butyloxycarbonyle
(BOC) ₂ O	dicarbonate de di- <i>tert</i> -butyle
br	<i>broad</i>
BRS-3	<i>bombesin receptor subtype 3</i>
BTC	<i>bis(trichloromethyl)carbonate</i>
<i>i</i> -Bu	<i>iso</i> -butyle
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butyle

c	concentration
°C	degré Celsius
Calcd	<i>calculated</i>
Cbz	benzyloxycarbonyle
CCK	cholécystokinine
CD	<i>circular dichroism</i>
CD36	<i>cluster of differentiation 36</i>
CDI	carbonyldiimidazole
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i>
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CuAAC	<i>copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition</i>
Cys	cystéine
δ	déplacement chimique en ppm
d	doublet (en RMN)
D	Debye
DCM	dichlorométhane
dd	doublet de doublet (en RMN)
Ddz	1,3-diméthoxy- α,α -diméthylbenzyloxycarbonyle
DEAD	diéthyl azodicarboxylate
deg	degré
DIC	<i>N,N</i> -diisopropylcarbodiimide
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DMTMM-BF ₄	<i>4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium tetrafluoroborate</i>
EDA	éthylènediamine
ee	excès énantiomère

ESI	<i>electrospray ionization</i>
Et	éthyle
Et ₃ N	triéthylamine
Et ₂ O	éther diéthylique
EtOAc	acétate d'éthyle
EtOH	éthanol
FA	acide formique
Fmoc	fluorénylméthylloxycarbonyle
Fmoc-OSu	hydroxysuccinimide de fluorénylméthylloxycarbonyle
FTIR	<i>Fourier transform infra-red</i>
g	gramme(s)
GH	<i>growth hormone</i>
GHRH	<i>growth hormone releasing hormone</i>
GHRP-6	<i>growth hormone releasing peptide 6</i>
GHS	<i>growth hormone secretagogue</i>
GHS-R11a	<i>growth hormone secretagogue receptor 1a</i>
Gln	glutamine
Glu	acide glutamique
Gly	glycine
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GRP	<i>gastrin-releasing peptide</i>
h	heure(s)
Haic	5-amino-1,2,4,5,6,7-tetrahydroazepino[3,2,1-hi]indol-4-one-2-carboxylate
HATU	hexafluorophosphate d'hydroxy-azabenzotriazol-1-yle 1,1,3,3-tétraméthylaminium
HBTU	hexafluorophosphate d'hydroxy-benzotriazol-1-yle 1,1,3,3-tétraméthylaminium
His	histidine

HL	élastase leucocytaire humaine
Hmb	<i>N</i> -2-hydroxy-4-méthoxybenzyle
HOAt	hydroxy-azabenzotriazole
HOBt	hydroxybenzotriazole
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
IAmp	<i>p</i> -(<i>N</i> -isopropyl)-aminométhylphénylalanine
IBC	isobutyl chloroformate
IDO1	<i>indoleamine 2,3-dioxygenase 1</i>
IGF-1	<i>insulin growth factor 1</i>
Ile	isoleucine
<i>J</i>	constante de couplage (en RMN)
kcal	kilocalorie
l, L	litre(s), liter(s)
LCMS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>
LDLox	lipoprotéines de basse densité oxydées
Leu	leucine
LHRH	<i>luteinizing hormone releasing hormone</i>
LRMS	<i>low resolution mass spectrometry</i>
Lys	lysine
M	mole par litre
MCR	<i>melanocortin receptor</i>
mM	millimole par litre
Me	méthyle
Met	méthionine
mGluR	<i>metabotropic glutamate receptors</i>
MHC II	complexe d'histocompatibilité majeur II
MHz	mégahertz
Min	minute(s)

Mol	mole
Mmol	millimole
m	multiplet (en RMN)
mp	<i>melting point</i>
MS	<i>mass spectrometry, molecular sieves</i>
Nal-1	naphthalène-1
Nal-2	naphthalène-2
nM	nanomolaire
nm	nanomètre
NMB	récepteur neuromédine B
NMM	<i>N</i> -méthylmorpholine
NMP	<i>N</i> -méthyl-2-pyrrolidone
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
nOe	<i>nuclear Overhauser effect</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
Np	nitrophényle
Nu	nucléophile
OBOC	<i>one-bead-one-compound</i>
Obs	observé
OVA	ovalbumine
oxLDL	<i>oxydized low-density lipoprotein</i>
PEG	polyéthylène glycol
Ph	phényle
Phe	phénylalanine
Phg	phénylglycine
Pip	acide pipécolique
Piv	acide pivalique
PLP	pyridoxale phosphate
PNP	<i>para</i> -nitrophénol

PMP	<i>para</i> -méthoxyphényle
POVPC	(1-palmitoyl 2-(5'-oxovaléroyl) phosphatidylcholine
PP	élastase pancréatique porcine
ppm	partie par million (en RMN)
Pr	propyle
<i>i</i> -Pr	<i>iso</i> -propyle
Pro	proline
pHis	phosphohistidine
pTza	phosphoryltriaazolylalanine
q	quartet (en RMN)
R _f	facteur de rétention (en chromatographie)
Rf	<i>radiofrequency</i>
RGD	Arg-Gly-Asp
RMN	résonance magnétique nucléaire
RPE	<i>retinal pigment epithelium</i>
rt	room temperature
RT	<i>retention time</i>
RP	<i>reverse phase</i>
RuAAC	<i>Ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>
s	singulet (en RMN)
Sar	sarcosine
SAR	<i>structure-activity relationship</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Ser	sérine
Sir2	<i>silent information regulator 2</i>
S _N 2	substitution nucléophile bimoléculaire
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
SRIF	<i>somatotropin release-inhibiting factor</i>

t	triplet (en RMN)
T	température
TBDMS	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyl
TBHP	<i>tert</i> -butyl hydroperoxide
TBTU	tetrafluoroborate de benzotriazol-1-yle 1,1,3,3-tetraméthyleaminium
TCDI	thiocarbonyldiimidazole
TEA	triéthylamine
TES	triéthylsilane
Tf	triflyle
TFA	acide trifluoroacétique
Theor	théorique
THF	tetrahydrofurane
Thr	thréonine
TLC	<i>thin layer chromatography</i>
TMS	tetraméthylsilane, triméthylsilyle
Tosyl	<i>p</i> -toluènesulfonyle
t.p	température pièce
Tr	triphénylméthyle (trityle)
t.r, T.R	temps de rétention
Trp	tryptophane
TrtCl	chlorure de triphénylméthyle
<i>p</i> -TsOH	acide <i>para</i> -toluènesulfonique
TSP-1	thrombospondine 1
Tyr	tyrosine
UV	ultraviolet
Val	valine
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VHC	virus de l'hépatite C
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

Remerciements

J'aimerais avant tout remercier mon directeur de thèse, William D. Lubell, de m'avoir acceptée au sein de son groupe en 2007 sans même m'avoir rencontrée. Bill : je te remercie sincèrement de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes résultats à d'inombrables conférences, chacune d'entre elles ayant été une expérience extrêmement enrichissante pour moi. Je te remercie également d'avoir toujours eu, et d'avoir encore aujourd'hui, mon meilleur intérêt à cœur, de m'avoir poussée à mes limites et de m'avoir toujours supportée. Finalement, merci pour ton célèbre franc-parlé et ton dévouement à la recherche.

Par la même occasion, je remercie les membres du groupe Lubell qui ont fait passage entre 2007-2012 et dont j'ai eu le plaisir de côtoyer. Je désire apporter une attention particulière à l'ensemble de postdocs exceptionnels qui faisaient parti du groupe Lubell à mes débuts, et qui ont été pour moi des mentors et des amis : Dr David Sabatino, Dr Andrew Jamieson, Dr Nicolas Boutard, Dr Luisa Ronga et Dr Teresa Lama. Un merci particulier à Tanya Godina, qui a su me rappeler à de nombreuses reprises à quel point le rire est le meilleur des remèdes, et à Yésica García Ramos et Kim Beauregard pour leur amitié. Je suis particulièrement reconnaissante à tous ceux et celles qui ont lu et corrigé mes chapitres de thèse : David Sabatino, Teresa Lama, Nicolas Boutard et Kim Beauregard. Finalement, je ne peux oublier de remercier Anna Tomberg et Émilie Canuel, mes deux stagiaires d'été qui ont accompli une quantité impressionnante de travail durant leur quatre mois au sein du groupe Lubell.

Je tiens également à remercier Mildred Bien-Aimé pour sa bonne humeur et son rire contagieux, mais surtout pour ses talents de résolution de problèmes créatifs! Je remercie également Mme Lyne Laurin et Mme Céline Millette au secrétariat de chimie pour leur service amical et efficace.

Je suis particulièrement redevable envers mes collaborateurs, avec une attention spéciale pour Petra Pohankova que je remercie pour son travail consciencieux et ses efforts infatigables. Merci également à Patrick Lambert-Lanteigne, Émilie Picard, Oliver Bolduc,

Michael Pruneau, Natalia Bukar, Dr Huy Ong, Dr Sylvain Chemtob et Dr Jean-François Masson. Les réunions entre les membres des différents groupes ont toujours été à la fois divertissantes et fructueuses!

Je voudrais remercier le personnel du centre régional de spectrométrie de masse (Dr Alexandra Furtos, Karine Venne, Marie-Christine Tang et Christophe Camy), du centre régional de RMN (Dr Minh Tan Phan Viet, Sylvie Bilodeau, Antoine Hamel, Cédric Malveau et Geneviève Beaudry-Dubois), du laboratoire de diffraction des rayons X (Françine Bélanger), et du laboratoire de chimie combinatoire (Dr Pierre Lavallée, Fabrice Galaud et Benoît Jolicoeur). J'éprouve également une profonde reconnaissance envers Dr Jeffrey W. Keillor, Dr Andreea R. Schmitzer, Dr Joelle N. Pelletier et les membres de leurs groupes respectifs d'avoir si gentiment mis leurs instruments à ma disposition. Merci aussi aux membres du groupe de recherche du Dr André B. Charrette et Dr Stephen Hanessian pour le prêt occasionnel de produits chimiques.

Je remercie les techniciennes de laboratoire Huguette Diné et Hélène Laliberté, les professeurs responsables ainsi que tous et toutes mes étudiant(e)s en CHM 1501 et CHM 2979. Les démonstrations, qui me permettaient de m'évader de la recherche pour quelques heures par semaine, ont toujours été un grand plaisir pour moi. Je remercie les étudiants pour leur intérêt et leur enthousiasme rafraichissant.

Un merci tout spécial à mes amis et à ma famille pour leur soutien, leur patience et leurs encouragements. Bien sûr, un gros merci à Vincent, qui a été pour moi une source d'inspiration et de motivation inépuisable durant les cinq dernières années, et qui continuera sans doute à l'être dans les années à venir. Merci pour ta patience et ta gentillesse.

Finalement, j'éprouve une grande reconnaissance envers le Conseil en recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et Boehringer Ingelheim pour le support financier durant mes études graduées.

À mes parents.

Chapitre 1: Introduction

1.1 L'utilisation de peptides en tant que médicaments

Les peptides et les protéines sont des bio-polymères enchaînant des acides aminés comme sous-unités dites « riches en information » ; la périodicité et la nature des chaînes latérales des monomères, aussi appelée structure primaire d'un peptide ou d'une protéine, dicte leur repliement tridimensionnel précis et, par conséquent, leur fonction. Les peptides régulent une panoplie de fonctions physiologiques, notamment en tant qu'hormones (ex : angiotensine, bradykinine, vasopressine, oxytocine, insuline, glucagon, gastrine, ghréline) et neurotransmetteurs (ex : somatostatine, neuropeptide Y, encéphaline, substance P). Ils constituent des agents thérapeutiques particulièrement attrayants, en comparaison à de petites molécules, du fait de leur plus grande spécificité, de leur moindre toxicité et de leur activité accrue. Certains peptides naturels comme l'insuline, la vancomycine, l'oxytocine et la cyclosporine, ou synthétiques tels que l'enfuvirtide (Fuzeon®, Roche) et l'eptifibatide (Integrilin®, Millennium Pharmaceuticals), ont fait leur preuve comme médicaments.¹ L'étude et l'utilisation des peptides en tant que médicaments ont connu un succès grandissant depuis les travaux révolutionnaires de Merrifield et l'introduction de la synthèse peptidique sur support solide (SPPS) en 1963, facilitant grandement leur préparation.²

En revanche, les peptides utilisés comme médicaments souffrent principalement de leur dégradation rapide par les protéases et de problèmes de lipophilicité dans certains cas, de sorte qu'une administration intraveineuse est souvent requise. De plus, la flexibilité conformationnelle des peptides, notamment au niveau des angles phi (ϕ) et psi (ψ) de la chaîne principale, ainsi que des angles chi (χ) des chaînes latérales (Figure 1.1), peut engendrer des effets secondaires dûs à leur interaction avec plusieurs sous-types de récepteurs. En effet, en solution, les courtes chaînes peptidiques sont libres d'adopter différentes conformations énergétiquement équivalentes. Un peptide peut adopter comme structures secondaires particulières la conformation d'une hélice α , de feuillets β plissés, ou de repliements β (Figure 1.1). Cependant, contrairement aux protéines, les interactions intramoléculaires qui maintiennent un peptide dans une conformation spécifique sont peu nombreuses et trop faibles pour compenser la perte d'entropie qui les accompagne.³

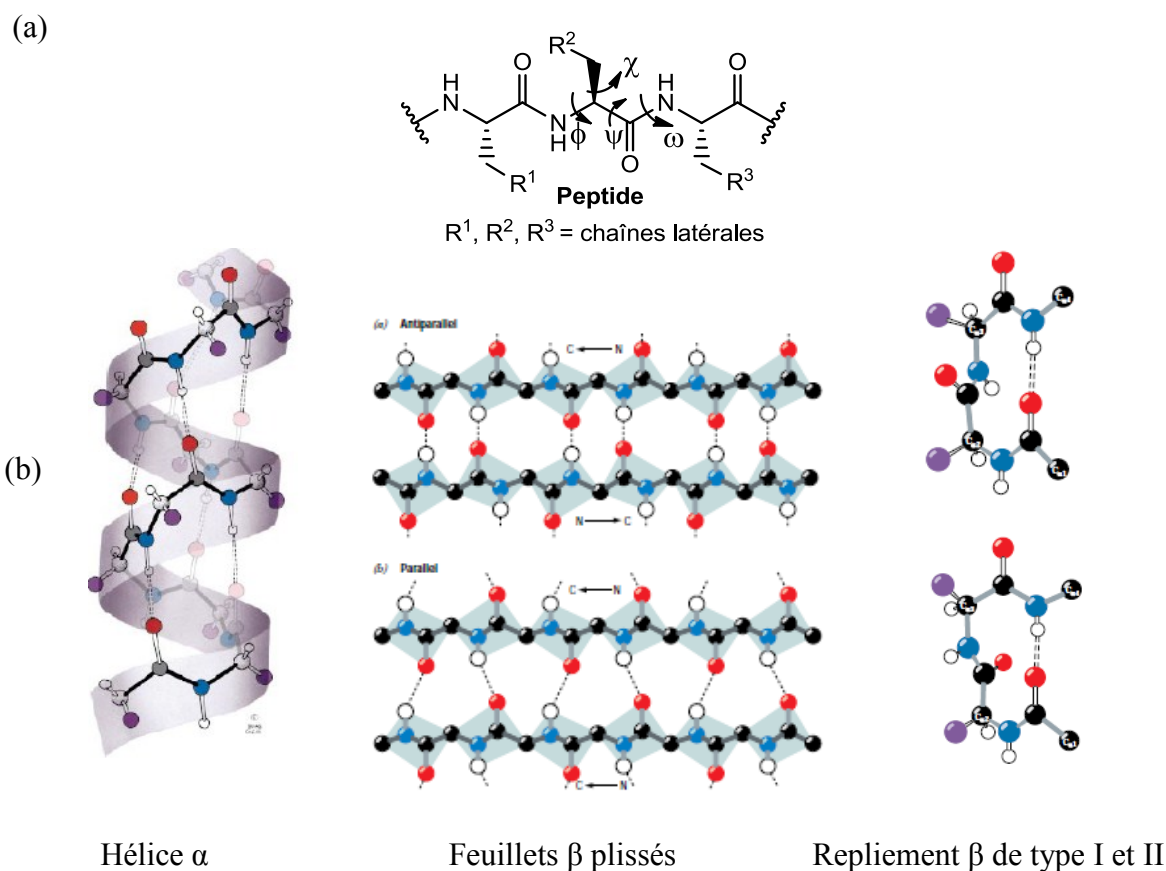


Figure 1.1 (a) Représentation des angles dièdres dans un peptide. (b) Structures secondaires des peptides et protéines possibles.⁴

Afin de répondre aux limitations des peptides en tant que médicaments tout en conservant leurs avantages, plusieurs modifications structurales du squelette peptidique sont souvent envisagées, générant ainsi des « mimes peptidiques ». Le peptidomimétisme vise donc à développer des analogues plus stables et plus rigides, qui maintiennent la topologie et l'activité biologique désirée du peptide naturel et lui confèrent une meilleure sélectivité.

1.2 Repliements β et peptidomimétisme

Les repliements β (ou coudes β , Figure 1.2) se manifestent par une inversion de la direction de la chaîne peptidique impliquant quatre acides aminés ($i, i + 1, i + 2, i + 3$) et

constituent 25-30% des structures secondaires des protéines. Par définition, les repliements β (a) possèdent généralement un pont hydrogène entre le carbonyle d'un résidu (i) et l'amide d'un acide aminé trois résidus plus loin ($i+3$) et (b) ont une distance $\leq 7\text{\AA}$ entre les carbones α de ces deux acides aminés (Figure 1.2). Il est à noter que les carbones α sont les atomes de carbone de la chaîne principale sur lesquels la chaîne latérale est fixée.

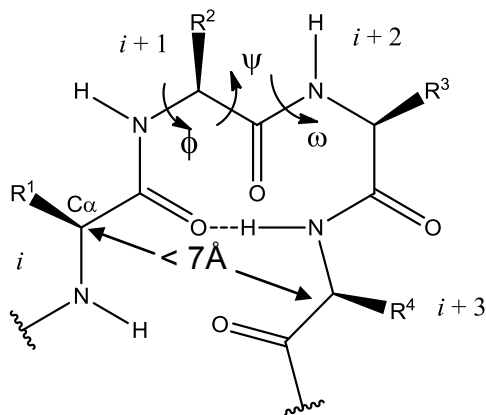


Figure 1.2. Repliement β .

Tableau 1.1 Valeurs idéales des angles dièdres pour les repliements β .⁶

Type de repliement β	ϕ_{i+1} (°)	ψ_{i+1} (°)	ϕ_{i+2} (°)	ψ_{i+2} (°)
I	-60	-30	-90	0
II	-60	120	80	0
VIII	-60	-30	-120	120
I'	60	30	90	0
II'	60	-120	-80	0
VIa1	-60	120	-90	0
VIa2	-120	120	-60	0
VIb	-135	135	-75	160
IV	<i>toutes autres valeurs</i>			

Suite à la classification mise sur pied par Venkatachalam en 1968,⁵ Hutchinson et Thornton ont défini neuf types de repliements β , soit les repliements β de type I, I', II, II', VIa1,

VIa2, VIb, VIII et IV.⁶ Ces derniers diffèrent par les valeurs de leurs angles dièdres phi (ϕ) et psi (ψ) (Tableau 1.1), les repliements β de type I et II étant les plus fréquemment observés. Il est à noter qu'une déviation de $\pm 30^\circ$ pour trois des angles dièdres, et de 45° pour le quatrième angle dièdre, est généralement acceptée.⁶

Les repliements β sont essentiels au processus d'initiation du repliement protéique.⁷ Du fait de leur présence fréquente en surface des protéines, ils constituent également d'importants sites de reconnaissance lors de la liaison d'un ligand à son récepteur et lors d'interactions protéines-protéines.⁸ Par exemple, des études cristallographiques de complexes anticorps-peptide ont révélées une conformation en repliement β chez des peptides liés aux anticorps.⁹ La conception de mimes peptidiques est basée sur l'introduction de contraintes conformationnelles, de nature covalente ou électronique, qui stabilisent la conformation bioactive du peptide. Cette stratégie vise à réduire le coût entropique associé à la liaison du ligand à sa cible, qui est estimé à 5-6 kcal/mol par degré de liberté rotationnelle perdu.¹⁰ À cette fin, la proline constitue la contrainte covalente la plus simple à introduire. En effet, la proline est un des acides aminés naturels les plus souvent retrouvés dans un repliement β , plus particulièrement à la position $i + 1$ d'un repliement β de type I et II (lien amide *trans*) ou la position $i + 2$ d'un repliement de type VI (lien amide *cis*). Dû à sa nature cyclique, l'angle ϕ de la proline est limité à une valeur de -60° . Ainsi, le remplacement systématique de chaque acide aminé d'une séquence peptidique par une proline, ou « proline-scan », est une stratégie souvent utilisée pour vérifier si la conformation d'un repliement β induit par la proline (contrainte de l'angle ϕ) est favorable à la liaison du ligand à sa cible.¹¹

Afin d'explorer une plus large gamme de restrictions conformationnelles et accéder à un plus grand nombre de types de repliements β , plusieurs groupes de recherche ont axé leurs efforts vers la conception et le développement de peptidomimétiques plus élaborés. Par exemple, la synthèse de peptides comportant des prolines substituées,¹² de lactames dites « de Freidinger »,¹³ de spirolactames,¹⁴ de benzodiazepines¹⁵ ainsi que d'une multitude d'acides aminés azabicycloalcanes,¹⁶ ont fourni des analogues peptidiques avec une conformation en repliement β nettement favorisée (Figure 1.3). L'utilisation de

contraintes électroniques, telle qu'observée chez les azapeptides, est une autre stratégie qui est employée pour rigidifier un peptide et favoriser un repliement β (Figure 1.3).

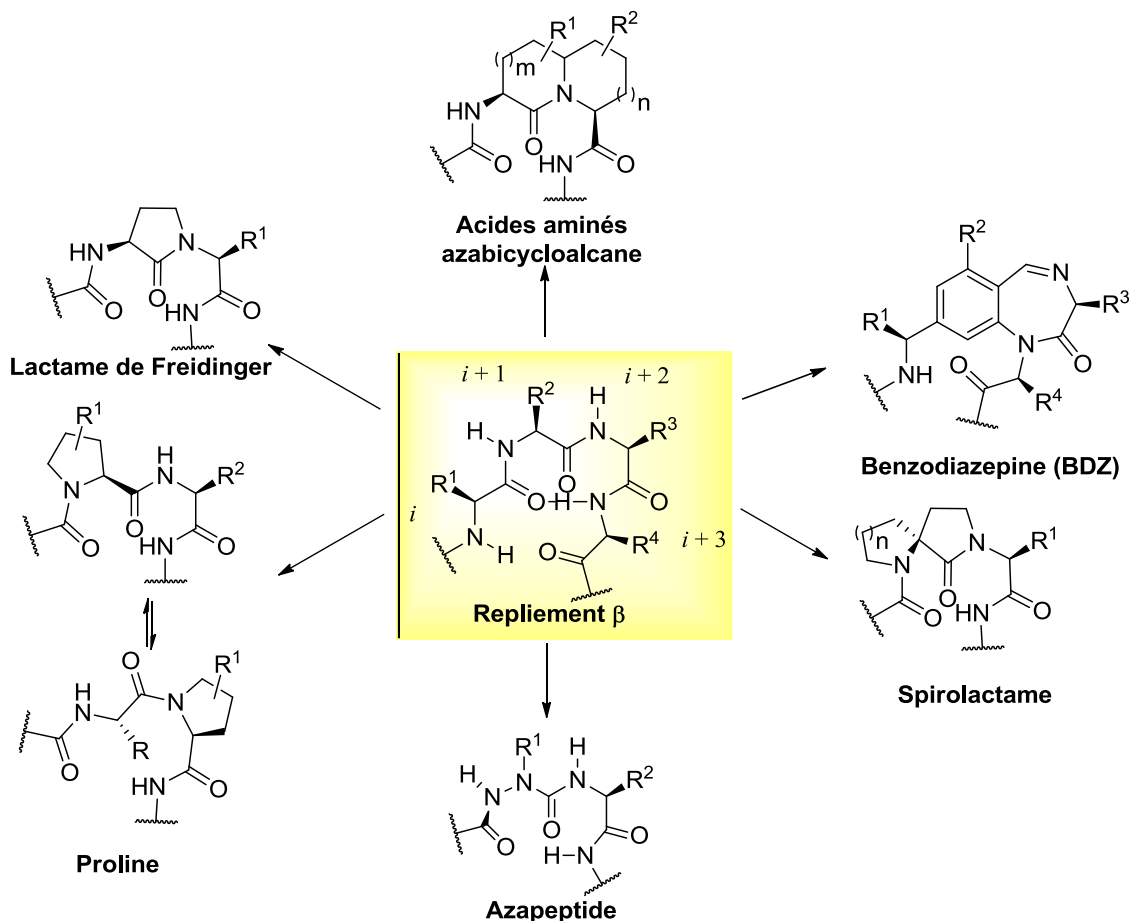


Figure 1.3. Exemples de contraintes favorisant la conformation de repliements β .

Puisque chacun de ces systèmes impose des contraintes différentes sur les angles dièdres ϕ^{i+1} , ψ^{i+1} , ϕ^{i+2} et ψ^{i+2} , ils peuvent être utilisés de façon complémentaire. Par exemple, l'utilisation d'un balayage d'acides aminés « aza », en combinaison avec l'incorporation d'acides aminés indolizidinones, a permis de confirmer l'importance d'un repliement β de type II' pour l'activité agoniste du peptide $[D^{31}, P^{34}, F^{35}]CGRP_{27-37}$.¹⁷

1.3 Les azapeptides en tant que mimes peptidiques

Les azapeptides sont des mimes peptidiques qui possèdent un ou plusieurs acides aminés « aza », où le carbone α est substitué par un atome d'azote (Figure 1.3).¹⁸ Cette

modification structurelle engendre la perte d'un centre chiral, ainsi que (a) une stabilité accrue, dû à la présence d'une fonction urée plutôt qu'un lien amide, (b) une résistance aux protéases et (c) une tendance à adopter la conformation de coudes β . Par le fait même, la réduction de flexibilité induite par le résidu « aza » peut augmenter la puissance et la sélectivité d'un médicament en favorisant la conformation essentielle à sa liaison à une cible donnée, tout en défavorisant la conformation étendue nécessaire à la liaison à plusieurs protéases.

Toutes ces propriétés confèrent aux azapeptides un fort potentiel en tant qu'agents thérapeutiques, notamment en tant que ligands de récepteurs et inhibiteurs d'enzyme, malgré les défis synthétiques que présente la chimie des hydrazines. À titre d'exemple, [D-Ser(*t*-Bu)⁶, azaGly¹⁰]-LHRH goserelin (**1**, Zoladex®, AstraZeneca), est un agoniste de l'hormone de libération de la lutéinostimuline (LHRH) utilisé pour le traitement des cancers de la prostate et du sein, et Atazanavir (**2**, Reyataz®, Bristol Myers) est un médicament agissant comme inhibiteur de la protéase du VIH (Figure 1.4).

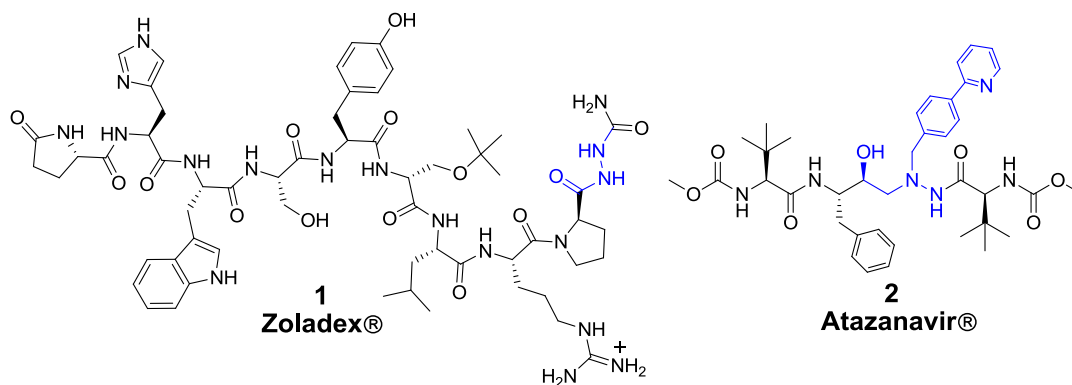


Figure 1.4. Structure de Zoladex et Atazanavir.

1.3.1. Les propriétés conformationnelles des azapeptides

La substitution du carbone α par un atome d'azote provoque une perte de flexibilité au niveau du mime peptidique, en raison de la répulsion électronique entre les paires d'électrons libres des deux atomes d'azote adjacents (NH-N α) et la géométrie plane de l'urée (N α -C(O)-NH).¹⁸ Plus précisément, cette modification structurelle impose des

contraintes aux angles dièdres phi (ϕ) et psi (ψ), de sorte que la formation de repliement β est favorisée (Figure 1.5). Cette particularité des azapeptides a été confirmée par cristallographie aux rayons X, spectroscopie RMN et infrarouge, et prédite par des études théoriques.

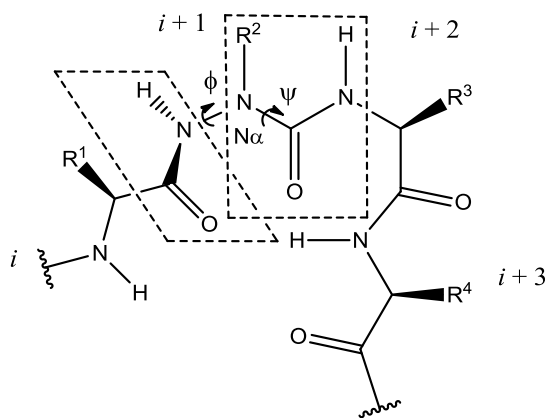


Figure 1.5. Représentation d'un repliement β induit par l'introduction d'un acide aminé « aza ».

1.3.1.1 Études théoriques

Par souci de simplification, plusieurs groupes de recherches ont dirigé leurs efforts vers des études conformationnelles de la *N,N'*-diformylhydrazine.¹⁹ Selon ces modèles, les trois configurations possibles pour la *N,N'*-diformylhydrazines (*E,E*; *E,Z* et *Z,Z*) démontrent que le rotamère plaçant les doublets d'électrons à un angle entre 90-101° est le plus stable, grâce la minimisation de la répulsion électronique. Cependant, la configuration *Z,Z*, qui représente mieux la configuration *trans* des liens amides chez les peptides, possède un deuxième minimum où les doublets d'électrons libres sont à un angle de 180° l'un par rapport à l'autre (Figure 1.6). La barrière de rotation de seulement 0.8-3.2 kcal/mol s'explique par la présence de ponts hydrogènes qui stabilise cet isomère conformationnel.¹⁹

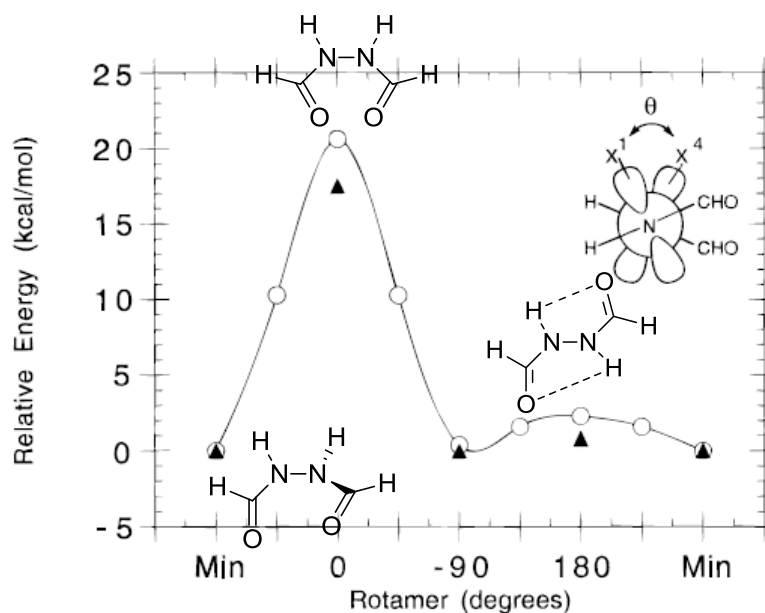


Figure 1.6. Énergie relative pour les rotamères de configuration *Z,Z*. Les degrés représentent l'angle phi (ϕ).¹⁹

Pourtant, lorsque la *N,N'*-diformylhydrazine est co-cristallisée en présence de 18-couronne-6-éther, l'angle dièdre C(O)-N-N-C(O) s'approche de 90° et donc dévie de l'angle de 180° observé lorsque la *N,N'*-diformylhydrazine est cristallisée seule, illustrant l'importance des interactions intermoléculaires à l'état solide (Figure 1.7).¹⁹

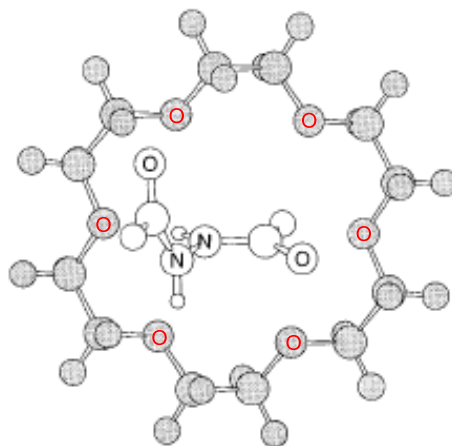


Figure 1.7. Structure cristalline de la *N,N'*-diformylhydrazine co-cristallisée avec du 18-couronne-6-éther.¹⁹ Les atomes d'oxygène sont démarqués en rouge.

L'ajout d'un groupement méthyle sur un des deux atomes d'azote pour donner la (Z,Z)-N-méthyl-N,N'-diformylhydrazine parvient à déstabiliser ce rotamère de 5 kcal/mol, et l'angle dièdre C(O)-N-N-C(O) du rotamère le plus stable s'approche de $\pm 90^\circ$. De plus, la configuration Z,E, illustrant le cas où un des liens peptidiques seraient en configuration *cis* (proline, aza-proline), déstabilise également le rotamère $\phi = 180^\circ$ de 7.3 kcal/mol.¹⁹ La nette préférence pour un angle dièdre de $\pm 90^\circ$ entre les deux doublets d'électrons libres pour la (Z,Z)-N-méthyl-N,N'-diformylhydrazine devrait pouvoir se traduire en de contraintes similaires sur l'angle ϕ des azapeptides. Sauf exception pour l'aza-glycine, qui pourrait également adopter un angle ϕ de 180° par analogie avec la N,N'-diformylhydrazine, les azapeptides avec une substitution sur l'azote α devraient donc avoir un angle ϕ limité à $\pm 90 \pm 30^\circ$.

L'étude théorique de systèmes plus complexes de types Ac-azaXaa-Ala-NHMe et Ac-Ala-azaXaa-NHMe, où azaXaa = azaGly et azaAla, a aussi été effectuée.²⁰ De ces études, plusieurs conclusions peuvent être tirées : (a) l'incorporation d'un résidu azaGly ou azaAla à la position $i + 1$ favorise la formation d'un repliement β de type I, (b) l'incorporation d'un résidu « aza » à la position $i + 2$ favorise la formation d'un repliement β de type II et (c) considérant des séquences peptidiques plus longues, la formation de repliement β de type II avec un acide aminé « aza » dans la position $i + 2$ devrait être légèrement favorisé.²⁰ L'étude théorique du tri- et tétrapeptide Boc-Phe-azaLeu-Ala-OMe²¹ et Boc-Ala-Phe-azaLeu-Ala-OMe²² démontrent que l'effet de l'acide aminé « aza » est conservé dans de plus longues séquences peptidiques, avec une conformation favorisée en repliement β II dans les deux cas. De façon similaire, l'étude de modélisation *ab initio* de systèmes Boc-Xaa-azaPhe-Ala-OMe, où Xaa = Gly, Ala, Phe, Asn, a démontré que la nature de l'acide aminé précédant le résidu « aza », de même que la nature de la chaîne latérale de l'acide aminé azaPhe, ne perturbait pas la préférence conformationnelle en coude β II du squelette peptidique.²³

En plus d'entraîner des perturbations conformationnelles, la substitution d'un carbone par un atome d'azote cause aussi la perte d'un centre chiral. Les études théoriques démontrent que la géométrie pyramidale ou planaire des azotes de la N,N'-

diformylhydrazine varie en fonction des angles dièdres : la pyramide avec la hauteur la plus importante est obtenue lorsque l'angle dièdre $C(O)-N-N-C(O) = 0^\circ$, alors qu'une géométrie planaire est prédite lorsque cet angle dièdre = 180° .²⁰ La configuration relative des deux azotes est toujours identique, de sorte que les stéréoisomères (*R*, *R*) et (*S*, *S*) sont plus stables que leurs diastéréoisomères (*S*, *R*) ou (*R*, *S*). Pour des séquences peptidiques plus longues, les prédictions démontrent que la configuration absolue de l'azote α dépend du type de repliement β adopté et de la position de l'acide aminé « aza » dans le coude. Plus spécifiquement, l'azote α adopte la configuration (*R*) dans un coude βI et (*S*) dans un coude $\beta I'$. Dans les coudes βII et $\beta II'$, la configuration de l'azote α dépend de sa position dans le repliement : lorsque retrouvé à la deuxième position ($i + 1$), il adopte la configuration (*R*) dans un coude βII et (*S*) dans un coude $\beta II'$, alors que l'inverse est observé lorsque l'acide aminé « aza » occupe la troisième position ($i + 2$).²⁰

1.3.1.2 Cristallographie aux rayons X

Les propriétés conformationnelles d'aza di- et tripeptides modèles ont également été étudiées par cristallographie aux rayons X, principalement grâce aux travaux de Marraud, Aubry, Boussard *et al.*^{24,25,26,27,28,29} Les systèmes étudiés peuvent être sous-divisés en trois catégories, soit (1) les séquences qui possèdent une proline, de type R-azaXaa-Pro-NHiPr (R = Boc, Cbz)²⁵ ou Piv-Pro-azaXaa-NHiPr,^{24,25} (2) les séquences qui contiennent un résidu aza-proline, de type Boc-Ala-azaPro-NHiPr,²⁷ Z-azaPro-Ala-NHiPr²⁷ ou Boc-Ala-azaPro-Xaa-NHiPr²⁶ et (3) les séquences qui possèdent un résidu 2-aza-pipécolyle (homoproline), de type Boc-Ala-azaPip-NHiPr,²⁸ Piv-azaPip-Ala-NHiPr²⁸ ou Boc-Ala-azaPip-Ala-NHiPr (Tableau 1.2).²⁹ L'incorporation de résidus aza-homoproline permet d'étudier l'effet de la taille de l'hétérocycle (cycle à 6 vs cycle à 5) sur la conformation des peptides modèles.

Il est connu que la proline occupe préférentiellement la position $i + 1$ de repliement βI ou βII ,³⁰ de sorte qu'un dipeptide de type L-Xaa-Pro ne devrait pas adopter une conformation rigide spécifique. Les séquences de types D-Xaa-Pro ont démontré, quant à

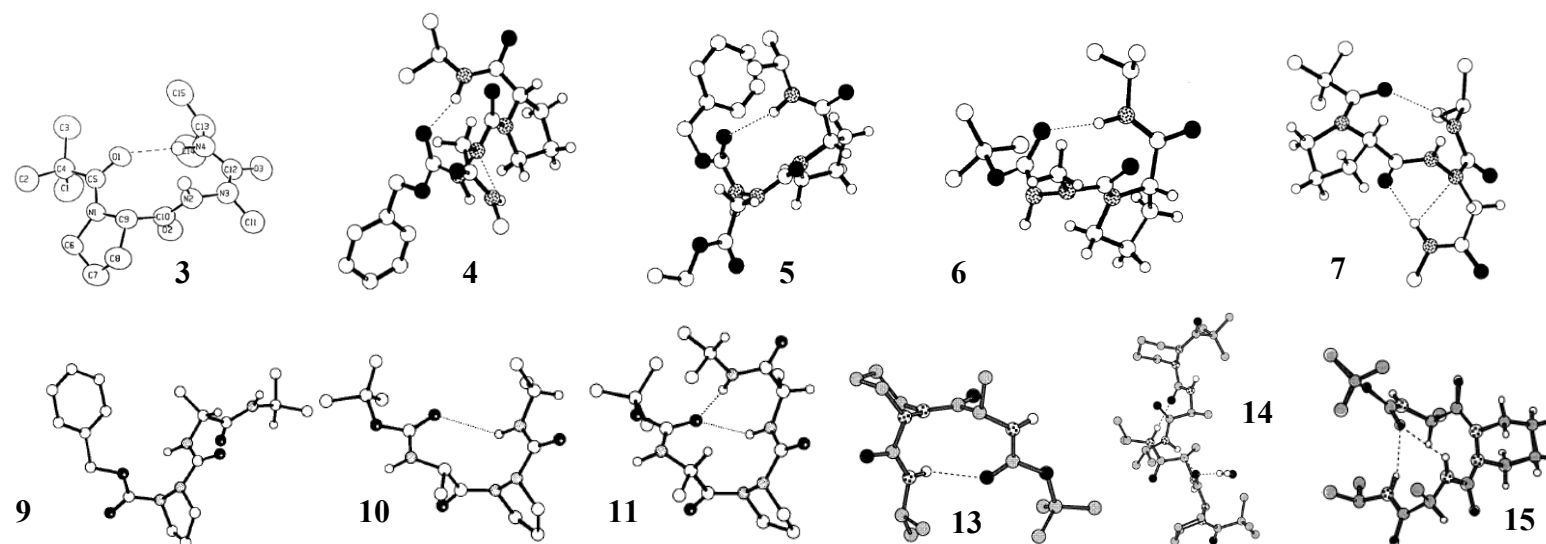


Tableau 1.2. Données cristallographiques d'azapeptides modèles.

Azapeptide	Chiralité du N α	Type de repliement	ϕ_1 (°)	ϕ_1 (°)	ω_1 (°)	ϕ_2 (°)	ϕ_2 (°)	ϕ_3 (°)	ϕ_3 (°)
3 Piv-Pro-azaAla-NHiPr ²⁴	Achiral	β II	-64	137	180	70	16		
4 Z-azaAsn(Me)-Pro-NHiPr ²⁵	<i>R</i>	β I			-171	-76	-15	-52	-37
5 Z-azaAsp(OEt)-Pro-NHiPr ²⁵	<i>R</i>	β I			-178	-67	-24	-61	-30
6 Boc-azaAla-Pro-NHiPr ²⁵	<i>R</i>	β I			172	-68	-18	-58	-25
7 Piv-Pro-azaAsn(Me)-NHiPr ²⁵	Achiral	β II	-62	140	-178	81	2		
8 Boc-Ala-(Me)azaAla-Ala-NHiPr ²⁶	Achiral	β VI + α	-58	137	15	-107	15	-67	-33
9 Z-azaPro-Ala-NHiPr ²⁷	<i>R</i>	Aucun			-23	111	-22	-93	142
10 Boc-Ala-azaPro-NHiPr ²⁷	<i>S</i>	β VI	-70	148	14	-112	23		
11 Boc-Ala-azaPro-Ala-NHiPr ²⁶	<i>S</i>	β VI + α	-60	137	21	-111	18	-76	-32
12 Boc-Ala-azaPro-D-Ala-NHiPr ²⁶	<i>S</i>	β VI	-53	137	18	-110	34	74	-148
13 Boc-Ala-azaPip-NHiPr ²⁸	<i>S</i>	β VI	-64	141	10	-110	27		
14 Piv-azaPip-Ala-NHiPr ²⁸	<i>R</i>	Aucun			-2.8	111	-19	-100	167
15 Boc-Ala-azaPip-Ala-NHiPr ²⁸	<i>S</i>	β VI	-58	137	16	-113	22	-76	-34

elle, une préférence pour l'isomère *trans* de la liaison amide en *N*-terminale de la proline et une conformation en coude β de type II'.⁸ Lorsque le résidu qui précède la proline est un acide aminé « aza », les données cristallographiques démontrent clairement une préférence pour un repliement β I où l'azote α adopte la configuration *R* (Tableau 1.2, entrées 2-4). Ceci illustre bien le concept de chiralité adaptative dont font preuve les azapeptides : l'azote α peut soit être de géométrie trigonale planaire ou pyramidale (configuration *R* ou *S*), mais adopte dans ce cas la configuration *R* qui permet de rigidifier l'azapeptide en une conformation de coude β . La stéréochimie – ou l'absence de stéréochimie – de l'acide aminé « aza » dépend donc hautement de la séquence peptidique.

L'acide aminé aza-proline favorise l'isomère *cis* du lien amide ($\omega_1 = -23$ à 21°) et la formation de repliement β VI avec le résidu précédant, soit avec azaPro à la position $i + 2$ du coude β VI (Figure 1.8). En effet, *Z*-azaPro-Ala-NHiPr (**9**) n'adopte pas de repliement β alors que les structures cristallines de Boc-Ala-azaPro-NHiPr (**10**), Boc-Ala-azaPro-Ala-NHiPr (**9**) et Boc-Ala-azaPro-D-Ala-NHiPr (**12**) démontrent tous les trois une conformation β VI avec l'aza-proline à la position $i + 2$ et une chiralité *S* sur l'azote.^{26,27} Ainsi, la configuration (*L* ou *D*) du résidu suivant l'aza-proline n'affecte pas la conformation globale du tripeptide. En comparaison avec la proline, l'aza-proline est donc encore plus rigide, empêchant la formation de repliement β de type I et II avec $\omega_1 = 180^\circ$. Cette rigidité accrue semble être une conséquence directe de la *N*-alkylation, plutôt qu'à la présence du cycle pyrazolidine, puisque Boc-Ala-(Me)azaAla-Ala-NHiPr (**8**) démontre également une conformation favorisée en coude β VI avec l'angle dièdre $\omega_1 = 15^\circ$.²⁶ De façon analogue à l'aza-proline, il a été démontré que Boc-Ala-azaPip-NHiPr (**13**) et Boc-Ala-azaPip-Ala-NHiPr (**21**), où azaPip = aza-homoproline, favorise également la formation d'un repliement β VI avec le résidu précédant.^{28,29} Encore une fois, Piv-azaPip-Ala-NHiPr (**14**) demeure en conformation étendue.²⁸ À noter que la portion hétérocyclique du résidu azaPip est en conformation chaise.

Les aza di- et tripeptides de cette banque de données cristallographiques possèdent tous un résidu cyclique proline, aza-proline ou aza-homoproline. De ce fait, l'effet de l'acide aminé « aza » sur la conformation, en l'absence d'un résidu favorisant déjà un repliement β , n'a pas encore été élucidé par cristallographie aux rayons X.

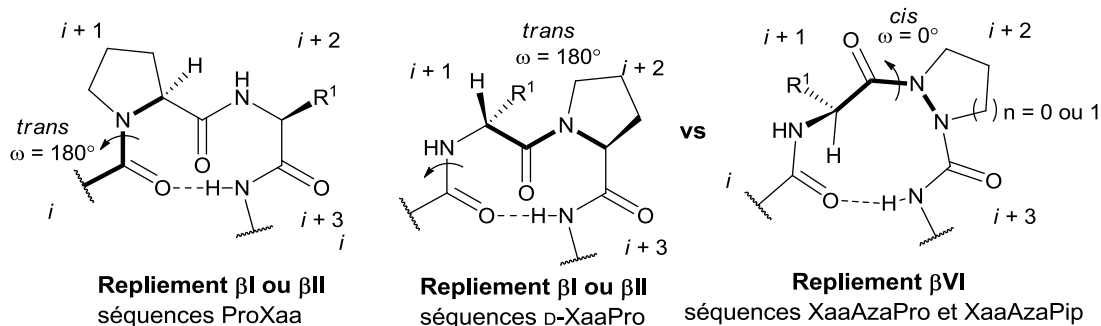


Figure 1.8. Repliements de type I et II induits par la proline à la position $i + 1$ ou $i + 2$ vs repliement de type VI induit par l'azaproline à la position $i + 2$.

1.3.1.3 Spectroscopie RMN et IR des azapeptides

Certaines informations sur la conformation des azapeptides peuvent être obtenues par spectroscopie RMN et IR. Par exemple, ils existent des expériences RMN qui permettent de vérifier la présence d'un pont hydrogène intramoléculaire. Celles-ci consistent à étudier l'effet de (1) la température et (2) du pourcentage de DMSO- d_6 dans un mélange CDCl₃/DMSO- d_6 sur le déplacement chimique (ppm) des signaux NH. Un proton NH participant à une liaison hydrogène (non exposé au solvant) sera moins sensible à l'ajout de DMSO- d_6 .³¹ Pour de courts peptides, cette technique est plus souvent appliquée que les expériences de variation de température. En effet, les températures élevées peuvent affecter la conformation du peptide et ce type d'expérience est parfois critiqué pour manque de fiabilité.³² La spectroscopie infrarouge permet également de vérifier la présence d'un pont hydrogène : un pic étroit vers 3400-3500 cm⁻¹ est caractéristique d'une l'élongation N-H non-liée, alors qu'un pic plus large à 3200-3400 cm⁻¹ correspond généralement à une élongation N-H impliquée dans une liaison hydrogène.³³ Des interactions caractéristiques observées par NOE peuvent aider à confirmer la présence d'un repliement β , ainsi que de distinguer entre un coude β de type I ou II (Figure 1.9).

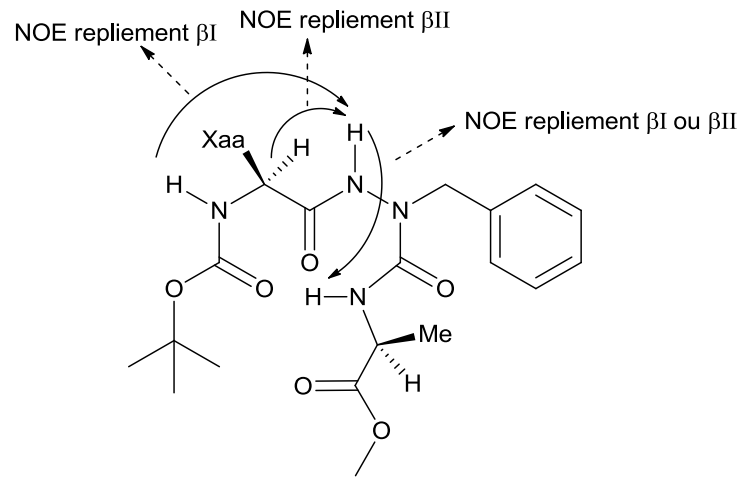


Figure 1.9. Interactions NOE détectées pour les repliements de type I et II.²²

À titre d'exemple, l'étude conformationnelle du tripeptide Boc-Phe-AzaLeu-Ala-OMe en solution a révélé la présence d'un repliement β II.²¹ Entre autre, une variation du déplacement chimique en fonction de la température plus petite pour le NH de l'alanine dans le DMSO- d_6 vs les autres résidus a été observée ($\Delta\delta/\Delta T = -3.3$ ppb/K vs -4.5 et -9.6 ppb/K).²¹ De plus, le déplacement chimique du Ala-NH en passant du CDCl_3 comme solvant au DMSO- d_6 est beaucoup moins affecté ($\Delta\delta = 0.26$) que les autres signaux amides ($\Delta\delta$ 2.31 et 2.50), suggérant que le NH en question est impliqué dans une liaison hydrogène. De façon similaire, le titrage au DMSO- d_6 a été utilisé pour confirmer la présence de repliement β dans des di- ou tripeptides possédant un résidu azaAsn ou azaAsp,³⁴ azaPro,³⁵ et azaPip.²⁹ En moyenne, les déplacements chimiques des NH exposés au solvant varient de 1-2.5 ppm en augmentant le %DMSO- d_6 dans le CDCl_3 de 0.1 à 100%, alors que les NH impliqués dans un pont hydrogène ne sont pas aussi sensibles à la variation de solvant (≤ 0.5 ppm).

1.3.2 Stabilité et résistance aux protéases des azapeptides. Application à la synthèse d'inhibiteurs de protéases à cystéine et à sérine.

Les acides aminés « L » sont souvent remplacés par leurs énantiomères « D » dans le but d'augmenter la résistance aux protéases, et donc la durée de vie des peptides. De façon

analogue, la substitution d'un acide aminé d'une séquence peptidique par l'acide aminé « aza » correspondant pourrait augmenter la stabilité vis-à-vis certaines protéases, puisque ces derniers sont des constituants peptidiques non-naturels. Afin de vérifier cette hypothèse, la stabilité de trois peptides modèles, soit Lys-Phe-Leu, Lys-azaPhe-Leu et Lys-D-Phe-Leu, a été comparée en présence de différentes peptidases (aminopeptidase, carboxypeptidase, thermolysine).³⁶ Les résultats obtenus démontrent que l'aza-tripeptide et le tripeptide possédant un résidu D-phénylalanine démontrent une résistance accrue face à ces protéases, comparativement au tripeptide Lys-Phe-Leu.³⁶ Dans le cas où les azapeptides adoptent la conformation d'un coude β , cette déviation de la conformation étendue (ruban β) pourrait également contribuer à la résistance aux protéases, qui semblent reconnaître préférentiellement des substrats avec une conformation étendue plutôt que des peptides qui adoptent des conformations d'hélices α ou de coudes β (Figure 1.10).³⁷

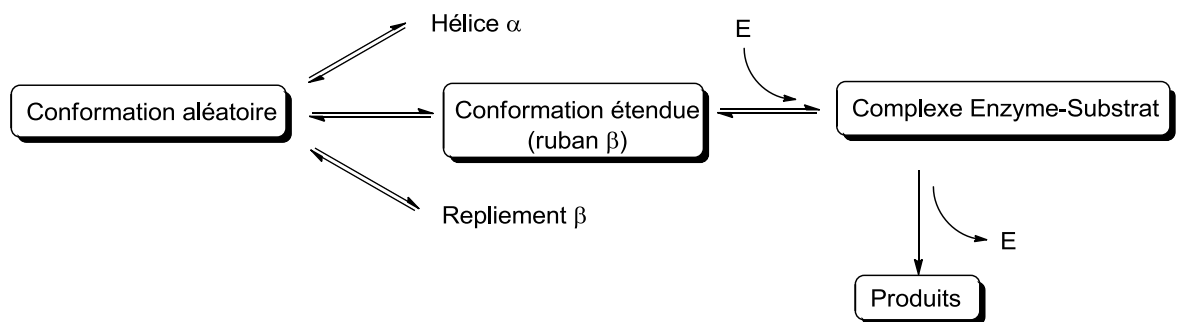


Figure 1.10. Équilibre conformationnel chez les substrats et inhibiteurs, et sélection conformationnelle proposée pour les protéases.³⁷

Plusieurs groupes de recherche ont tiré avantage de la stabilité supérieure des azapeptides afin de synthétiser des inhibiteurs d'enzymes, notamment de protéases à sérine et à cystéine. La conception de ces inhibiteurs est basée principalement sur le fait que la substitution du carbone α par un atome d'azote de l'acide aminé en position P1 (a) réduit l'électrophilicité et/ou (b) provoque un changement de conformation local qui perturbe l'orientation du carbonyle, de sorte que le complexe acyl-enzyme (**18**) est désactivé vis-à-vis l'attaque nucléophile de l'eau lors de la dernière étape de l'hydrolyse du lien peptidique (Figure 1.11). Il est à noter que les liaisons amides des acides aminés de part et d'autre du résidu « aza » demeurent vulnérables à l'hydrolyse. En étudiant la décomposition d'esters

(*p*-nitrophényl acétate, Cbz-Gly-OPNP) versus des esters d'azapeptides (*N*-acetyl-azaPhe-OPNP, *N*-méthoxycarbonyl-azaPhe-OPNP) en présence d'hydroxylamine comme nucléophile, une accélération dans la décomposition des esters *p*-nitrophényl acétate et Cbz-Gly-OPNP a été observée, caractérisée par une libération de *p*-nitrophénol.³⁸ Les esters d'azapeptides, quant à eux, n'ont démontré aucune augmentation de décomposition, suggérant que les acides aminés « aza » seraient à la fois chimiquement et métaboliquement plus stables que les acides aminés naturels. Dans une autre étude, il a été démontré que Ac-Ala-Ala-azaAla-ONp forme un complexe acyl-enzyme plus stable avec l'élastase leucocytaire humaine (HL) et pancréatique porcine (PP) comparativement à Ac-Ala-Ala-Ala-ONp. Dans ce cas, l'hypothèse avancée pour expliquer la différence de stabilité entre les complexes acyl-enzymes est basée sur le changement d'orientation du carbonyle, induit par la substitution du carbone α (géométrie tétraédrique) par un atome d'azote (géométrie plane triangulaire ou pyramidale), vers une conformation moins propice à l'hydrolyse.³⁹ Étant donné la plus large barrière de rotation autour de la liaison $N\alpha-C(O)$, par analogie à la barrière de rotation de 18 kcal/mol pour une liaison amide,⁴⁰ par rapport à la liaison $C\alpha-C(O)$, le coût énergétique pour le changement de conformation d'un azapeptide vers une conformation réactive pourrait être trop important.^{41,42}

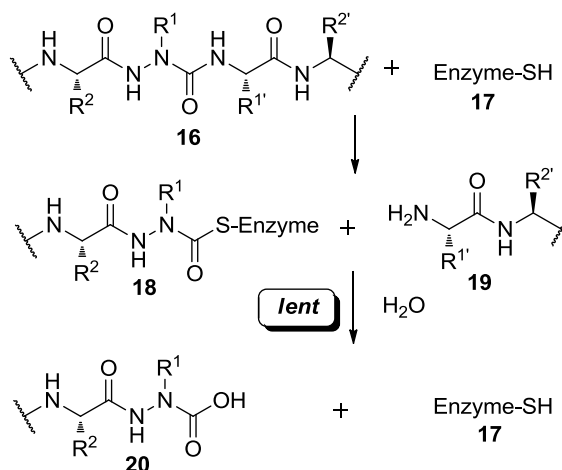


Figure 1.11. Mécanisme postulé pour l'inhibition des protéases à sérine et à cystéine par les azapeptides, où l'acide aminé « aza » est incorporé à la position P1.⁴³

Plusieurs azapeptides inhibiteurs de protéases comportent également un résidu électrophile en P1 afin de permettre l'acylation de l'acide aminé sérine (hydroxyle) ou cystéine (thiolate) du site actif. Par exemple, une variété d'esters,^{42,44,45} de fonctionnalité α -halométhyl-cétone,⁴⁶ *O*-acylhydrozamate,⁴⁷ nitrile,⁴⁸ époxyde,⁴⁹ et accepteur de Michael⁵⁰ ont été utilisés à cette fin. La nucléophilie accrue des résidus cystéines (thiolate) vs les sérines (hydroxyle) explique la sélectivité de la plupart des inhibiteurs pour les protéases à cystéine. Toutefois, la famille des protéases à sérine comprend de nombreux différents « clans », tels que le clan CA, qui inclut les papaïnes, cathepsines, calpaïnes, et le clan CD, qui comprend les caspases, légumaïnes, gingipaïnes, clostripaïnes et séparaïnes.⁵¹ La différenciation entre ces différents clans se fait alors par la modification systématique des chaînes latérales du résidu « aza » en P1,^{52,50a-b} des acides aminés en P2 ou P3^{48c} et/ou, le cas échéant, de la stéréochimie de l'époxyde.^{49b}

Exceptionnellement, *Z*-Arg-Leu-Val-azaGly-Ile-Val-OMe, qui a fait preuve de sélectivité pour la cathepsine B, a été suggéré d'adopter une conformation repliée par RMN et par simulation de dynamique moléculaire.⁴³ Dans ce cas, la sélectivité de l'azapeptide serait donc probablement dû à la stabilisation d'une conformation repliée induite par le résidu « aza », et non étendue.

1.3.3 Les azapeptides en tant que ligands de récepteurs

En plus d'être utilisés comme inhibiteurs d'enzyme, plusieurs azapeptides ont été synthétisés dans le but de créer des agonistes ou antagonistes de récepteurs.^{18b} La conception d'azapeptides en tant que ligands de récepteurs prend en compte le changement de conformation global que peut induire la substitution d'un ou plusieurs carbone α par un atome d'azote; idéalement, cette contrainte conformationnelle permettra de stabiliser la conformation active du peptide. De plus, la rigidité du mime peptidique pourrait déstabiliser la conformation nécessaire à la liaison à un second récepteur, conférant à l'azapeptide une meilleure sélectivité par rapport au peptide naturel. Par ailleurs, la chiralité adaptative de l'acide aminé « aza » et l'acidité accrue du NH du résidu semicarbazide pourrait jouer en faveur d'une liaison plus forte au récepteur. Enfin, la résistance aux

protéases conférée par le résidu « aza » constituerait également un avantage en ce qui concerne leur biodisponibilité.

Afin de tester ces hypothèses, des résidus « aza » ont été incorporés dans plusieurs peptides naturels, dont l'angiotensine II, l'oxytocine, l'éledoïsine, l'encéphaline, la somastostatine, la gastrine et l'hormone de libération de la lutéinostimuline (LHRH).^{18b} Dans le cas du LHRH, plusieurs analogues intéressants ont été obtenus, dont [D-Ser(*t*-Bu)⁶, azaGly¹⁰]-LHRH (Zoladex®, AstraZeneca) cité plus haut (Figure 1.4), et montrant une efficacité 100x plus élevée que la LHRH dans le traitement du cancer du sein et de la prostate.

Une des stratégies employées afin de déterminer la conformation active d'un peptide est d'effectuer un balayage d'acides aminés « aza ». En d'autres termes, la nature et la position du résidu « aza » sont systématiquement modifiés jusqu'à obtention d'un (ou de plusieurs) peptidomimétique(s) avec activité biologique intéressante. Par exemple, l'incorporation d'acides aminés « aza » dans la séquence de l'antagoniste du peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP) [D³¹, P³⁴, F³⁵]-CGRP₂₇₋₃₇, a révélé [D³¹, azaGly³³, P³⁴, F³⁵]-CGRP₂₇₋₃₇ comme antagoniste du récepteur du CGRP, illustrant l'importance d'un repliement de type II' pour l'activité biologique.¹⁷ D'autre part, le balayage d'acides aminés « aza » du térapeptide agoniste du récepteur de la mélanocortine (MCR) Ac-His-D-Phe-Arg-Trp-NH₂ a démontré que seuls les analogues avec un résidu « aza » en C-terminale (azaNal-1, azaNal-2 et azaBip) ont maintenu leur activité biologique (Figure 1.12, **21**).⁵³ Par conséquent, la substitution des résidus D-Phe² et Arg³ par des acides aminés « aza » pourraient induire une conformation inactive.

Tel que précédemment mentionné, lorsque plusieurs récepteurs sont en jeu, la synthèse d'analogues azapeptides pourrait conférer une sélectivité pour un seul récepteur. Le développement d'analogues azapeptides de la séquence Arg-Gly-Asp (RGD), un motif de reconnaissance pour les récepteurs de type intégrine, a fourni des composés possédant un résidu aza-glycine, aza-alanine ou aza-sarcosine à la position Gly².⁵⁴ Les analogues avec des résidus azaSar **22** et **23** (Figure 1.12) ont démontré une sélectivité pour l'intégrine α IIb β 3 par rapport à l'intégrine α v β 3 d'un facteur de ≥ 37 et ≥ 4.5 , respectivement. La

sélectivité des analogues possédant un résidu azaGly, quant à elle, s'est avérée variable et les composés avec un acide aminé azaAla étaient inactifs. Ainsi, tout comme ce qui a été observé chez les inhibiteurs d'enzyme, la nature du résidu « aza » peut influencer non seulement l'activité, mais aussi la sélectivité des azapeptides.

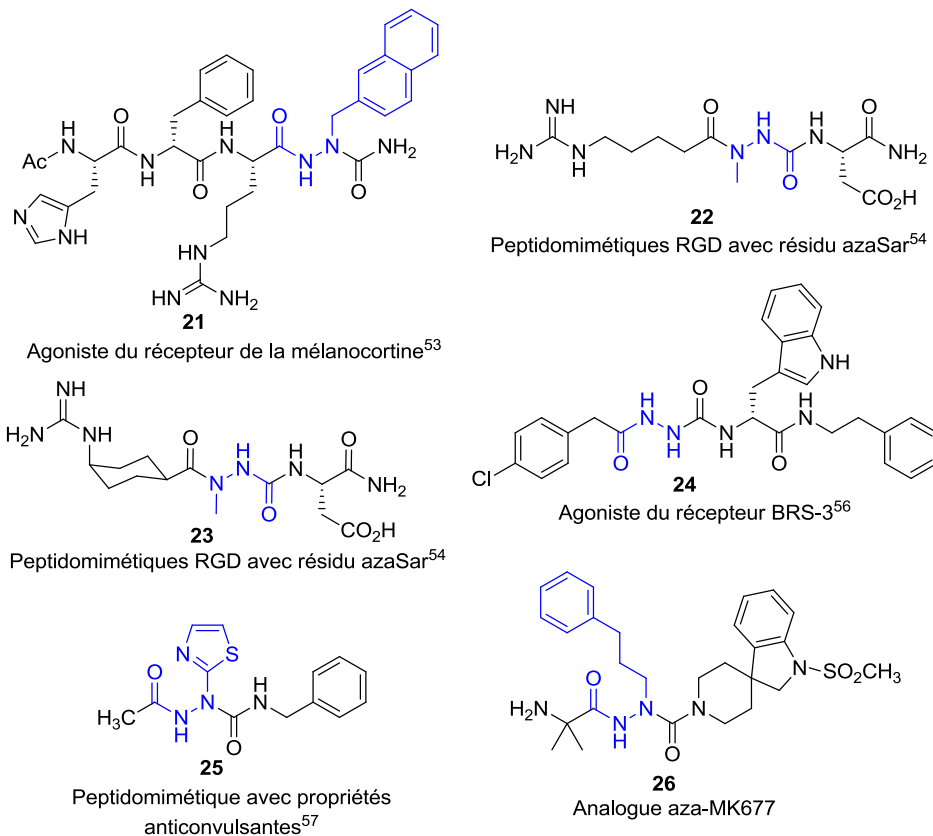


Figure 1.12. Exemples de ligands azapeptides agonistes ou antagoniste de récepteurs.

Dans un cas particulier, l'utilisation d'azapeptides comme mimes peptidiques a permis de moduler une réponse biologique. Plus spécifiquement, la substitution de certains acides aminés dans la séquence du peptide antigène de l'albumine de l'œuf de poule 325-339 (ovalbumine ou OVA₃₂₅₋₃₃₉) par des résidus azaGly, azaAla et azaGlu a généré des peptidomimétiques provoquant des réponses immunitaires variées.⁵⁵ Bien que tous les azapeptides se lient au complexe d'histocompatibilité majeur II (MHC II), certains sont des agonistes partiels ou des agonistes entiers du récepteur de l'antigène des lymphocytes T, alors que d'autres ne se lient pas à ce dernier. Par exemple, [azaGlu³³³]-OVA₃₂₅₋₃₃₉ et

[azaGly³²⁷]-OVA₃₂₅₋₃₃₉ sont des agonistes partiels. L'incorporation de résidus « aza » dans la séquence peptidique antigène OVA₃₂₅₋₃₃₉ permet donc de moduler l'activation des cellules T, potentiellement dû à un changement de conformation global induit par l'acide aminé « aza ».

En cherchant à améliorer l'activité agoniste de D-Phe-Gln-D-Trp-NH(CH₂)₂Ph, un ligand développé pour lier le récepteur orphelin de la bombésine de type 3 (BRS-3), des modifications en position *N*-terminale du peptide ont été effectuées.⁵⁶ Entre autre, la portion D-Phe-Gln a été remplacée par des fragments aryle acétyl-aza-glycine, semicarbazide (*N*-alkyl aza-glycine) et semicarbazone. Dans le cas des analogues ayant un résidu azaGly, les EC₅₀ obtenus sont de l'ordre du nanomolaire et la sélectivité pour le récepteur BRS-3, par rapport au récepteur neuroméline B (NMB) et au récepteur du peptide libérant la gastrine (GRP), s'est avérée excellente. À titre de comparaison, l'analogue *p*-ClC₆H₄CH₂CO-azaGly-D-Trp-NH(CH₂)₂Ph (Figure 1.12, **24**) a démontré un EC₅₀ de 0.19 nM, alors que la valeur EC₅₀ du peptide *p*-ClC₆H₄CH₂CO-Gln-D-Trp-NH(CH₂)₂Ph est de 1400 nM.

Dans certains cas, des dérivés azapeptides ont été synthétisés dans le but d'étudier l'effet de la perte de configuration fixe au niveau de l'atome d'azote N α sur l'activité biologique. Ainsi, l'activité anticonvulsante de dérivés de type *N*-acétyl aza-amino *N'*-benzylamide (Figure 1.12, **25**) a été examinée afin de comparer leur activité biologique à celle de leurs analogues carbonés de configuration D.⁵⁷ Dans ce cas, les dérivés « aza » se sont révélés moins puissants du fait d'une géométrie plane au niveau de l'atome d'azote N α (sp²), révélée par l'analyse par rayons X de l'analogue **25**, défavorisant la liaison à leur cible.

Finalement, la synthèse du dérivé « aza » du sécrétagogue de l'hormone de croissance (GHS) MK-677 a donné un composé avec une puissance 10 fois moins élevée que MK-667 (Figure 1.12, **26**). Dans le cadre de mon projet de recherche, nous nous sommes également intéressés à la synthèse d'analogues azapeptides de sécrétagogues de l'hormone de croissance. Plus particulièrement, nous avons préparé des analogues du

peptide sécréteur d'hormone de croissance 6 (GHRP-6, His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂). Cet hexapeptide possède une affinité pour deux récepteurs distincts: le récepteur des sécrétagogues de l'hormone de croissance de type 1a (GHS-R1a) et le récepteur CD36. Nous avons donc tenté de conférer une sélectivité pour un seul récepteur (CD36) par le biais d'analogues « aza » du peptide GHRP-6. La synthèse de ces dérivés, leur activité biologique et des études de structure-activité (SAR) seront discutées au chapitre 2.

1.4 Méthodes de synthèse d'azapeptides

La synthèse d'azapeptides fait appel à une combinaison de la chimie peptidique et de la chimie des hydrazines (Figure 1.13). Le processus consiste d'abord en l'élongation d'une chaîne peptidique sur support solide, suivi par l'incorporation du résidu aza sous forme de sous-unité *N'*-alkyle carbazate, puis enfin de l'élongation du peptide jusqu'à complétion de la séquence désirée.

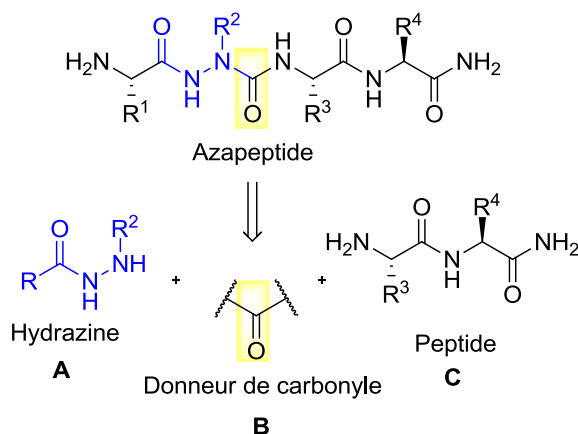


Figure 1.13. Schéma rétrosynthétique pour la synthèse d'azapeptides.^{18a}

À première vue, les défis synthétiques pour la synthèse d'azapeptides incluent (1) la synthèse en solution d'une sous-unité *N'*-alkyle carbazate appropriée, où la chaîne *N'*-alkyle constituera la chaîne latérale de l'acide aminé « aza », et (2) l'acylation de la semicarbazide, laquelle possède une nucléophilie dramatiquement réduite en comparaison avec les amines primaires des acides aminés naturels.

L'acide aminé « aza » est généralement introduit sur support solide de deux façons : (1) soit par l'activation de l'extrémité *N*-terminale de la chaîne peptidique, en intermédiaire isocyanate ou carbamate, suivi de l'ajout d'une sous-unité *N'*-alkyle carbazate (Figure 1.14, approche d) ou encore (2) par l'activation de cette sous-unité *N'*-alkyle carbazate ou de synthons aza-di- et tripeptides en solution, suivi de l'ajout de l'intermédiaire réactif au peptide ancré sur support solide (Figure 1.14, approches a et b). L'approche synthétique pour la synthèse d'azapeptides illustrée au bas (approche c) correspond à la voie de synthèse développée au cours de mon doctorat, en collaboration avec Dr David Sabatino, et sera discutée plus en profondeur au chapitre 3.

1.4.1 Activation de l'extrémité *N*-terminale d'un peptide

L'activation de l'extrémité *N*-terminale d'un peptide ancré sur support solide, typiquement accomplie par l'utilisation de *bis*-(2,4-dinitrophényle) carbonate^{58,59} ou carbonyldiimidazole (CDI),^{60,47} donne lieu à la formation d'un sous-produit hydantoïne (Figure 1.14, **39**). Ce sous-produit provient de l'attaque de l'intermédiaire activé par l'azote du lien amide précédent et termine la séquence peptidique. La formation de l'hydantoïne peut être évitée par la protection temporaire de cet amide avec un groupement *N*-2-hydroxy-4-méthoxybenzyle (Hmb), ce qui nécessite deux étapes additionnelles (Schéma 1.1).⁵⁹

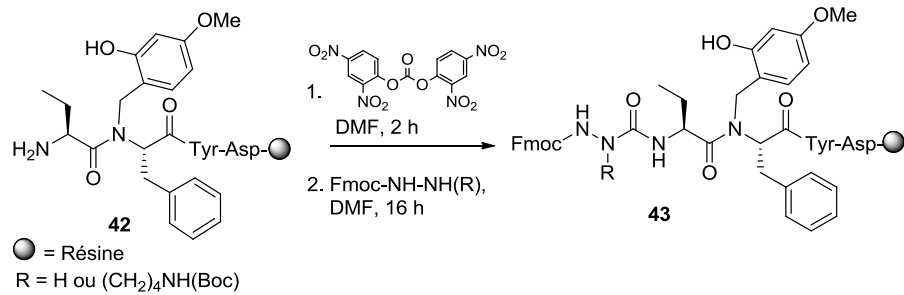


Schéma 1.1 Utilisation d'un groupement protecteur temporaire (Hmb) pour la synthèse d'azapeptide.⁵⁹

1.4.2 Activation de l'hydrazide

Une des stratégies communément utilisées pour éviter la formation d'hydantoïne est la préformation d'aza-di ou tripeptides en solution, suivie de leur activation et incorporation sur support solide. Par exemple, une approche a été développée où des esters aminés sont activés *in situ* pour fournir des intermédiaires réactionnels isocyanates (**45**), auxquels sont

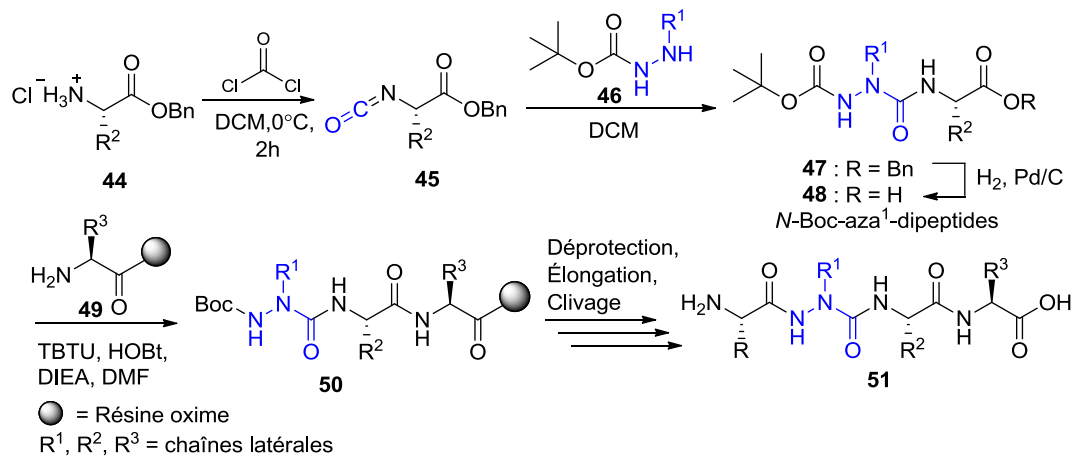


Schéma 1.2. Synthèse d'azapeptides via l'utilisation de *N*-Boc-aza¹-dipeptides esters.^{18b}

ajoutés des sous-unités *N*-Boc-*N'*-alkyle carbazates (**46**) (Schéma 1.2). Les synthons *N*-Boc-aza¹-dipeptide esters ainsi obtenus peuvent être déprotégés en *C*-terminale, puis incorporés dans de plus longues séquences peptidiques sur support solide.⁶¹ Suivant le même ordre d'idées, la synthèse en solution d'aza-tripeptides a permis d'éviter la formation d'hydantoïne.^{62,58} Par exemple, le tripeptide *Z*-Trp-azaAsn-Pro-OH a été synthétisé et incorporé sur résine pour terminer la séquence Trp-azaAsn-Pro-Ala-Asp-Tyr-Gly-Gly-Ile-

Lys.⁶² L'aza-tripeptide a été synthétisé par l'activation du carbazate $Z-N^{\beta}H-N^{\alpha}H-CH_2COEt$ avec du triphosgène et l'élongation de la semicarbazide obtenue après déprotection du Cbz a été effectuée en utilisant l'approche de l'anhydride mixte (chloroformate d'isobutyle, IBC).

Malgré le fait que ces méthodes permettent d'éviter la formation d'hydantoïne, elles requièrent plusieurs étapes de synthèse en solution, réduisant considérablement leur potentiel pour effectuer des études SAR rapides d'azapeptides. À cette fin, des méthodologies faisant plutôt appel à l'activation de sous-unités *N*-Fmoc-*N'*-alkyle carbazates⁶³ ou *N*-Ddz-*N'*-alkyle carbazates⁶⁴ ont été développées. En résumé, ces approches impliquent (a) la synthèse du *N*-Fmoc ou *N*-Ddz-*N'*-alkyle carbazate substitué en solution, (b) l'activation *in situ* de cette sous-unité à l'aide de phosgène et son incorporation à un peptide ancré sur support solide, (c) la déprotection du groupement protecteur en *N*-terminale et (d) l'élongation de la semicarbazide (Schéma 1.3). Comme précédemment mentionné, cette étape de couplage est difficile dû à la nucléophilie réduite de la semicarbazide. Elle nécessite généralement soit la conversion de l'acide aminé en chlorure d'acyle à l'aide de triphosgène,^{17,53,63} soit sa conversion en anhydride mixte ou symétrique générés à partir d'IBC⁶⁵ ou de DIC.⁵⁸

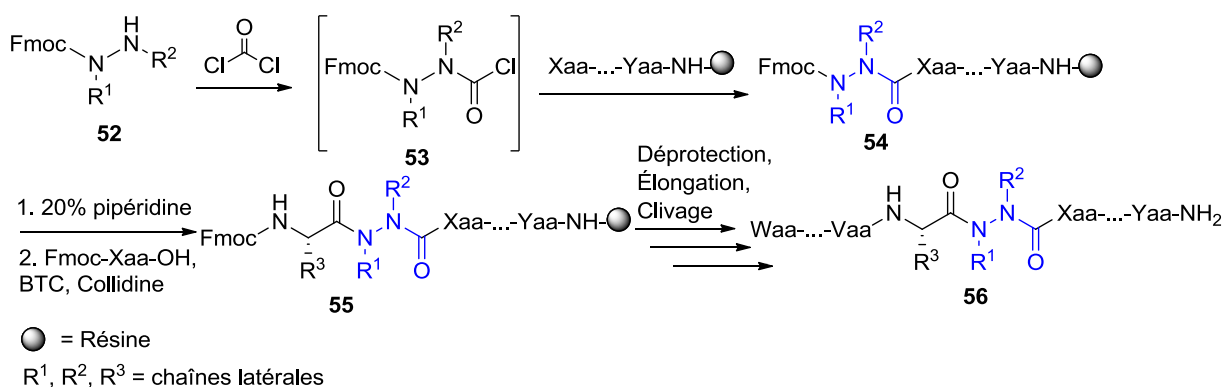


Schéma 1.3. Protocole général pour la synthèse d'azapeptides sur support solide.^{18a}

Ces approches limitent le nombre d'étapes synthétiques à effectuer en solution, puisque seule l'hydrazine substituée doit être préformée. Cette dernière est généralement obtenue par la condensation de Fmoc-, Boc- ou Ddz-carbazate avec un aldéhyde ou une cétone appropriée, suivi par la réduction de l'hydrazone par hydrogénation catalytique ou par addition d'hydrures (Schéma 1.4).

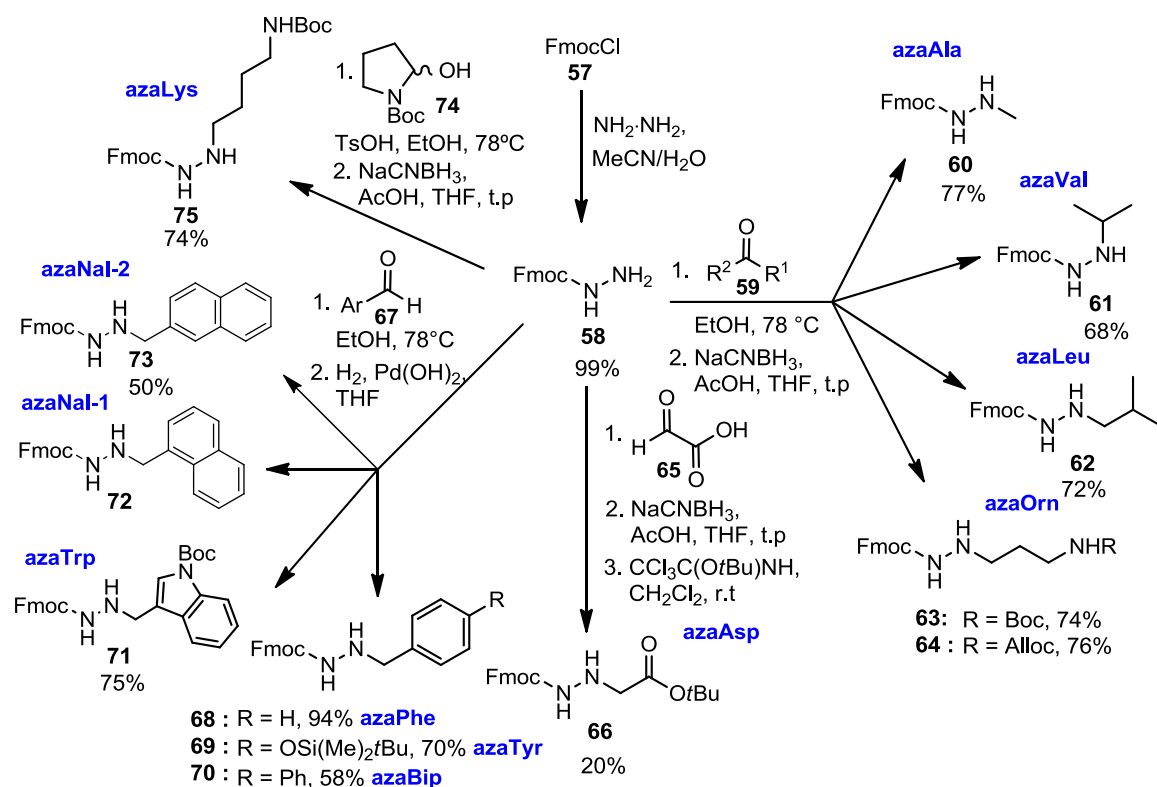


Schéma 1.4. Synthèse de carbazates *N*-alkyle fluorèn-9-ylméthyle.

Une large gamme d'acides aminés « aza » est disponible via cette approche, avec des chaînes latérales tant naturelles que non-naturelles. Toutefois, certaines chaînes latérales demeurent difficilement accessibles, telles qu'une chaîne latérale propargyl ou allyl, alors que d'autres fournissent des acides aminés « aza » instables, telles que la sérine, la thréonine et la cystéine. De plus, malgré le fait que cette approche minimise les étapes

synthétiques à effectuer en solution en comparaison avec les autres méthodes disponibles, lorsqu'un balayage d'acides aminés « aza » est envisagé pour identifier une région où il y a présence d'un repliement β , elle demande une quantité importante de manipulations en solution.

1.5 **Conclusion et résumé de la thèse**

La substitution du carbone α d'un ou de plusieurs acides aminés par un atome d'azote dans un peptide génère un analogue azapeptide et augmente sa stabilité et sa résistance aux protéases. Ces propriétés ont fait des azapeptides d'excellents candidats pour le développement d'inhibiteurs de protéases à sérines et à cystéines hautement sélectifs. De plus, la répulsion entre les paires adjacentes d'électrons libres des deux atomes d'azote adjacents induit généralement un repliement β , permettant ainsi l'étude des propriétés structurelles et conformationnelles nécessaires à la liaison d'un ligand peptidique à sa cible.

Le premier objectif de cette thèse a été de développer des analogues azapeptides du peptide sécréteur d'hormone de croissance 6 (GHRP-6, His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) sélectifs au récepteur CD36, axés vers le traitement de maladies liées à l'angiogénèse. À cette fin, une librairie de plus de 30 analogues aza-GHRP-6 a été synthétisée afin d'élucider les propriétés structurelles et conformationnelles nécessaires à la liaison au récepteur CD36. En collaboration avec le Dr Huy Ong (Faculté de Pharmacie, Université de Montréal), le Dr Sylvain Chemtob (Département de Pharmacologie, Université de Montréal) et le Dr Jean-François Masson (Département de Chimie, Université de Montréal), les analogues aza-GHRP-6 synthétisés ont été testés pour affinité au récepteur CD36 et pour activité anti-angiogénique (Chapitre 2).

Le deuxième objectif de cette thèse a été de mettre sur pied une méthodologie pour la synthèse combinatoire d'azapeptides, afin d'augmenter l'accessibilité des azapeptides en tant que mimes peptidiques, ainsi que de permettre l'incorporation d'une plus grande variété de chaînes latérales. En réponse à cet objectif, le développement d'une méthode

basée sur l'alkylation et la déprotection régiosélective d'une sous-unité semicarbazone ancrée sur support solide sera décrite (Chapitre 3). Par la suite, la réactivité unique de cette

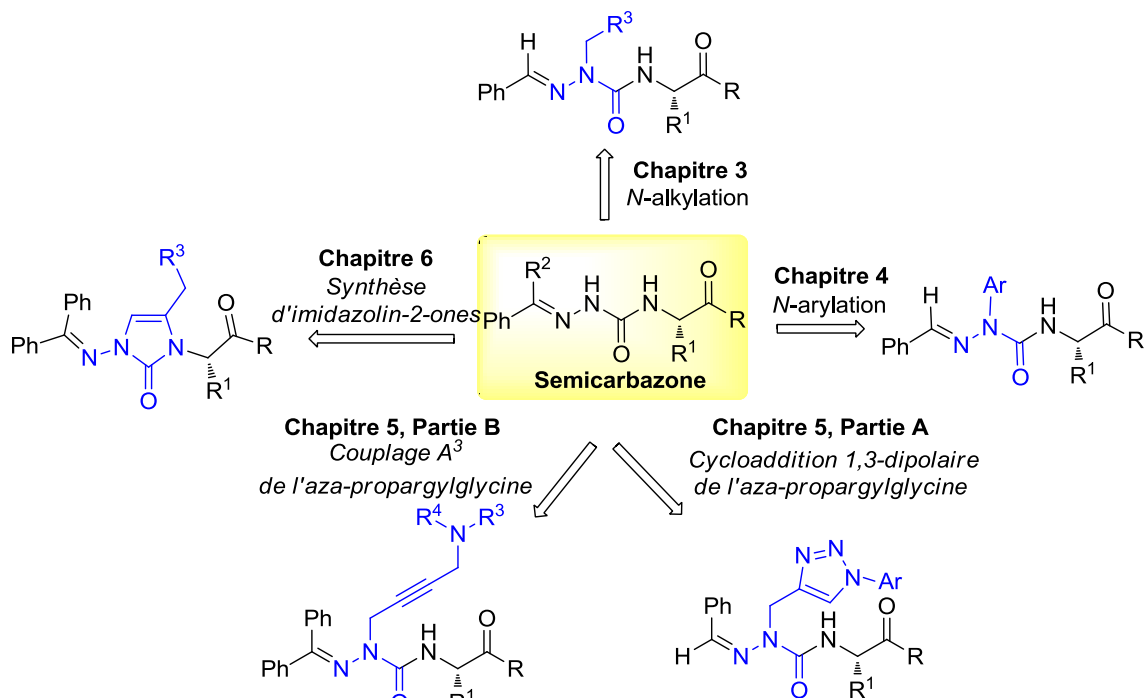


Figure 1.15. Résumé schématique des chapitres 3-6 de la thèse.

sous-unité semicarbazone a été exploitée pour synthétiser des azapeptides possédant des résidus aza-arylglycines (Chapitre 4). Enfin, des résidus aza-propargylglycines, obtenus par l'alkylation régiosélective de la semicarbazone avec du bromure de propargyle, ont constitué des points versatiles de diversification via trois approches : (a) une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire (Chapitre 5, Partie A), (b) une réaction de couplage A³ (aldéhyde, alcyne, amine) (Chapitre 5, Partie B) et (c) un couplage de Sonagashira, suivi d'une cyclisation *5-exo-dig* pour mener à la formation de *N*-amino-imidazolin-2-ones (Chapitre 6).

Ces nouvelles approches ont été utilisées pour synthétiser des bibliothèques de dérivés aza-GHRP-6, qui seront également testés pour affinité au récepteur CD36 par nos collaborateurs.

Chapitre 2: Synthèse d'analogues aza-GHRP-6 en tant que ligands du récepteur CD36 avec affinités réduites pour le récepteur GHS-R1a

Mise en contexte de l'article 1:

2.1 Développement du peptide sécréteur d'hormone de croissance 6

2.1.1 Historique

Le peptide sécréteur d'hormone de croissance 6 (GHRP-6) est un hexapeptide synthétique avec la structure primaire His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (Figure 2.1), qui a été conçu en 1984.⁶⁶ La structure de GHRP-6 est en fait dérivée de la Met-encéphaline (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, **76**), un ligand des récepteurs opioïdes. En procédant à des études de structure-activité (SAR), il a d'abord été découvert que la substitution simultanée (1) du résidu Gly² par un acide aminé D-Trp² et (2) de la fonctionnalité acide en C-terminale par une amide, pour donner le dérivé [D-Trp²]-Met-encéphaline amide (**77**), fournissait un analogue dépourvu d'activité opioïde mais accompagné d'une faible capacité de libérer l'hormone de croissance (GH).⁶⁷ Après une optimisation exhaustive, le pentapeptide Tyr-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-NH₂ (**78**) a été développé, qui avait la capacité de libérer l'hormone de croissance avec une puissance mille fois plus élevée que [D-Trp²]-Met-encéphaline amide (**77**).⁶⁸

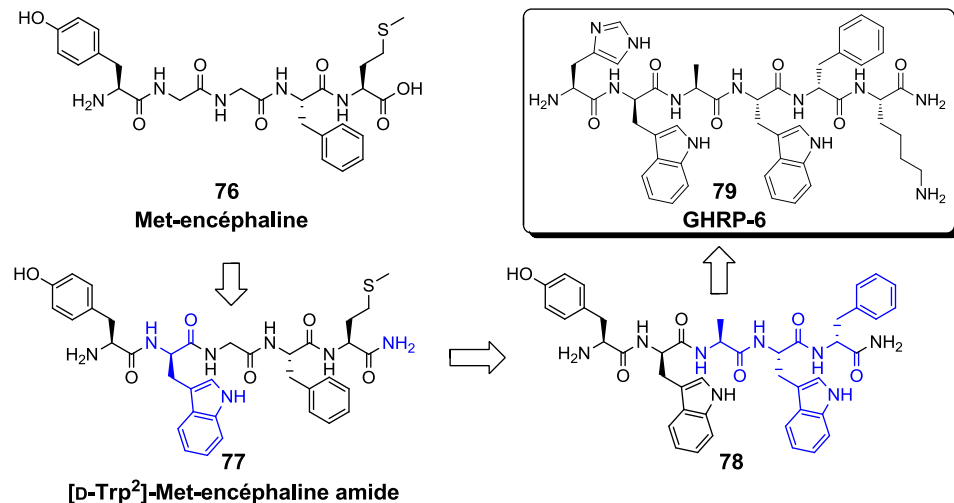


Figure 2.1. Développement du GHRP-6 à partir de la Met-encéphaline.

Au cours de ces études SAR, l'importance des acides aminés à chaînes latérales aromatiques hydrophobes pour l'activité de libération de l'hormone de croissance, ainsi que de l'alternance de la stéréochimie L^1-D^2 et L^4-D^5 pour permettre un bon empilement aromatique, a été établi.⁶⁸ Afin de maximiser l'empilement π , l'acide aminé Ala³ a été introduit comme groupement espaceur. Basé sur des calculs d'énergie conformationnelle et sur les résultats des études de structure-activité, il a été proposé qu'une conformation repliée était nécessaire pour l'activité de libération de l'hormone de croissance. Il a ensuite été démontré que la substitution du résidu Tyr¹ par l'acide aminé His¹ et l'ajout d'un résidu Lys⁶ en C-terminale dans le pentapeptide **78**, pour finalement donner GHRP-6 (**79**), était favorable à la fois pour l'activité *in vitro* et *in vivo*.⁶⁶ Plus précisément, l'activité de l'hexapeptide His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (**79**, GHRP-6) est 30 fois supérieure à celle de Tyr-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-NH₂ (**78**). Encore une fois, la conformation du peptide GHRP-6 de plus basse énergie prédite est repliée, avec un empilement apparent des chaînes latérales de Trp⁴ et D-Phe⁵ (Figure 2.2).⁶⁶ Ces deux résidus semblent essentiels à l'activité de libération de l'hormone de croissance; la substitution de Trp⁴ pour un résidu β -naphtyle et de D-Phe⁵ pour les acides aminés D-His, D-Trp ou D-Tyr a réduit l'activité du peptide de façon significative.⁶⁶

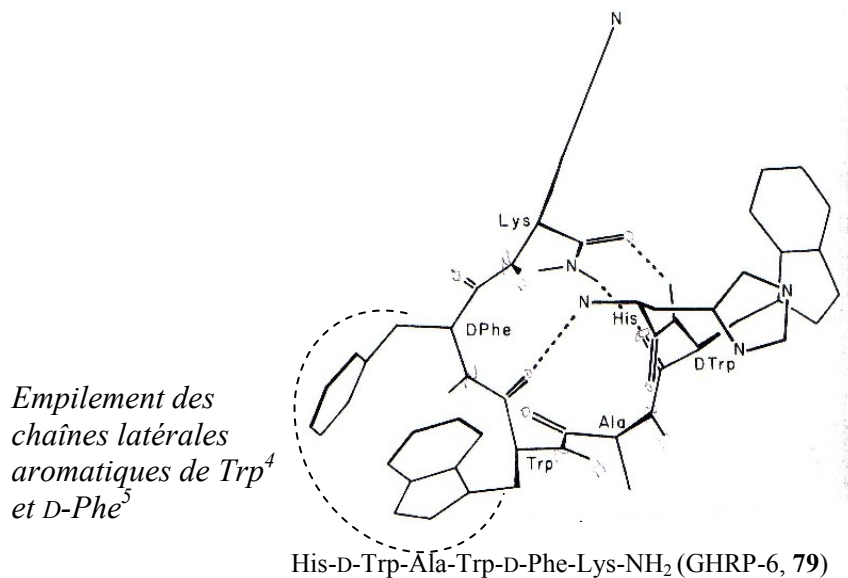


Figure 2.2. Conformation la plus stable du GHRP-6 basé sur des calculs d'énergie.⁶⁶

Quant à elle, la lysine ne semble pas être essentielle à l'activité de GHRP-6, puisque l'analogue [Arg⁶]-GHRP-6 est presque aussi actif. En revanche, la position Ala³ est particulièrement sensible aux changements: [Gly³]-GHRP-6 et [Val³]-GHRP-6 ne sont pas actifs *in vivo*.

2.1.2 Découverte du récepteur GHS-R1a et de son ligand naturel, la ghréline

La découverte d'un nouveau peptide sécrétagogue de l'hormone de croissance, dérivé de la Met-Encéphaline, a soulevé des questions sur la nature du récepteur impliqué et de son ligand naturel. En 1996, le gène du récepteur est cloné et dénommé le récepteur des sécrétagogues de l'hormone de croissance de type 1a (GHS-R1a).⁶⁹ Il s'agit d'un nouveau récepteur couplé aux protéines G (GPCR) exprimé principalement au niveau de l'hypothalamus et distinct du récepteur de l'hormone de libération de l'hormone de croissance (GHRH). Il demeure un récepteur orphelin jusqu'à la découverte de son ligand naturel en 1999, la ghréline (Figure 2.3).⁷⁰

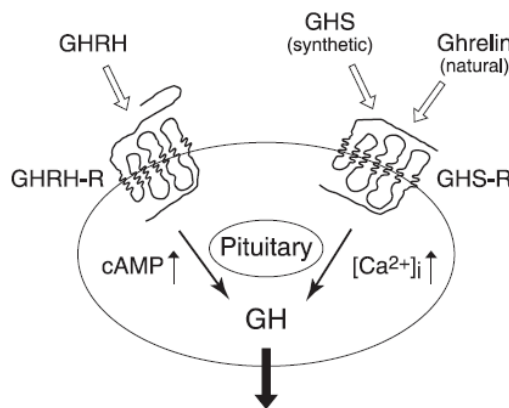


Figure 2.3. Les récepteurs du GHRH et GHS-R1a et la libération synergique d'hormone de croissance.^{70b}

2.1.2.1 GHRP-6 et le récepteur GHS-R1a

En tant qu'agoniste du récepteur GHS-R1a, le peptide GHRP-6 offre plusieurs avantages thérapeutiques. Entre autre, il a été observé que la co-administration de GHRP-6 et de GHRH a un effet synergique sur la libération de l'hormone de croissance (Figure

2.3).⁷¹ De ce fait, le peptide GHRP-6 peut être utilisé comme test diagnostique pour vérifier s'il y a une déficience d'hormone de croissance chez un individu.⁷² L'administration de GHRP-6 pourrait également être bénéfique aux traitements de conditions caractérisées par des déséquilibres hormonaux de l'hormone de croissance, tels que l'obésité,⁷³ l'insuffisance staturale,⁷⁴ ou encore en réponse à un état de catabolisme général. De plus, les sécrétagogues d'hormones de croissance pourraient être utiles à la restauration de l'activité de l'axe somatotrophe GH/Facteur de croissance apparenté à l'insuline-I (IGF-I) lors du vieillissement, afin de contrer les détériorations de masse musculaire et osseuse.⁷⁵

2.2 Découverte de l'affinité du GHRP-6 pour un second récepteur: le récepteur CD36

En plus des effets bénéfiques associés à la libération d'hormone de croissance, l'administration de GHS a démontré des propriétés cardio-protectrices.⁷⁶ Cette observation a semé un doute sur la nature du récepteur en jeu et a éventuellement mené à la découverte d'un second récepteur capable de lier GHRP-6 par notre collaborateur Dr Huy Ong, le récepteur CD36 (Figure 2.4).⁷⁷ Ce dernier est un récepteur « scavenger » de classe B avec un large domaine extracellulaire. Il est un récepteur à fonctions multiples retrouvé à la surface de diverses cellules (ex : macrophages, adipocytes, cellules musculaires cardiaques et squelettiques, endothéliales, dendrites), agissant entre autres en tant que récepteur de la thrombospondine 1 (TSP-1)⁷⁸ et des lipoprotéines de basse densité oxydées (LDLox).⁷⁹ Après avoir identifié le récepteur CD36 comme second récepteur capable de lier GHRP-6, le laboratoire du Dr Huy Ong a ensuite déterminé le site exact de liaison du ligand GHRP-6, où un chevauchement avec le site de liaison des LDLox a été observé (Figure 2.4).⁸⁰

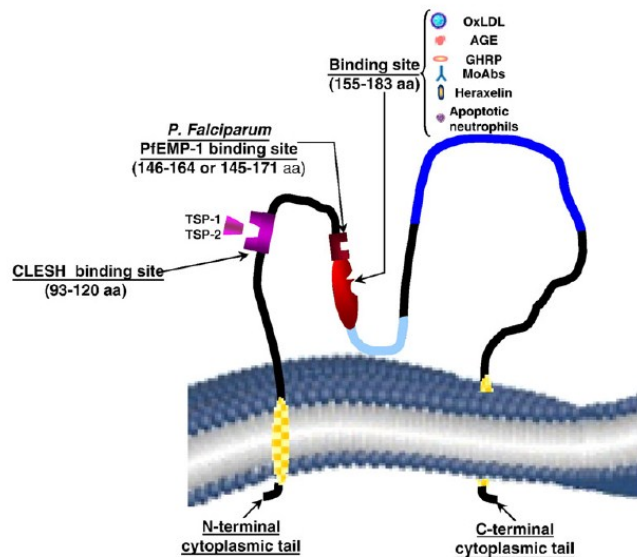


Figure 2.4. Récepteur CD36.⁸¹

2.2.1 GHRP-6 et le récepteur CD36 comme cible thérapeutique

La liaison des LDLox au récepteur CD36 à la surface des macrophages et leur internalisation joue un rôle important lors de la formation de « cellules de mousses », causant un éventuel durcissement des artères caractéristique de l'athérosclérose.⁸¹ Étant donné que le site de liaison du GHRP-6 chevauche celui des LDLox, l'administration de GHRP-6 pourrait inhiber la liaison et l'endocytose des LDLox par les macrophages et ainsi diminuer la formation de plaques dans les parois artérielles. En effet, lors de l'administration à long terme de GHRP-6 à des souris déficientes en apolipo-protéine E (apoE) nourries avec un régime élevé en gras et en cholestérol, Ong *et al.* ont observé une baisse significative dans la formation de lésions athérosclérotiques.⁸²

De plus, le récepteur CD36 possède des propriétés anti-angiogéniques lorsque la protéine TSP-1 y est liée.⁷⁸ L'endocytose de LDLox chez une souris dans un état hyperlipidémique a également démontré la capacité de moduler l'angiogenèse en provoquant un contrôle en boucle ouverte (feedforward loop) menant à l'amplification de l'expression du récepteur CD36.⁸³ De nombreuses conditions de maladie pourraient

bénéficier de l'administration d'un agent thérapeutique avec propriétés anti-angiogéniques, telles que la présence de tumeurs, la rétinopathie diabétique et la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

Les laboratoires de nos collaborateurs Dr Huy Ong et Dr Sylvain Chemtob sont particulièrement intéressés aux traitements potentiels de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, qui est la cause majeure de cécité chez la population de 65 ans et plus dans les pays développés.⁸⁴ La dégénérescence maculaire est caractérisée par une perte de la vision centrale, causée par la détérioration de la macula.⁸⁵ Cette détérioration peut être causée par l'accumulation de débris cellulaires (drusen), dans le cas de la dégénérescence maculaire « sèche » liée à l'âge (atrophique), ou par la croissance anormale de nouveaux vaisseaux sanguins dans la choroïde dans le cas de la dégénérescence maculaire « humide » liée à l'âge (néovasculaire). Le récepteur CD36 est une cible idéale pour le traitement potentiel de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, de par la possibilité de prévenir l'accumulation de drusen et provoquer une réponse anti-angiogénique.

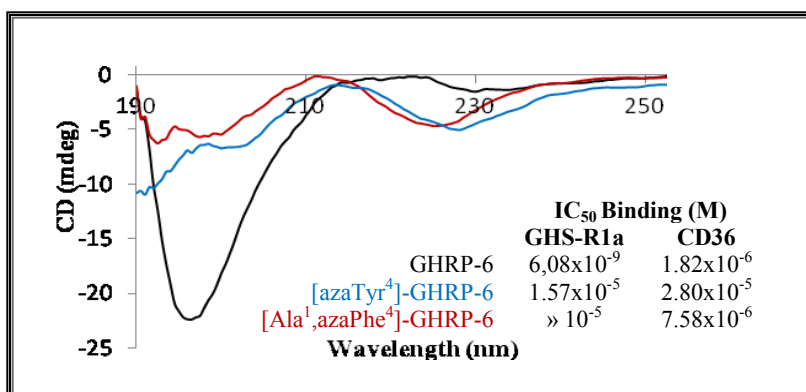
2.3 Problématique adressée dans l'article 1

Suite à la découverte que GHRP-6 possède une affinité pour les récepteurs GHS-R1a et CD36, nous avons tenté de s'adresser au problème de sélectivité de l'hexapeptide GHRP-6 par la synthèse de dérivés aza-GHRP-6. Considérant la conformation repliée postulée nécessaire à la liaison de GHRP-6 au récepteur GHS-R1a, nous avons cherché à identifier par balayage d'acide aminés « aza » (a) une conformation favorisant plutôt la liaison au récepteur CD36 qu'au récepteur GHS-R1a et (b) les propriétés structurales essentielles à la liaison à ce récepteur dans cette conformation.

Article 1:

Proulx, C.; Picard, E.; Boeglin, D.; Pohankova, P.; Chemtob, S.; Ong, H.; Lubell, W. D. Azapeptide Analogs of the Growth Hormone Releasing Peptide 6 as Cluster of Differentiation 36 Receptor Ligands with Reduced Affinity for the Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6502-6511.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jm300557t>



**Aza-peptide Analogs of the Growth Hormone Releasing Peptide 6 as Cluster of
Differentiation 36 Receptor Ligands with Reduced Affinity for the Growth Hormone
Secretagogue Receptor 1a**

*Caroline Proulx,^a Émilie Picard,^b Damien Boeglin,^a Petra Pohankova,^c Sylvain Chemtob,^b
Huy Ong,^{*c} and William D. Lubell^{*a}*

^aDépartement de Chimie, ^bDépartement de Pédiatrie and ^cFaculté de Pharmacie, Université
de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7.

Abstract

The synthetic hexapeptide Growth Hormone Releasing Peptide-6 (GHRP-6) exhibits dual affinity for the Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a (GHS-R1a) and the Cluster of Differentiation 36 (CD36) receptor. Aza-peptide GHRP-6 analogs have been synthesized exhibiting micromolar affinity to the CD36 receptor with reduced affinity towards the GHS-R1a. A combinatorial split-and-mix approach furnished aza-GHRP-6 leads, which were further examined by alanine scanning. Incorporation of an aza-amino acid residue respectively at the D-Trp², Ala³ or Trp⁴ position gave aza-GHRP-6 analogs with reduced affinity towards the GHS-R1a receptor by at least a factor of 100, and in certain cases retained affinity for the CD36 receptor. In the latter cases, the D-Trp² residue proved important for CD36 receptor affinity; however, His¹ could be replaced by Ala¹ without considerable loss of binding. In a microvascular sprouting assay using a choroid explant, [azaTyr⁴]-GHRP-6 (**15**), [Ala¹, azaPhe²]-GHRP-6 (**16**) and [azaLeu³, Ala⁶]-GHRP-6 (**33**), all exhibited anti-angiogenic activity.

Keywords

Aza-peptide, peptide mimicry, β -turn, GHRP-6, hexarelin, CD36, GHS-R1a, angiogenesis

Introduction

Growth Hormone Releasing Peptide-6 (GHRP-6, His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂)¹ is a synthetic hexapeptide exhibiting affinity for the ghrelin receptor (GHS-R1a) and

for the type B scavenger receptor CD36. Initially, GHRP-6 was found to exhibit high affinity to the former G-protein coupled receptor, which is expressed predominantly in the hypothalamic-pituitary axis, causing secretion of growth hormone (GH) by an independent pathway from that regulated by way of the growth hormone releasing hormone (GHRH) receptor.² The 2-methyl-tryptophan analog of GHRP-6, hexarelin (His-D-2-Me-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂)³ was subsequently shown to be more potent than GHRP-6, exhibiting reproducible, dose-dependent growth-hormone-releasing activity after administration. Growth hormone secretagogues (GHS), such as GHRP-6 and hexarelin, have since attracted interest for diagnosing and countering physiological imbalances associated with impaired GH secretion,⁴ such as obesity,⁵ acromegaly, short stature and aging.⁶

GHRP-6 and hexarelin were later shown to exhibit pleiotropic effects. In the cardiovascular system, hexarelin exhibited anti-atherosclerotic activity, which resulted likely from inhibition of the binding of oxidized low density lipoproteins (oxLDL) by the type B scavenger receptor CD36,^{7,8} which plays a critical role in foam cell formation and atherogenesis by mediating recognition and internalization of oxLDL.⁹ For example, CD36-apoE double-null mice exhibited a significant decrease in aortic atheromatous plaques in animals fed on a western diet.¹⁰ The CD36 binding sites of hexarelin and (1-palmitoyl 2-(5'-oxovaleroyl) phosphatidylcholine (POVPC), the active fragment of oxidized low-density lipoprotein, have been shown to overlap.¹¹ OxLDL has been shown to induce an anti-angiogenic effect in hyperlipidemic states, such as atherosclerosis and diabetes.¹² Moreover, this anti-angiogenic effect was found to be activated upon the binding of the extracellular matrix protein thrombospondin-1(TSP-1) to CD36 as endothelial cell receptor.^{13,14} The CD36 receptor has thus emerged as an interesting target with potential therapeutic implications in the treatment of atherosclerotic conditions as well as those exhibiting marked angiogenesis (tumors, diabetic retinopathy, age-related macular degeneration), because its effects may be modulated both at the thrombospondin-1 binding site,¹³ as well as at the distinct oxLDL binding site.

Considering that GHRP-6 analogs exhibit dual affinity for both the GHS-R1a and CD36 receptors, selective analogs are desired in order to chemically probe their specific functions. Moreover, the discovery of compounds with selectivity for the CD36 receptor, as opposed to the GHS-R1a, may afford novel therapeutic advantages. With the goal to dial-in specificity, azapeptide analogs of GHRP-6 were pursued to probe the biologically active conformations responsible for affinity at the GHS-R1a and CD36 receptors.

Azapeptides possess one or more aza-amino acid residues in which the alpha-CH is replaced by a nitrogen atom.¹⁵ In this semicarbazide analog of a natural peptide, the planar urea and lone pair repulsion between adjacent hydrazine nitrogen impose conformational restrictions, which favour a β -turn conformation about the position of the aza-residue, as predicted by computation and validated by spectroscopic and crystallographic studies.¹⁶ Moreover, azapeptide analogs may exhibit greater metabolic stability and longer duration of action, because semicarbazides are more difficult to hydrolyze than the corresponding amides.¹⁷ Aza-amino acids have previously been introduced into peptide sequences to yield compounds with useful biological activity. Specifically, improved biological activity has been observed in aza-analogs of peptide hormones,¹⁸ such as Luteinizing-hormone-releasing hormone (LHRH),¹⁹ and enzyme inhibitors.^{20,21,22} For example, the antagonist activity of [D³¹P³⁴F³⁵]-CGRP₂₇₋₃₇ at the calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor was found to be contingent on a type II' β -turn conformer centered at Gly³³-Pro³⁴ by using an aza-amino acid scan of the undecapeptide.²³ Introduction of aza-residues has also improved selectivity of cysteine and serine protease inhibitors.²⁴ Azapeptides have thus proven effective for development of analogs exhibiting increased biological activity and improved selectivity.

Previously, we reported an azapeptide GHRP-6 analog, [azaPhe⁴]-GHRP-6, with improved receptor selectivity for the CD36 versus the GHS-R1a receptor.²⁵ This aza-GHRP-6 analog was later proposed to adopt a turn conformation based on NMR studies, suggesting that the improved selectivity may be due to pre-organization of an active conformation for binding to the CD36 receptor.²⁶ An aza-amino acid scan of the D-Trp²-

Ala³-Trp⁴ portion of the GHRP-6 peptide has now been performed to explore in more detail the importance of a biologically active turn conformation. Employing solid- synthesis using an Fmoc protection strategy, azapeptide analogs of GHRP-6 were generated in which the nature of each aza-amino acid was varied. Moreover, the structural requirements for selective CD36 binding of promising candidates was explored by alanine scans and *N*-terminal modifications using a combinatorial split-and-mix approach for making azapeptides. The IC₅₀ binding values for both the GHS-R1a and CD36 receptors have been ascertained and azapeptides have been identified exhibiting significantly reduced affinity to the former with maintained potency for the latter receptor. Finally, the anti-angiogenic properties of a set of azapeptides were assessed in an *ex vivo* assay in microvascular choroid explants.²⁷

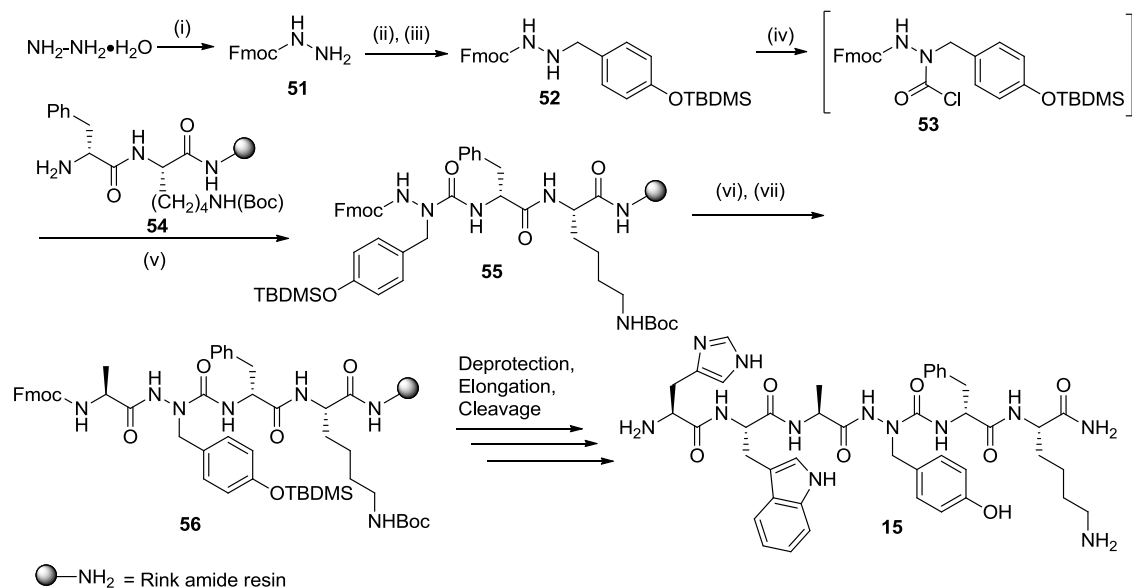
Results and Discussion

Chemistry.

Sequential replacement of the amino acid residues of the biologically active peptide with the corresponding aza-amino acids, a so-called “aza-amino acid scan”,²⁸ was used to probe for active turn conformations of GHRP-6. The aza-amino acid scan of GHRP-6 was accomplished by an Fmoc protection strategy on Rink amide resin.¹⁸ Azapeptides **1-49** were synthesized employing *N*'-substituted fluorenylmethyl carbazates, that were activated with phosgene prior to coupling to the peptide linked to the solid- as illustrated in the synthesis of [azaTyr⁴]-GHRP-6 (**15**, Scheme 1). *N*'-Substituted fluorenylmethyl carbazates were prepared in solution in a two-step procedure from 9-*H*-fluoren-9-ylmethyl carbazate (**51**), which was heated at reflux with 1 equivalent of the respective aldehyde to prepare the acyl hydrazones. Reduction of hydrazones was accomplished using either hydrogenation in the presence of palladium hydroxide, or sodium cyanoborohydride reduction in the presence of acetic acid.¹⁸ For the synthesis of the aza-proline analogs, fluoren-9-yl-methyl pyrazolidine-1-carboxylate hydrochloride was synthesized by acylation of *tert*-butyl pyrazolidine-1-carboxylate with Fmoc succinimide, followed by Boc group deprotection using a 1:1

TFA:DCM mixture.^{29,30} After Fmoc cleavage, the aza-residue was acylated using Fmoc-amino acid chloride, generated by the bis-(trichloromethyl) carbonate (BTC) activated coupling procedure.¹⁸ Notably, epimerization of the trityl-protected histidine residue was found to occur in some cases as observed by the presence of two overlapping peaks with identical mass by LCMS analysis. The epimerization likely occurred during coupling to the aza-residue using BTC. Such azapeptides were examined as inseparable diastereoisomeric mixtures. Peptide chain elongation, cleavage and purification were conducted according to general solid-peptide synthesis protocols.³¹ Loss of the side-chain of the aza-tryptophan residue was found to occur during the acidic cleavage of the azapeptide derivatives such that the azaGly analog was recovered.¹⁸ Instead of azaTrp analogs, a series of aza-amino acid chlorides were made on exposing phosgene to different *N*²-substituted fluorenylmethyl carbazates: benzyl,¹⁸ 4-(*t*-butyldimethylsilyloxy)benzyl,¹⁸ 2-phenylethyl, 1-naphthylmethyl,³² and biphenyl-4-ylmethyl.³²

Scheme 1. Representative synthesis of **15**.



(i) FmocOSu (0.1 eq.), CH₃CN/H₂O (1:1) (ii) *p*-OTBDMS-benzaldehyde (1eq.), EtOH, reflux. (iii). Pd(OH)₂, H₂ (iv) Phosgene (20% in toluene, 2 eq.), DCM, 0°C, 15 min (v)

DIEA (6 eq.) (vi) 20% piperidine in DMF (vii) Fmoc-Ala-OH, BTC (1 eq.), collidine (12 eq.).

A library of azapeptides was prepared in parallel for the alanine scan. Azapeptides **15-49** were constructed on resin in IRORI kansTM.³³ MacrokansTM were respectively filled with 75-100 mesh Rink Resin and a radiofrequency (Rf) tag associated to a unique ID number. In a split-and-mix approach, kansTM were pooled together and exposed to identical conditions in a normal glass vessel. Upon completion of the reaction, MacrokansTM were washed, separated, sorted, and pooled accordingly for next reactions. Cleavage of the final peptide from the resin was performed by treating each individual Macrokan with TFA: H₂O: TES (95: 2.5: 2.5 v/v/v) for 2 h in a 20 mL glass vial. The MacrokansTM were washed with TFA, and the filtrate and washings were concentrated to an approximate volume of 1 mL before dilution with Et₂O for precipitation of the azapeptides. The ether layer was decanted after centrifugation and the resulting peptide was dissolved in MeCN:H₂O (1:1) and freeze dried to yield a white foam in average yields of 44% for peptides **1-15** and 5.1% for peptides **15-49** after RP-HPLC purification. The retention times, HPLC purity and exact mass for each azapeptide are reported in Table 1.

Table 1. Retention times, purity and mass of GHRP-6 analogs.

compound	RT	RT	HPLC purity at 214 nm ^d (%)	MS [M+1] or [M+23] ions	
	(min) in MeCN ^a	(min) in MeOH		m/z calcd	m/z obsd
1 (D/L)His-AzaPhe-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	14.08	22.64	>99	835.4	835.5
2 (D/L)His-AzaTyr-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	13.41	20.21	>99	851.4	851.3
3 (D/L)His-AzaNal-1-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	15.41	25.23	>99	885.4	885.5
4 (D/L)His-AzahomoPhe-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	14.80	23.37	>99	849.4	849.5
5 (D/L)His-AzaBip-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	16.88	26.80	>99	911.5	911.5

6 His-D-Trp-AzaGly-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	14.48	21.84	>99	860.4	860.3
7 His-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	16.24	25.33	>99	916.5	916.5
8 His-D-Trp-Ala-AzaPhe-D-Phe-Lys-NH ₂	14.96	23.87	>99	835.4	835.5
9 His-D-Trp-Ala-AzaLeu-D-Phe-Lys-NH ₂	14.27	22.83	>99	801.4	801.5
10 His-D-Trp-Ala-AzaBip-D-Phe-Lys-NH ₂	17.81	27.68	>99	911.5	911.5
11 His-D-Trp-Ala-AzahomoPhe-D-Phe-Lys-NH ₂	15.44	24.69	>99	849.4	849.5
12 His-D-Trp-Ala-AzaNal-1-D-Phe-Lys-NH ₂	16.53	26.08	>99	885.4	885.5
13 His-D-Trp-Ala-Tyr-D-Phe-Lys-NH ₂	12.59	20.64	>99	850.4	850.5
14 His-D-Trp-Ala-D-Tyr-D-Phe-Lys-NH ₂	13.17	20.99	>99	850.4	850.5
15 His-D-Trp-Ala-AzaTyr-D-Phe-Lys-NH ₂	13.57	20.59	>99	851.4	851.3
16 Ala-AzaPhe-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	15.67	7.80 ^c	93	769.4	769.4
17 (D/L)His-AzaPhe-Ala-Ala-D-Phe-Lys-NH ₂	9.99	11.93	>99 ^e	720.4	720.4
18 His-AzaPhe-Ala-Trp-D-Ala-Lys-NH ₂	9.08	9.11	>99	759.4	759.4
19 His-AzaPhe-Ala-Trp-D-Phe-Ala-NH ₂	15.54	11.05	97	778.4	778.4
20 Ala-AzaTyr-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	13.19	19.02	>99	785.4	785.4
21 (D/L)His-AzaTyr-Ala-Ala-D-Phe-Lys-NH ₂	8.13	8.18	>99 ^e	736.4	736.4
22 His-AzaTyr-Ala-Trp-D-Ala-Lys-NH ₂	8.79	10.79	97	775.4	775.4
23 His-AzaTyr-Ala-Trp-D-Phe-Ala-NH ₂	14.89	21.34	98	794.4	794.4
24 Ala-D-Trp-AzaGly-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	15.61	17.95 ^b	99	794.4	794.4
25 His-D-Ala-AzaGly-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	9.64	9.80	>99	745.4	745.4
26 His-D-Trp-AzaGly-Ala-D-Phe-Lys-NH ₂	8.88	8.95	>99	745.4	745.4
27 His-D-Trp-AzaGly-Trp-D-Ala-Lys-NH ₂	9.95	12.54	>99	784.4	784.4
28 His-D-Trp-AzaGly-Trp-D-Phe-Ala-NH ₂	11.01 ^b	18.56 ^b	99	803.4	803.4
29 Ala-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	17.08	12.08 ^c	>99	850.5	850.5
30 His-D-Ala-AzaLeu-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	11.16	10.60 ^b	>99	801.4	801.4
31 His-D-Trp-AzaLeu-Ala-D-Phe-Lys-NH ₂	14.55	12.10	>99	801.5	801.5
32 His-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Ala-Lys-NH ₂	11.65	11.73	>99	840.5	840.5
33 His-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-Ala-NH ₂	17.54	13.64 ^c	>99	859.4	859.4
34 Ala-D-Trp-Ala-AzaPhe-D-Phe-Lys-NH ₂	15.86	10.62 ^c	>99	791.4	791.4
35 His-D-Ala-Ala-AzaPhe-D-Phe-Lys-NH ₂	8.43	9.97	>99	720.4	720.4
36 His-D-Trp-Ala-AzaPhe-D-Ala-Lys-NH ₂	10.00	10.10	>99	759.4	759.4
37 His-D-Trp-Ala-AzaPhe-D-Phe-Ala-NH ₂	16.55	11.96	>99	778.4	778.4
38 His-D-Trp-AzaGly-Pro-D-Phe-Lys-NH ₂	8.90	11.04	>99	771.4	771.4
39 His-AzaPro-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	9.79	9.82	>99 ^e	785.4	785.4
40 His-D-Trp-AzaPro-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	12.85	17.67	>99	900.5	900.5
41 His-D-Trp-Ala-AzaPro-D-Phe-Lys-NH ₂	10.94	10.95	>99	785.4	785.4
42 His-D-Trp-Ala-Trp-AzaPro-Lys-NH ₂	9.96	12.61	>99	824.4	824.4
43 Ppa-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	22.63 ^c	17.88 ^c	>99	857.4	857.4
44 D-Ala-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	17.69	11.86 ^c	>99	872.5	872.5
45 Gly-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	17.65	11.72 ^c	>99	858.4	858.4
46 Pro-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	18.37	12.58 ^c	>99	898.5	898.5

47 His-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-NH ₂	18.14	13.98 ^c	>99	788.4	788.4
48 His-D-Trp-AzaLeu-Trp-NH ₂	14.62	10.75 ^c	>99	641.3	641.3
49 D-Trp-AzaLeu-Trp-NH ₂	18.65	14.06 ^c	>99	504.3	504.3

^aUnless otherwise noted, analytical HPLC analyses were performed on a TARGA column from Higgins Analytical, Inc. (4.6 x 250 mm, 5 μm, C18) with a flow rate of 1.5 mL/min using a 40 min linear gradient from water (0.1% TFA) to CH₃CN (0.1% TFA) (method 1) or to MeOH (0.1% TFA) (method 2) for compound **1-15**, and on a GEMINI column from phenomenex (4.6 mm x 150 mm, 5 μM, C18) with a flow rate of 0.5 ml/min using a 2-40% gradient of water (0.1% FA) in CH₃CN (0.1% FA) or in MeOH (0.1% FA) for compounds **15-49**. ^bAnalytical HPLC analyses were performed using the same GEMINI column as in (a), with a 10-50% gradient of water (0.1% FA) in CH₃CN (0.1% FA) or in MeOH (0.1% FA). ^cAnalytical HPLC analyses were performed using the same GEMINI column as in (a), with a 20-80% gradient of water (0.1% FA) in CH₃CN (0.1% FA) or in MeOH (0.1% FA). ^dHPLC purity at 214 nm of the purified peptide. ^eA mixture of isomers was observed as two overlapping peaks with identical masses. ^fObserved masses corresponding to the H⁺ and Na⁺ adducts.

Biological results. Azapeptides **1-49** were examined for binding to the GHS-R1a and CD36 receptors using previously reported protocols. In short, the affinity for the ghrelin receptor was assessed in a competition binding study using [I¹²⁵] radiolabeled ghrelin, membranes from GHS-R1a transfected cells and aza-GHRP-6 analogs as the competitive ligands in increasing concentrations ranging from 10⁻¹² to 10⁻⁵ M.³⁴ CD36 receptor binding was assessed by a covalent competition binding study using [I¹²⁵] radiolabeled photoactivatable hexarelin derivative as a radioligand and rat cardiac membranes as a source of CD36 receptor, as previously reported.³⁵ Azapeptide GHRP-6 analogs were used as competitive ligands in concentrations ranging from 0.1 to 50 μM. According to the test results, certain azapeptides were found to retain affinity for the CD36 receptor; however, their binding was considerably reduced at the GHS-R1a receptor (Table 2).

Table 2. IC₅₀ Binding Values for GHS-R1a and CD36 Receptors of GHRP-6 Analogs.

compound No.	compound	IC ₅₀ Binding	
		GHS-R1a (M)	CD36 (M)
GHRP-6	His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	6.08x10 ⁻⁹	1.82x10 ⁻⁶
Hexarelin	His-D-Trp(2-Me)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	1.59x10 ⁻⁸	2.08x10 ⁻⁶

57 (EP80317)	Haic-D-Trp(2-Me)-D-Lys-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	7.50 x10 ⁻⁷	1,11x10 ⁻⁶
1	(D/L)His-AzaPhe-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	1.61x10 ⁻⁵	7.24x10 ⁻⁵
2	(D/L)His-AzaTyr-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	8.53x10 ⁻⁶	1.80x10 ⁻⁶
3	(D/L)His-AzaNal-1-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	4.65x10 ⁻⁷	» 10 ⁻⁵
4	(D/L)His-AzahomoPhe-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	7.29x10 ⁻⁷	3.68x10 ⁻⁵
5	(D/L)His-AzaBip-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	1.64x10 ⁻⁶	2.32x10 ⁻⁵
6	His-D-Trp-AzaGly-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	8.08x10 ⁻⁷	9.61x10 ⁻⁶
7	His-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	1.20x10 ⁻⁶	2.89x10 ⁻⁶
8	His-D-Trp-Ala-AzaPhe-D-Phe-Lys-NH ₂	2.77x10 ⁻⁶	1.34x10 ⁻⁶
9	His-D-Trp-Ala-AzaLeu-D-Phe-Lys-NH ₂	1.95x10 ⁻⁵	2.89x10 ⁻³
10	His-D-Trp-Ala-AzaBip-D-Phe-Lys-NH ₂	1.34x10 ⁻⁶	1.35x10 ⁻⁵
11	His-D-Trp-Ala-AzahomoPhe-D-Phe-Lys-NH ₂	3.74x10 ⁻⁶	» 10 ⁻⁵
12	His-D-Trp-Ala-AzaNal-1-D-Phe-Lys-NH ₂	7.23x10 ⁻⁷	3.62x10 ⁻⁵
13	His-D-Trp-Ala-Tyr-D-Phe-Lys-NH ₂	7.71x10 ⁻⁷	1.32x10 ⁻⁵
14	His-D-Trp-Ala-D-Tyr-D-Phe-Lys-NH ₂	3.25x10 ⁻⁶	1.20x10 ⁻⁵
15	His-D-Trp-Ala-AzaTyr-D-Phe-Lys-NH ₂	1.57x10 ⁻⁵	2.80x10 ⁻⁵
16	Ala-AzaPhe-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	4.27x10 ⁻⁵
17	(D/L)His-AzaPhe-Ala-Ala-D-Phe-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵
18	His-AzaPhe-Ala-Trp-D-Ala-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵
19	His-AzaPhe-Ala-Trp-D-Phe-Ala-NH ₂	5.10x10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵
20	Ala-AzaTyr-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	3.69x10 ⁻⁵
21	(D/L)His-AzaTyr-Ala-Ala-D-Phe-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵
22	His-AzaTyr-Ala-Trp-D-Ala-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵
23	His-AzaTyr-Ala-Trp-D-Phe-Ala-NH ₂	» 10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵
24	Ala-D-Trp-AzaGly-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	5.68x10 ⁻⁷	6.06x10 ⁻⁶
25	His-D-Ala-AzaGly-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵
26	His-D-Trp-AzaGly-Ala-D-Phe-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵
27	His-D-Trp-AzaGly-Trp-D-Ala-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵
28	His-D-Trp-AzaGly-Trp-D-Phe-Ala-NH ₂	4.50x10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵
29	Ala-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	1.12x10 ⁻⁵	6.66x10 ⁻⁶
30	His-D-Ala-AzaLeu-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵
31	His-D-Trp-AzaLeu-Ala-D-Phe-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	2.59x10 ⁻⁵
32	His-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Ala-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	9.48x10 ⁻⁶
33	His-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-Ala-NH ₂	8.17x10 ⁻⁶	7.59x10 ⁻⁶
34	Ala-D-Trp-Ala-AzaPhe-D-Phe-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	7.58x10 ⁻⁶
35	His-D-Ala-Ala-AzaPhe-D-Phe-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵
36	His-D-Phe-Ala-AzaPhe-D-Ala-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵
37	His-D-Phe-Ala-AzaPhe-D-Phe-Ala-NH ₂	» 10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵
38	His-D-Trp-AzaGly-Pro-D-Phe-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵
39	His-AzaPro-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵

40	His-D-Trp-AzaPro-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	9.81x10 ⁻⁶
41	His-D-Trp-Ala-AzaPro-D-Phe-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵
42	His-D-Trp-Ala-Trp-AzaPro-Lys-NH ₂	» 10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵
43	Ppa-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	3.86x10 ⁻⁶	» 10 ⁻⁵
44	D-Ala-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	3.61x10 ⁻⁶	1.33x10 ⁻⁵
45	Gly-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	5.41x10 ⁻⁶	1.05x10 ⁻⁵
46	Pro-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	1.17 x10 ⁻⁶	7.97x10 ⁻⁶
47	His-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-NH ₂	4.55x10 ⁻⁶	9.01x10 ⁻⁶
48	His-D-Trp-AzaLeu-Trp-NH ₂	8.56x10 ⁻⁵	» 10 ⁻⁵
49	D-Trp-AzaLeu-Trp-NH ₂	3.25x10 ⁻⁴	» 10 ⁻⁵
50	Aib-D-Trp(2-Me)-D-Trp(2-Me)-NH ₂	6.29x10 ⁻⁸	» 10 ⁻⁵ ^a

^a value was reported earlier in reference 7.

Azapeptides were made by placement of an aza-residue at either the D-Trp², Ala³ or Trp⁴ positions. A variety of aromatic side chains were examined at the 2- and 4-positions, due to the instability of aza-tryptophan under acidic conditions.¹⁸ Moreover, [Tyr⁴]- and [D-Tyr⁴]-GHRP-6 (**13** and **14**) were prepared for direct comparison with **15**. Many azapeptides exhibited significant losses of activity at both receptors. Azapeptides **2**, **6**, **7**, and **8**, having respectively azaTyr², azaGly³, azaLeu³, and azaPhe⁴ retained affinity to the CD36 receptor in the micromolar range, yet lost affinity to GHS-R1a by a factor of 10²-10⁴. Loss of affinity to the CD36 receptor by about a factor of 10 was observed on going from [azaTyr²]-GHRP-6 (**2**) to [azaPhe²]-GHRP-6 (**1**), and from [azaPhe⁴]-GHRP-6 (**8**) to [azaTyr⁴]-GHRP-6 (**15**), indicating that the tyrosine side chain was better tolerated at the D-Trp² position. Furthermore, a 10 fold loss of affinity towards the CD36 receptor was observed upon substitution of the Trp⁴ residue for Tyr (**13**) or D-Tyr (**14**). Replacement of D-Trp² and Trp⁴, respectively, with azaNaphthalene-1 (azaNal-1), azaHomoPhe, and azaBiphenyl (azaBip) decreased affinity to the CD36 receptor by a factor of 10-10³. From the preliminary results, azapeptides **1**, **2**, **6**, **7**, and **8** were selected as leads for alanine scans and further structure-activity relationship studies.

Replacement of the amino acid residues by an alanine residue was performed systematically on leads **1**, **2**, **6**, **7**, and **8** to provide azapeptides **16-37**, and their affinity was ascertained at both the GHS-R1a and CD36 receptors (Table 2). Notably, the His¹ residue could be replaced with alanine without significant loss of affinity. For example, relative to

the CD36 receptor binding of their respective His¹ azapeptide counterparts, [Ala¹, azaGly³]-GHRP-6 (**24**), [Ala¹, azaLeu³]-GHRP-6 (**29**) and [Ala¹, azaPhe⁴]-GHRP-6 (**34**), all retained affinity, and [Ala¹, azaPhe²]-GHRP-6 (**16**) and [Ala¹, azaTyr²]-GHRP-6 (**20**) exhibited only a tenfold loss in affinity. The replacement of D-Trp² by D-Ala caused a significant drop in affinity to both receptors in all cases (e.g., **27**, **30** and **35**), indicating the importance of the aromatic side chain at this position. Except for [azaLeu³, Ala⁴]-GHRP-6 (**31**), which exhibited a 10 fold loss of binding for the CD36 receptor relative to its Trp⁴ counterpart, azapeptides (e.g., **17**, **21**, and **26**) suffered >10 fold losses in affinity on replacement of Trp⁴ by an alanine. Similarly, [azaLeu³, D-Ala⁵]- and [azaLeu³, Ala⁶]-GHRP-6 (**32** and **33**) retained micromolar affinity for the CD36 receptor; however, replacement of D-Phe⁵ and Lys⁶ respectively by D-Ala and Ala caused >10 fold losses of affinity towards both the GHS-R1a and CD36 receptors in [Ala⁵]-azapeptides **18**, **22**, **27** and **36** and [Ala⁶]-azapeptide **19**, **23**, **28** and **37**.

The results of the alanine scan identified [Ala¹, azaLeu³]-GHRP-6 (**29**), [azaLeu³, D-Ala⁵]-GHRP-6 (**32**) and [Ala¹, azaPhe⁴]-GHRP-6 (**34**), which retained micromolar affinity for the CD36 receptor, yet lost by >10⁴ fold ability to bind GHS-R1a. Moreover, [Ala¹, azaGly³]-GHRP-6 (**24**) and [azaLeu³, Ala⁶]-GHRP-6 (**33**) maintained micromolar affinity for the CD36 receptor and lost by ≥100 fold affinity for the GHS-R1a. Notably, replacement of Ala³ by azaLeu³ in GHRP-6 provided several analogs with good affinity, including [Ala¹, azaLeu³]-GHRP-6 (**29**), [azaLeu³, D-Ala⁵]-GHRP-6 (**32**) and [azaLeu³, Ala⁶]-GHRP-6 (**33**). Based on these findings, along with the discovery that replacement of His¹ by Ala was well tolerated, a third generation of analogs were designed and synthesized. The His¹ residue of [azaLeu³]-GHRP-6 (**7**) was replaced with propionic acid (Ppa), D-Ala, Gly and Pro to afford aza-GHRP-6 analogs **43-46**, and truncation of **7** afforded penta-, tetra-, and tri-azapeptides **47-49**.

Replacement of His¹ by proline in (**46**) maintained micromolar affinity for the CD36 receptor. A 10 fold loss of affinity ensued on replacement of His¹ respectively by D-alanine (**44**) and glycine (**45**), and a >10 fold loss of affinity for the CD36 receptor resulted

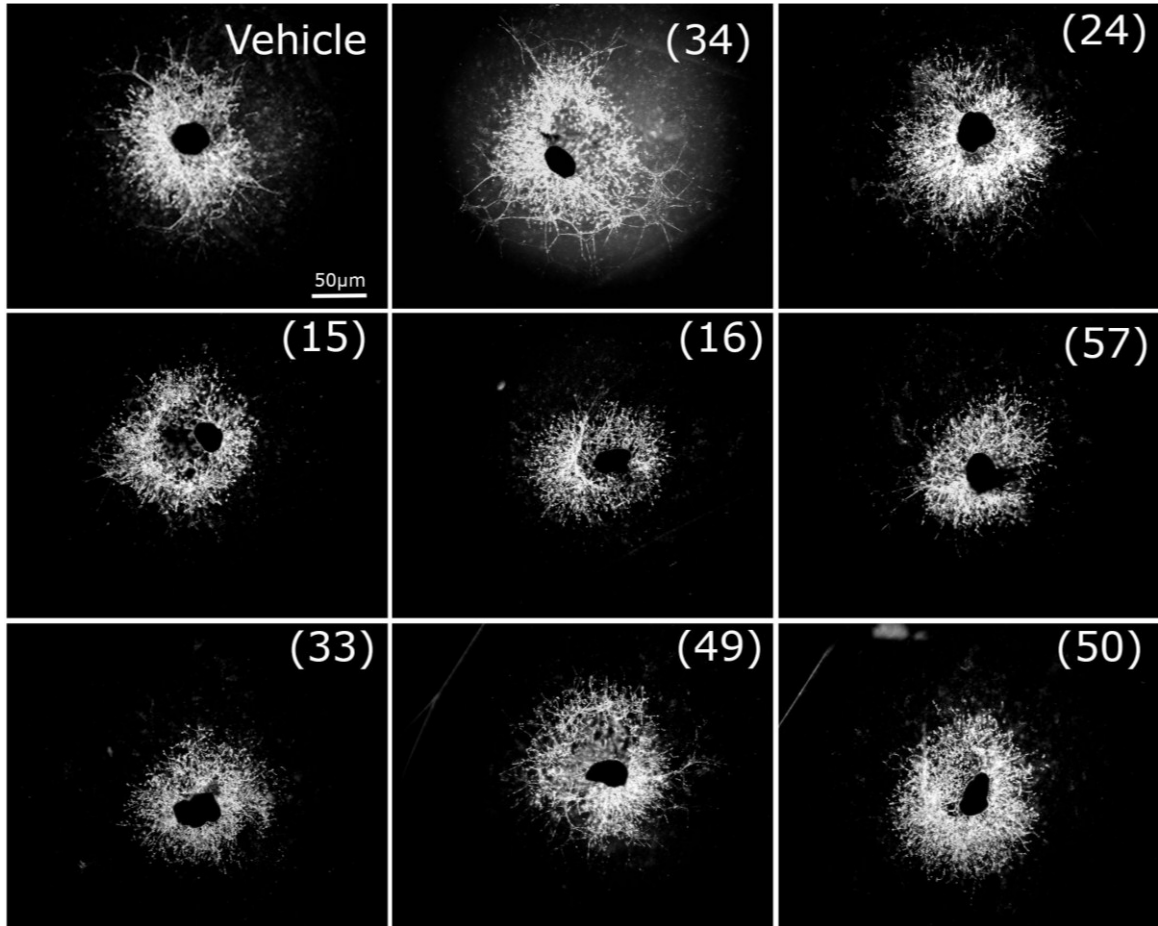
from substituting a propionyl moiety (**43**) for His¹. In all cases, a 10³ fold loss of affinity was observed with respect to the GHS-R1a. Results from the affinity studies of truncated azapeptides **47-49** towards both receptors revealed that only loss of Lys⁶ was tolerated and penta-azapeptide **47** maintained micromolar affinity for the CD36 receptor. This result and the maintained affinity of [azaLeu³, Ala⁶]-GHRP-6 (**33**) demonstrated that the Lys⁶ residue was unnecessary for [AzaLeu³]-GHRP-6 to bind to the CD36 receptor, in sharp contrast to the decreased affinity exhibited by [azaPhe², Ala⁶]-GHRP-6 (**19**), [azaTyr², Ala⁶]-GHRP-6 (**23**), [azaGly³, Ala⁶]-GHRP-6 (**28**) and [azaPhe⁴, Ala⁶]-GHRP-6 (**37**).

In parallel to the alanine scan of azapeptides **1, 2, 6, 7, and 8** azapeptides **39-42** containing an aza-proline residue were synthesized to further explore the conformational requirements for binding to GHS-R1a and CD36 receptors. Systematic substitution of azaPro for each residue in the D-Trp²-Ala³-Trp⁴-D-Phe⁵ portion of GHRP-6 gave [azaPro³]-GHRP-6 (**40**), which retained micromolar affinity for the CD36 receptor and lost affinity for the GHS-R1a receptor. The other azaPro analogs (**39, 41 and 42**) lost affinity to both receptors. Considering the conformational preference for azaPro to adopt the *i* + 2 position of a type VI β turn,³⁶ such a conformation may be responsible for [azaPro³]-GHRP-6 (**40**) retaining CD36 receptor affinity without binding to GHS-R1a.

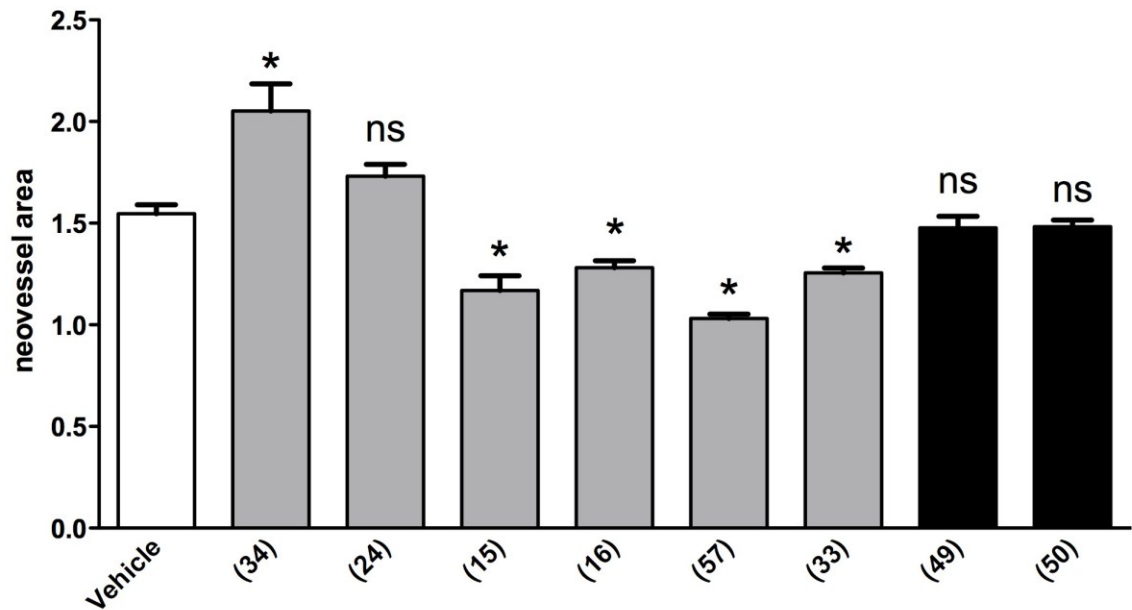
A subset of azapeptides containing [azaTyr⁴]-GHRP-6 (**15**), [Ala¹, azaPhe²]-GHRP-6 (**16**), [Ala¹, azaGly³]-GHRP-6 (**24**), [azaLeu³, Ala⁶]-GHRP-6 (**33**) and [Ala¹, azaPhe⁴]-GHRP-6 (**34**) was selected for investigation of potential anti-angiogenic properties. Relative to hexarelin, all five analogs displayed a ≥ 100 fold decrease in affinity for GHS-R1a, azapeptides **24, 33** and **34** retained micromolar affinity to the CD36 receptor, and azapeptides **15** and **16** exhibited a 10-fold drop in CD36 receptor affinity. In addition, azapeptides **16, 24, and 33** were found to feature relatively lower differential binding selectivity towards both ghrelin and CD36 receptors. Anti-angiogenic properties were examined by means of a microvascular sprouting assay using mouse choroidal explants (Figure 1). The tripeptides D-Trp-AzaLeu-Trp-NH₂ (**49**) and Aib-D-Trp(2-Me)-D-Trp(2-Me)-NH₂ (**50**), which had demonstrated a ≥ 10 fold loss of affinity towards both receptors,

were used as negative controls. On the other hand, Haic-D-Trp(2-Me)-D-Lys-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (**57**, Haic = 5-amino-1,2,4,5,6,7-tetrahydroazepino[3,2,1-hi]indol-4-one-2-carboxylate),³⁵ a peptide known to bind to the CD36 receptor (Table 2, entry 3), was used as a positive control.

Figure 1. Anti-angiogenic Effect of CD36 Mediators.



A) Representative microvascular sprouting from matrigel-embedded choroidal explants treated 4 days with azapeptides (10^{-5} M, Scale bar 50 μ m).



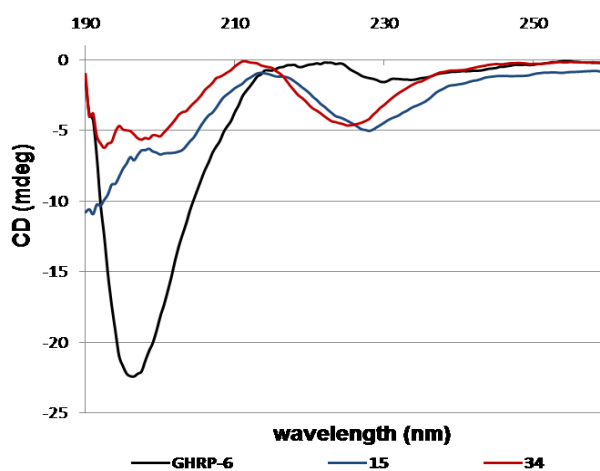
B) The corresponding histogram values of quantification of choroidal sprouting areas in A. Values are mean \pm SEM. *P < 0.05 compared to corresponding control values. Values are mean \pm SEM choroidal area sprouting (J4) compared to corresponding control values (J0) *P < 0.05. The units are arbitrary. The values correspond to the subtraction of total area minus area of explant.

Quantification of microvascular sprouting after a 4-day treatment (J4 vs J0) with azapeptides **15**, **16**, and **33** revealed respectively 17, 28, and 25% of choroid sprouting, respectively, compared to the control condition of 53% of neovascularization, thereby underlining their anti-angiogenic properties. **57** as positive control featured 3% of choroid sprouting. On the other hand, [Ala¹, azaGly³]-GHRP-6 (**24**) and D-Trp-AzaLeu-Trp-NH₂ (**49**), showing 72 and 47% of choroid sprouting respectively as compared to the control condition of 53% of neovascularization, did not feature any angiogenic activity. A reverse pharmacologic profile was displayed by [Ala¹, azaPhe⁴]-GHRP-6 (**34**), which increased neovascularization to 105% after the 4-day treatment, an effect which may be due to activation of Src recruitment and a VEGF-driven Akt phosphorylation pathway.³⁷

Aza-peptide analogs, which bind selectively the CD36 receptor without affinity for GHS-R1a, may thus induce different biological responses, contingent on the nature and position of the aza-amino acid residue.

The conformations of the azapeptides [azaTyr⁴]-GHRP-6 (**15**) and [Ala¹, azaPhe⁴]-GHRP-6 (**34**), which respectively caused a reduction or an increase in neovascularization relative to control, were examined by circular dichroism spectroscopy in water (Figure 2). The CD signature of GHRP-6 in water was characteristic of a random coil, exhibiting a minimum around 190 nm. On the other hand, the CD curves of azapeptides **15** and **34** were indicative of β -turn conformations, with distinctive minima at 230 and 190 nm and a maximum at 215 nm.³⁸ Previously, [azaPhe⁴]-GHRP-6 (**8**) was found to exhibit a similar CD curve shape indicative of a β -turn conformation, which was supported by NMR spectroscopic studies.²⁵ The similar conformations exhibited by [azaTyr⁴]-GHRP-6 (**15**) and [Ala¹, azaPhe⁴]-GHRP-6 (**34**) in water does not correlate with their divergent biological responses arising from the binding to the CD36 receptor. Further studies are in progress to elucidate the structural and conformational requirements, which are responsible for azapeptides exhibiting differential responses on angiogenesis upon binding to the CD36 receptor.

Figure 2. Circular dichroism spectra in water of azapeptides **15** and **34** compared with GHRP-6.



Conclusion

In contrast to natural GHRP-6, which exhibits affinity for the GHS-R1a and CD36 receptors, in nanomolar and micromolar range, respectively, certain azapeptide analogs of GHRP-6 have been developed that maintain binding to the CD36 receptor, while losing affinity for the GHS-R1a receptor. Additionally, certain analogs were found to reduce microvascular sprouting, displaying anti-angiogenic properties. Aza-amino acid residues are known to induce turn conformations in peptides and such conformational constraints may likely prevent binding towards one receptor. In particular, aza-residues at positions 2-4 (D-Trp-Ala-Trp) of GHRP-6 may induce a β -turn geometry responsible for affinity to the CD36 receptor. In this geometry, His¹ appears to be less important for binding, than D-Trp² and Lys⁶. Setting a foundation for ongoing research, this study is positioned to further the elucidation of the structural features for selectivity and affinity for the CD36 receptor and modulation of its function.

Experimental Section

Azapeptides **1-49** were prepared on solid support using an acid labile Rink resin and a Fmoc/*t*Bu protocol previously reported, in which the syntheses of **2**, **8**, and **15** were described.¹⁸ Incorporation of aza-amino acid into peptide was performed using either 1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-one for the aza-Gly residue³⁹ or suitable *N*'-alkyl fluoren-9-ylmethyl carbazates which provided the corresponding *N*-(Fmoc)aza-amino acid chlorides for coupling onto the growing chain of the resin-bound peptide.¹⁸ Acylation of the aza-amino residue was performed using BTC as an activating agent.¹⁸ Coupling to normal amino acid residues with *N*-(Fmoc)amino acids (300 mol%) was performed according to general solid-peptide synthesis protocols using HBTU (300 mol%), DIEA (600 mol%), and DMF for 3 h.³¹ *N*-(Fmoc)Amino acids were purchased from GL Biochem. The side-chains of lysine and tryptophan were protected with Boc groups, the histine imidazole was protected with a trityl group, and the phenol of tyrosine was protected as a tert-butyldimethylsilyl ether.

Rink resin (0.65 mmol/g) was purchased from Advanced Chemtech Inc. and the manufacturer's reported loading of the resin was used in the calculation of the yields of the

final products. Phosgene (20% in toluene) was purchased from Fluka. Melting points were uncorrected. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded respectively at 400 MHz and 100 MHz in CDCl_3 or DMSO as the solvent and internal reference. Thin-layer chromatography was performed on silica gel 60 F₂₅₄ plates from Merck. Flash chromatography was performed on silica gel 60 (230-400 Mesh ASTM) from Merck.

Aza-peptides 1-15

Analytical HPLC analyses were performed on a TARGA column from Higgins Analytical, Inc. (4.6 x 250 mm, 5 μm , C₁₈) with a flow rate of 1.5 mL/min using a 40 min linear gradient from water (0.1% TFA) to CH_3CN (0.1% TFA) (method 1) or MeOH (0.1% TFA) (method 2). Aza-peptides were purified using semi-preparative LC-MS (Previa C18 column, 22 x 250 mm², particle size 5 μm) with solvent A, H₂O (0.1% TFA), and solvent B, acetonitrile (0.1% TFA) using a gradient of 20-40% of A over 20 min at a flow rate of 15 mL/min.

Purity of aza-peptides was assessed using analytical HPLC analyses performed on a TARGA column from Higgins Analytical, Inc. (4.6 x 250 mm, 5 μm , C₁₈) with a flow rate of 1.5 mL/min using a 40 min linear gradient from water (0.1% TFA) to CH_3CN (0.1% TFA) (method 1) or to MeOH (0.1% TFA) (method 2) and high resolution mass spectrometry. Aza-peptides were purified to >99% purity.

Aza-peptides 15-49

Aza-peptides **15-49** were synthesized using IRORI kanTM technology. MacrokanTM were respectively filled with 130 mg (0.0845 mmole) of 75-100 mesh Rink Resin SS and a radiofrequency (Rf) tag associated to a unique ID number. In a split-and-mix approach, kanTM undergoing identical reactions were pooled together in a normal glass vessel, that was filled with solvent and reagents. Upon completion of the reaction, MacrokanTM were washed three times sequentially with DMF, MeOH and DCM, separated, sorted, and pooled accordingly for next reactions. Cleavage of the final peptide from the resin with simultaneous removal of protection from amino acid side chains was performed by treatment with TFA: H₂O: TES (95:2.5:2.5 v/v/v) for 2 h. The resin was filtered and

washed with TFA, and the filtrate and washings were concentrated to an approximate volume of 1 mL before dilution with Et₂O for precipitation of the azapeptides. The ether layer was decanted after centrifugation and the resulting peptide was dissolved in MeCN:H₂O (1:1) and freeze dried to yield a white foam in average yields of 44% for peptides **1-15** and 5.1% for peptides **15-49** after purification using RP-HPLC.

Analytical HPLC analyses were performed on a Gemini column (4.6 mm x 150 mm, 5 μM, C₁₈) with a flow rate of 0.5 mL/min using either a 2-40%, 10-50%, or 20-80% gradient from water (0.1% FA) to CH₃CN (0.1% FA) or MeOH (0.1% FA). Azapeptides were purified using semi-preparative LC-MS (Preval C18 column, 22 x 250 mm², particle size 5 μm) with solvent A, H₂O (0.1% FA), and solvent B, acetonitrile (0.1% FA) using a gradient over 20 min at a flow rate of 10.6 mL/min.

Purity of azapeptides was assessed using GEMINI column from phenomenex (4.6 mm x 150 mm, 5 μM, C18) with a flow rate of 0.5 ml/min using a 2-40%, 10-50%, or 20-80% gradient of water (0.1% FA) in CH₃CN (0.1% FA) or in MeOH (0.1% FA) and high resolution mass spectrometry. Azapeptides were purified to 93-99% purity.

General procedure for the synthesis of 9-H-Fluoren-9-ylmethyl carbazate and N'-Alkyl-Fluorenylmethyl carbazates

9-H-Fluoren-9-ylmethyl carbazate (**51**),⁴⁰ N'-2-isobutyl-fluorenyl methyl carbazate,¹⁸ N'-benzyl-fluorenylmethyl carbazate,¹⁸ N'-(4-(t-butyldimethylsilyloxy)-benzyl)-fluorenyl-methyl carbazate,¹⁸ N'-(1-naphthylmethyl)-fluorenylmethyl carbazate³² and N'-(biphenyl-4-ylmethyl)-fluorenylmethyl carbazate,³² all were synthesized according to literature procedures.

Synthesis of N'-2-phenylethyl-fluorenylmethyl carbazate

A suspension of 9-H-fluoren-9-ylmethyl carbazate in EtOH (0.2 M, 2.5 mmol) was treated with 100 mol% of phenylacetaldehyde (2.5 mmol), heated at reflux for 2 h and concentrated *in vacuo*. The hydrazone was dissolved in THF (0.2 M) and treated successively with 110 mol% of AcOH and 110 mol% of NaBH₃CN, stirred for 1 h and treated with additional NaBH₃CN if necessary until completion of the reaction was

observed by TLC. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in EtOAc, and the organic solution was washed with aqueous KHSO₄ (1M) and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to yield a white solid, which was dissolved in EtOH and heated at reflux for 1h. The mixture was concentrated under reduced pressure to yield a residue that was purified by flash chromatography using 50% EtOAc in hexane as eluant and isolated as white foam in 76% yield: *R_f* = 0.26 (50% EtOAc in hexanes); ¹H NMR (DMSO) δ 2.67 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.94 (m, 2H), 4.24 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.34 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.63 (m, 1H), 7.14-7.36 (m, 7H), 7.42 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.71 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.90 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 8.78 (brs, 1H); ¹³C NMR (DMSO) δ 33.9, 46.8, 52.5, 65.6, 120.2 (2C), 125.3 (2C), 125.9, 127.2 (2C), 127.8 (2C), 128.3 (2C), 128.8 (2C), 140.2, 140.8 (2C), 143.9 (2C), 157.0. LRMS (EI) 359.1 (M+H)⁺, 381.2 (M+Na)⁺. HRMS (EI) *m/e* for C₂₃H₂₃N₂O₂ (M+H)⁺, calcd 396.1918, found 396.1919.

Synthesis of Fluoren-9-yl-methyl pyrazolidine-1-carboxylate hydrochloride

Tert-butyl pyrazolidine-1-carboxylate⁴¹ (1.39 g, 8.08 mmol) was treated with Fmoc succinimide (3.27 g, 9.69 mmol, 1.2 eq.) in dry dichloromethane (20 mL) with stirring overnight. The volatiles were removed using a rotary evaporator. The residue was dissolved in EtOAc. The organic solution was washed three times, respectively, with 5% citric acid, 5% NaHCO₃ and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to a white foam, which was purified by column chromatography using 7: 3 EtOAc: hexane as eluant. Evaporation of the collected fractions afforded 1-(9H-fluoren-9-yl)methyl 2-*tert*-butylpyrazolidine-1,2-dicarboxylate as a low melting white solid in a 94% yield. Pyrazolidine-1,2-dicarboxylate (1.34 g, 3.4 mmol) was treated with 25 mL of a 1: 1 TFA: DCM solution and stirred for 1 h. Removal of the volatiles by rotary evaporation gave a residue, which was dissolved in 1N HCl, stirred for 1 h, and freeze-dried to yield (9H-fluoren-9-pyrazolidine-1-yl)methyl-1-carboxylate hydrochloride: mp 143.2-148.1°C, lit. mp 142°C.³⁰ Spectral characterization data was identical with that in reference 30.

Membrane Preparation for CD36

Animal use was in accordance with the Institutional Animal Ethics Committee and the Canadian Council on Animal Care guidelines for the use of experimental animals. Sprague Dawley (275-350g) rats were necrotized with CO₂ until complete loss of consciousness and their hearts were promptly removed in ice-cold saline and the cardiac membranes were prepared according to Harigaya and Schwartz.⁴²

Competitive covalent CD36 binding assay using photoactivatable [¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-Hexarelin as radioligand

The radioiodination procedure to prepare the photoactivatable ligand and the receptor binding assays were performed as previously described by Bodart *et al.*³⁵ Briefly, the rat cardiac membranes (200 µg) as source of CD36 were incubated in the dark, in 525 µL of 50mM Tris-HCl pH 7.4 containing 2 mM EGTA (Buffer A) in the presence of a fixed concentration of [¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-Hexarelin (750 000 cpm) in Buffer B (50 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 2 mM EGTA and 0.05% Bacitracin) and increasing concentrations of competitive ligand (ranging from 0.1 to 50 µM). Nonspecific binding was defined as binding not displaced by 50 µM peptide. After an incubation period of 60 min at 22 °C, membranes were submitted to UV irradiation at 365 nm for 15 min at 4 °C. After centrifugation at 12000 g for 15 min, the pellets were suspended in 100 µL of sample buffer consisting of 62 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 15% 2-mercapto-ethanol, and 0.05% bromophenol blue, and boiled for 5 min prior to be subjected to electrophoresis on 7.5% SDS-PAGE. The SDS/PAGE gels were fixed, colored in Coomassie Brilliant Blue R-250, dried, exposed to a storage phosphor intensifying screen (Amersham Biosciences), and analysed by using a Typhoon PhosphorImager (Amersham Biosciences) and ImageQuant 5.0 software to establish competition curves. The band corresponding to the specifically labeled protein of 87 kDa was quantified by densitometry analysis.

Membrane preparation for GHS-R1a receptor

Transfection

LLC-PK1 cells were seeded at 1.5×10^6 cells/10 cm in Petri-dishes and grown for 24 h in DMEM high-glucose (4.5g/L) with 10% foetal bovine serum supplemented with Penicilline (10,000Units/ml) and Streptomycin (10,000ug/ml), and cultured at 37°C, under 5% of CO₂. The medium was then replaced for another 4-5 h, before CaPO₄ calcium phosphate transfection. The DNA solution consisted of 40 µg of DNA in a volume of 500 µL in which was added 500 µL of 2mM Tris-HCl pH 8.0, and 0.2mM EDTA pH 8.0 containing 500mM CaCl₂, to a final volume of 1mL. Then 1mL of 50 mM Hepes, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄ pH to 7.1 (HBSS) was added by alternating 1 drop / 2 air bubbles. The transfection mixture was incubated at RT for 30 min. After the incubation period, 1 mL of the mix was added to each plate and distributed evenly for incubation. The media was then replaced with standard DMEM-high glucose media for another 24 h and cells were collected for membrane preparation.

Membrane preparation

The experiment was carried out at 4°C unless specified. Cells were washed twice with PBS and with the homogenization buffer (HB) consisting of 50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA, and 30 ug/mL Bacitracin at pH 7.3, and were scraped into Eppendorf tubes. Cells were lysed with 2 cycles of freeze/thawing using liquid nitrogen and were then centrifuged at 4°C for 20 min at 10,000 g to collect the membranes. The membranes were suspended in a small volume of HB, aliquoted and stored at -80 °C.

GHS-R1a receptor binding assay

The competitive binding assay employed 200 µl HB, 100 µl ¹²⁵I-ghrelin (40,000 cpm), 100 µl competitive ligand (from 10⁻¹² to 10⁻⁵ M) and 100 µl of GHS-R1a transiently transfected in LLC-PK1 cells as source of binding sites (10 µg protein/tube). The non-specific binding was determined using excess of competitive ligand at 10⁻⁵M. The reaction was performed at RT for 1 h. After the incubation period, the separation of bound from free fractions was performed by filtration over a GF/C filter pre-soaked with 0.5%

polyethyleneimine, and the filters were washed with 4 mL of HB consisting of 50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA and 3 mL of wash buffer consisting of 50 mM Tris-10 mM MgCl₂ and 20 mM EDTA, 0.015% Triton X100 (pH 7.3), and collected for radioactivity counting using a gamma counter (LKB Wallac 1277, Turku Finland).

Microvascular sprouting from choroidal explants

Explants from choroidal capillaries of adult CB57BL/6 mice were prepared as previously reported, with some modifications to the protocol.²⁷ After enucleation, eyes were collected, and incubated in 2% dispase for 1 h at 37°C in EBM free medium. The anterior segment, vitreous and neurosensory retina were removed and an eyecup was made. The retinal pigment epithelium (RPE) were removed from choroid-sclera by gently scraping. Choroid-sclera were cut into 4-5 pieces and sides closed to the optic nerve and the cornea were recut. Each piece was cultured in growth factor-reduced Matrigel (BD Biosciences) in 24-well plates with EBM+EGM 0.4% of serum without hydrocortisone (RPE side up). Plates were then incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 6 days before incubation in absence (control) or in presence of different peptides at final concentration of 10⁻⁷ M in EBM without serum. Photographs of individual explants were taken before (J0) and after 4-day exposure (J4). The sprouting covered area was quantified with ImageJ 1.42q (Wayne Rasband) and the % of differential sprouting (J4 vs J0) was determined for tested peptide and azapeptide candidates.

Author information

Corresponding authors

William D. Lubell. Tel: 514-343-7339. Fax: 514-343-7586.

Huy Ong. Tel: 514-343-6460.

Acknowledgments

This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les

Technologies (FQRNT) and the Canadian Institutes of Health Research. CP is grateful to NSERC and Boehringer Ingelheim for graduate student fellowships. The authors thank Dr. A. Fürtös, K. Venne, and M-C. Tang for assistance with mass spectrometry.

Abbreviations used

GHRP-6, Growth Hormone Releasing Peptide 6; GHS-R1a, Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a; CD36, Cluster of Differentiation 36; GH, Growth Hormone; GHRH, Growth Hormone Releasing Hormone; oxLDL, oxidized low density lipoproteins; POVPC, (1-palmitoyl 2-(5'-oxovaleroyl) phosphatidylcholine; TSP-1, Thrombospondin-1; TFA, Trifluoroacetic acid; BTC, bis-(trichloromethyl) carbonate; azaNal-1, azaNaphthalene-1; azaBip, azaBiphenyl.

References

- (1) Momany, F.; Bowers, C. Y.; Reynolds, G. A.; Hong, A.; Newlander, K. Conformational Energy Studies and *in Vitro* and *in Vivo* Activity Data on Growth Hormone-Releasing Peptides. *Endocrinol.* **1984**, *114*(5), 1531-1536.
- (2) Popovic, V.; Damjanovic, S.; Micic, D.; Djurovic, M.; Dieguez, C.; Casanueva, F.F.; Blocked Growth Hormone-Releasing Peptide (GHRP-6)-Induced GH Secretion and Absence of the Synergic Action of GHRP-6 Plus GH-Releasing Hormone in Patients with Hypothalamopituitary Disconnection: Evidence That GHRP-6 Main Action Is Exerted at the Hypothalamic Level. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1995**, *80*(3), 942-947.
- (3) Ghigo, E.; Arvat, E.; Gianotti, L.; Imbimbo, B.P.; Lenaerts, V.; Deghenghi, R.; Camanni, F.; Growth Hormone-Releasing Activity of Hexarelin, a New Synthetic Hexapeptide, after Intravenous, Subcutaneous, Intranasal, and Oral Administration in Man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1994**, *78*(3), 693-698.
- (4) Imbimbo, B. P.; Mant, T.; Edwards, M.; Amin, D.; Dalton, N.; Boutignon, E.; Lenaerts, V.; Wiithrich, P.; Deghenghi, R. Growth hormone-releasing activity of hexarelin in humans. A dose-response study. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1994**, *46*, 421-425.

- (5) Cordido, F.; Peñalva, A.; Dieguez, C.; Casanueva, F. F. Massive growth hormone (GH) discharge in obese subjects after the combined administration of GH-releasing hormone and GHRP-6: evidence for a marked somatotroph secretory capability in obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1993**, *76*, 819-23.
- (6) Frutos, M. G-S.; Cacicedo, L.; Fernandez, C.; Vicent, D.; Velasco, B.; Zapatero, H.; Sanchez-Franco, F.; Insights into a role of GH secretagogues in reversing the age-related decline in the GH/IGF-1 axis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2007**, *293*, E1140-E1152.
- (7) Marleau, S.; Harb, D.; Bujold, K.; Avallone, R.; Iken, K.; Wang, Y.; Demers, A.; Sirois, M. G.; Febbraio, M.; Silverstein, R. L.; Tremblay, A.; Ong, H. EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.* **2005**, *19*, 1869-1871.
- (8) Bodart, V.; Bouchard, J. F.; McNicoll, N.; Escher, E.; Carriere, P.; Ghigo, E.; Sejlitz, T.; Sirois, M.G.; Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. *Circ. Res.* **1999**, *85*, 796-802.
- (9) Endemann, G.; Stanton, L. W.; Madden, K.S.; Bryant, C.M.; White, R.T.; Protter, A.A.; CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 11811-11816.
- (10) Febbraio, M.; Podrez, E. A.; Smith, J.D.; Hajjar, D.P.; Hazen, S.T.; Hoff, H.F.; Sharma, K.; and Silverstein, R. L.; Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, 1049-1056.
- (11) Demers, A.; McNicoll, N.; Febbraio, M.; Servant, M.; Marleau, S.; Silverstein, R.; Ong, H.; Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem. J.* **2004**, *382*, 417-424.
- (12) Febbraio, M.; Silverstein, R. L. CD36: Implications in Cardiovascular Disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*(11), 2012-2030.

- (13) Jiménez, B.; Volpert, O. V.; Crawford, S.E.; Febbraio, M.; Silverstein, R.L.; Bouck, N. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 41-48.
- (14) Sun, J.; Hopkins, B. D.; Tsujikawa, K.; Perruzzi, C.; Adini, I.; Swerlick, R.; Bornstein, P.; Lawler, J.; Benjamin, L. E. Thrombospondin-1 modulates VEGF-A mediated Akt signaling and capillary survival in the developing retina. *Am. J. Physiol.* **2009**, *296*, H1344-H1351.
- (15) Proulx, C.; Sabatino, D.; Hopewell, R.; Spiegel, J.; García Ramos, Y.; Lubell, W. D. Azapeptides and their therapeutic potential. *Future Med. Chem.* **2011**, *3(9)*, 1139-1164.
- (16) (a) Reynolds, C.H.; Hormann, R.E. Theoretical study of the structure and rotational flexibility of diacylhydrazines: implications for the structure of nonsteroidal ecdysone agonists and azapeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9395-9401. (b) Lee, H-J.; Song, J-W.; Choi, Y-S.; Park, H-M.; Lee, K-B. A theoretical study of conformational properties of N-methyl azapeptide derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11881-11893. (c) André, F.; Boussard, G.; Bayeul, D.; Didierjean, C.; Aubry, A.; Marraud, M. Aza-peptides.II. X-Ray structures of aza-alanine and aza-asparagine-containing peptides. *J. Peptide Res.* **1997**, *49*, 556-562. (d) André, F.; Vicherat, A.; Boussard, G.; Aubry, A.; Marraud, M. Aza-peptides. III. Experimental structural analysis of aza-alanine and aza-asparagine-containing peptides. *J. Peptide Res.* **1997**, *50*, 372-381.
- (17) Gassman, J. M.; Magrath, J. An active-site titrant for chymotrypsin, and evidence that azapeptide esters are less susceptible to nucleophilic attack than ordinary esters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6(15)*, 1771-1774.
- (18) Boeglin, D.; Lubell, W. D. Aza-amino acid scanning of secondary structure suited for solid-peptide synthesis with Fmoc chemistry and aza-amino acids with heteroatomic side chains. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 864-878.
- (19) Dutta, A. S.; Furr, B. J. A.; Giles, M. B.; Valcaccia, B.; Synthesis and biological activity of highly active α -aza analogues of luliberin. *J. Med. Chem.* **1978**, *21(10)*, 1018-1024.

- (20) Patchett, A. A.; Harris, E.; Tristram, E. W.; Wyvratt, M. J.; Wu, M. T.; Taub, D.; Peterson, E. R.; Ikeler, T. J.; ten Broeke, J.; Payne, L. G.; Ondeyka, D. L.; Thorsett, E. D.; Greenlee, W. J.; Lohr, N. S.; Hoffsommer, R. D.; Joshua, H.; Ruyle, W. V.; Rothrock, J. W.; Aster, S. D.; Maycock, A. L.; Robinson, F. M.; Hirschmann, R.; Sweet, C. S.; Ulm, E. H.; Gross, D. M.; Vassil, T. C.; Stone, C. A. A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Nature* **1980**, *288*, 280-283.
- (21) Baggio, R.; Shi, Y-Q.; Wu, Y-Q.; Abeles, R. H. From Poor Substrates to Good Inhibitors: Design of Inhibitors for Serine and Thiol Proteases. *Biochemistry* **1996**, *35*(11), 3351-3353.
- (22) Magrath, J.; Abeles, R. H.; Cysteine Protease Inhibition by Azapeptide Esters. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4279-4283.
- (23) Boeglin, D.; Hamdan, F. F.; Melendez, R. E.; Cluzeau, J.; Laperriere, A.; Héroux, M.; Bouvier, M.; Lubell, W. D. Calcitonin gene-related peptide analogues with aza and indolizidinone amino acid residues reveal conformational requirements for antagonist activity at the human calcitonin gene-related peptide 1 receptor. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1401-1408.
- (24) Ekici, Ö. D.; Götz, M. G.; James, K. E.; Li, Z. Z.; Rukamp, B. J.; Asgian, J. L.; Caffrey, C. R.; Hansell, E.; Dvorák, J.; McKerrow, J. H.; Potempa, J.; Travis, J.; Mikolajczyk, J.; Salvesen, G. S.; Powers, J. C. Aza-Peptide Michael Acceptors: A New Class of Inhibitors Specific for Caspases and Other Clan CD Cysteine Proteases. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1889-1892.
- (25) Sabatino, D.; Proulx, C.; Klocek, S.; Bourguet, C. B.; Boeglin, D.; Ong, H.; Lubell, W. D. Exploring Side-Chain Diversity by Submonomer Solid- Aza-Peptide Synthesis. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3650-3653.
- (26) Sabatino, D.; Proulx, C.; Pohankova, P.; Ong, H.; Lubell, W. D. Structure-Activity Relationships of GHRP-6 Azapeptide Ligands of the CD36 Scavenger Receptor by Solid-Submonomer Azapeptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12493-12506.

- (27) Kobayashi, S.; Fukuta, M.; Kontani, H.; Yanagita, S.; Kimura, I. A Quantitative Assay for Angiogenesis of Cultured Choroidal Tissues in Streptozotocin-Diabetic Wistar and Spontaneously Diabetic GK Rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **1998**, *78*, 471–478.
- (28) Melendez, R. E.; Lubell, W. D. Aza-Amino Acid Scan for Rapid Identification of Secondary Structure Based on the Application of *N*-Boc-Aza¹-Dipeptides in Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(21), 6759-6764.
- (29) Proulx, C.; Lubell, W. D. Solid-Phase Synthesis of Aza-Proline Analogs of GHRP-6. In *Peptides: Breaking Away*. Proceedings of the 21st American Peptide Symposium, Lebl, M., Ed. Prompt Scientific Publishing: San Diego, CA, 2009; pp 56-57.
- (30) Freeman, N. S.; Tal-Gan, Y.; Klein, S.; Levitzki, A.; Gilon, C. Microwave-Assisted Solid-Phase Aza-peptide Synthesis: Aza Scan of a PKB/Akt Inhibitor Using Aza-arginine and Aza-proline Precursors. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3078-3085.
- (31) Lubell, W. D.; Blankenship, J. W.; Fridkin, G.; Kaul, R. (2005) "Peptides." *Science of Synthesis 21.11, Chemistry of Amides*. Thieme, Stuttgart, 713-809.
- (32) Boeglin, D.; Xiang, Z.; Sorenson, N. B.; Wood, M. S.; Haskell-Luevano, C.; Lubell, W. D. Aza-scanning of the potent melanocortin receptor agonist Ac-His-D-Phe-Arg-Trp-NH₂. *Chem. Bio. Drug Des.* **2006**, *67*, 275-283.
- (33) http://www.nexusbio.com/Products/CombiChem/irori_cc_kan_reactors.php.
- (34) Demange, L.; Boeglin, D.; Moulin, A.; Mousseaux, D.; Ryan, J.; Berge', G.; Gagne, D.; Heitz, A.; Perrissoud, D.; Locatelli, V.; Torsello, T.; Galleyrand, J.-C.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J. Synthesis and Pharmacological in Vitro and in Vivo Evaluations of Novel Triazole Derivatives as Ligands of the Ghrelin Receptor. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1939-1957.
- (35) Bodart, V.; Febbraio, M.; Demers, A.; McNicoll, N.; Pohankova, P.; Perreault, A.; Sejlitz, T.; Escher, E.; Silverstein, R. L.; Lamontagne, D.; Ong, H. CD36 mediates the cardiovascular action of Growth Hormone-Releasing Peptides in the heart. *Circ. Res.* **2002**, *90*, 844-849.

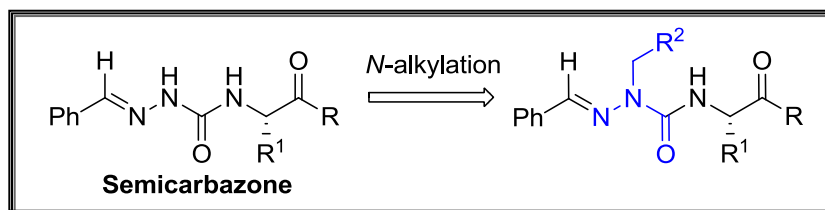
- (36) (a) Didierjean, C.; Del Duca, V.; Benedetti, E.; Aubry, A.; Zouikri, M.; Marraud, M.; Boussard, G. X-ray structures of aza-proline-containing peptides. *J. Pept. Res.* **1997**, *50*, 451-457. (b) Zouikri, Vicherat, A.; Aubry, A.; Marraud, M.; Boussard, G. Azaproline as a β -turn-inducer residue opposed to proline. *J. Pept. Res.* **1998**, *52*, 19-26. (c) Lecoq, A.; Boussard, G.; Marraud, M.; Aubry, A. Crystal state conformation of three azapeptides containing the azaproline residue, a β -turn regulator. *Biopolymers* **1993**, *33*, 1051-1059. (d) Lecoq, A.; Boussard, G.; Marraud, M. The couple Pro/AzaPro: a means of β -turn formation control synthesis and conformation of two aza-pro-containing dipeptides. *Tetrahedron Letters* **1992**, *33*(36), 5209-5212.
- (37) Sun, J.; Hopkins, B. D.; Tsujikawa, K.; Perruzzi, C.; Adini, I.; Swerlick, R.; Bornstein, P.; Lawler, J.; Benjamin, L. E. Thrombospondin-1 modulates VEGF-A-mediated Akt signaling and capillary survival in the developing retina. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2009**, *296*(5), H1344-51.
- (38) Bush, C. A.; Sarkar, S. K.; Kopple, K. D. Circular dichroism of β turns in peptides and proteins. *Biochemistry* **1978**, *17*, 4951-4954.
- (39) Gibson, C.; Goodman, S. L.; Hahn, D.; Hölzemann, G.; Kessler, H. Novel solid-phase synthesis of azapeptides and azapeptoides via Fmoc-strategy and its application in the synthesis of RGD-mimetics. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7388-7394.
- (40) Carpino, L. A.; Han, J. Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.
- (41) Zhang, W.-J.; Berglund, A.; Kao, J. L.-F.; Couty, J.-P.; Gershengorn, M. C.; Marshall, G. R. Impact of Azaproline on Amide Cis-Trans Isomerism: Conformational Analyses and NMR Studies of Model Peptides Including TRH Analogues. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1221-1235.
- (42) Harigaya, S.; Schwartz, A. Rate of calcium binding and uptake in normal animal and failing human cardiac muscle: membrane vesicles (relaxing system) and mitochondria. *Circ. Res.* **1969**, *25*, 781-794.

2.4 Conclusion et perspectives

Ce chapitre a décrit nos efforts vers la synthèse de dérivés « aza » du GHRP-6 avec sélectivité accrue pour le récepteur CD36 en comparaison avec le récepteur GHS-R1a. À cette fin, la nature de la chaîne latérale et la position de l'acide aminé « aza » de la région D-Trp²-Ala³-Trp⁴ du GHRP-6 ont été systématiquement modifiées. Ce balayage d'acides aminés « aza », suivi par un balayage d'alanine des meilleurs candidats, nous a permis d'identifier des azapeptides où (1) l'affinité pour le récepteur CD36 était maintenue dans l'ordre du micromolaire et (2) une baisse d'affinité pour le récepteur GHS-R1a était observée. Parmi les azapeptides obtenus, les propriétés anti-angiogéniques de cinq aza-GHRP-6 prometteurs, soit les analogues [azaTyr⁴]-GHRP-6, [Ala¹, azaPhe²]-GHRP-6, [Ala¹, azaGly³]-GHRP-6, [azaLeu³, Ala⁶]-GHRP-6 et [Ala¹, azaPhe⁴]-GHRP-6, ont été évaluées. L'administration du peptide [Ala¹, azaPhe⁴]-GHRP-6 a causée une augmentation de la néovascularisation de la choroïde alors qu'une réponse anti-angiogénique a été observée après administrations des quatre autres azapeptides.

Nous cherchons à présent à mieux définir les propriétés structurales et conformationnelles responsables des réponses biologiques divergentes. De plus, bien que nous ayons réussi à identifier des analogues du peptide GHRP-6 avec affinité réduite pour le récepteur GHS-R1a, nous n'avons malheureusement pas encore d'analogue avec affinité pour le récepteur CD36 supérieure à celle de GHRP-6 ($IC_{50} \gg 1.82 \times 10^{-6}$ M). Afin d'atteindre plus rapidement ces deux objectifs, nous avons décidé de consacrer nos efforts vers le développement d'une approche combinatoire pour la synthèse d'azapeptides. Cette méthodologie sera discutée au chapitre 3.

Chapitre 3: Développement d'une méthodologie pour la synthèse combinatoire d'azapeptides



3.1 **Principe de chimie combinatoire: application à la synthèse peptidique**

La chimie combinatoire est une technique qui permet la synthèse parallèle de larges banques de composés apparentés, dans le but d'identifier de nouvelles molécules biologiquement actives par le biais de techniques de criblage à haut débit. Cette approche est particulièrement compatible avec la synthèse d'oligomères peptidiques, qui fait appel à un cycle d'étapes répétitives à hauts rendements tout en utilisant des réactifs commercialement disponibles. En effet, le développement d'une méthodologie pour la synthèse peptidique sur support solide (SPPS) par Merrifield fut une découverte d'une telle envergure pour la communauté scientifique qu'il mérita le prix Nobel de chimie en 1984.² Grâce à l'utilisation de support polymérique, il était désormais possible de synthétiser des séquences peptidiques en un relativement court laps de temps, puisque l'excès de réactifs utilisé pouvait être éliminé par une simple filtration et qu'une seule étape de purification était nécessaire suite au clivage du peptide final de la résine.

3.1.1 **Synthèse de peptide en parallèle**

L'utilité de la synthèse peptidique sur support solide a pris de l'expansion lorsqu'elle a été adaptée pour permettre la synthèse parallèle de >100 peptides. Deux techniques ont été introduites à cette fin, soit l'utilisation de « pins » et de « sachets de thé », popularisée respectivement par Geysen⁸⁶ et Houghten.⁸⁷ La première approche emploie des supports en polyéthylène inerte de forme allongée sur lesquels est greffé un polymère mobile qui sert de point d'attache pour le peptide. Chaque « pin » peut alors être submergé dans un compartiment individuel d'une plaque à puits multiples, ce qui permet la synthèse en parallèle de plusieurs peptides (Figure 3.1, à gauche). La forme de ces « pins » a ultimement été optimisée pour donner des « lanternes », afin de permettre une meilleure surface de contact et un drainage de solvant plus efficace (Figure 3.1, à droite). Ces lanternes peuvent être combinées dans un même récipient lors d'étapes communes et séparées à nouveau lors d'étapes divergentes. Une simple méthode d'étiquetage à code couleur peut être utilisée pour différencier les lanternes.

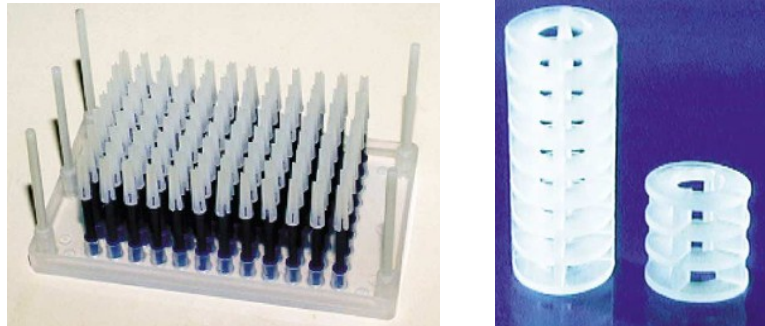


Figure 3.1. Photos de « pins » (à gauche) et « lanternes » (à droite).⁸⁸

Alternativement, la seconde approche fait appel à des sachets en mailles de polypropylène, d'où le terme « sachets de thé », dans lesquels est ajoutée une quantité pré-mesurée de résine (Figure 3.2, à gauche). De cette façon, tel que pour les lanternes, plusieurs sachets peuvent être combinés lorsque soumis aux mêmes conditions réactionnelles ou de lavage: le solvant et les réactifs peuvent entrer dans les pochettes et en sortir librement, alors que la résine y demeure emprisonnée. Lors des étapes de diversification, chaque pochette de polypropylène peut être séparée et soumise à différentes conditions. L'identification du peptide synthétisé peut alors se faire par la simple inscription d'un code ou numéro sur l'enveloppe. Le même concept a ensuite été repris pour donner naissance aux kans IRORI™ (Figure 3.2, à droite), dans lesquelles peuvent être ajoutés une étiquette numérique (marqueur par radiofréquence) ou un codebarre à fins d'indentification.

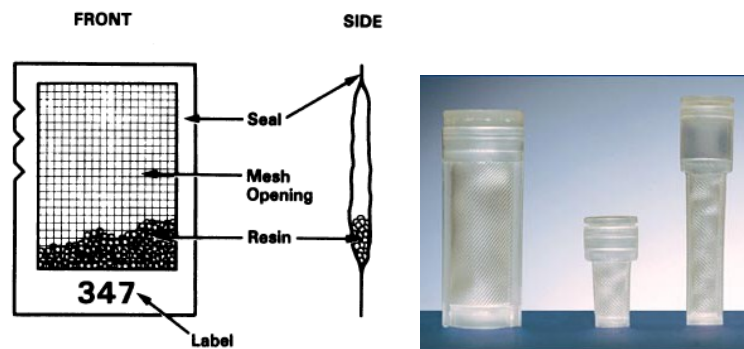


Figure 3.2. Représentation schématique des « sachets de thé » (à gauche)⁸⁷ et photo de kan IRORI™ (à droite).⁸⁹

Ces techniques sont le plus souvent utilisées pour la synthèse combinatoire de chimiothèques ciblées (rationnelles) de taille moyenne, plutôt que pour la synthèse combinatoire aléatoire de millions de composés.

3.1.2 Technique de partage et mélange (« split and mix »)

Le concept « une-bille-un-composé » (OBOC, « one-bead-one-compound »)⁹⁰ est basé sur le principe selon lequel chaque bille de résine de 100 μm de diamètre soumise à une synthèse de partage et mélange⁹¹ contient jusqu'à 10^{13} copies d'un même peptide. Cette technique consiste à (1) diviser une quantité de résine en différents lots et soumettre chacun de ces groupes à des conditions de couplage distinctes (étape de partage), (2) recombiner les lots pour les étapes communes de déprotections et lavages (étape de mélange), (3) séparer la résine à nouveau au hasard et répéter les étapes 1 et 2 jusqu'à atteinte de la taille de peptide désirée (Figure 3.3, à gauche).⁹²

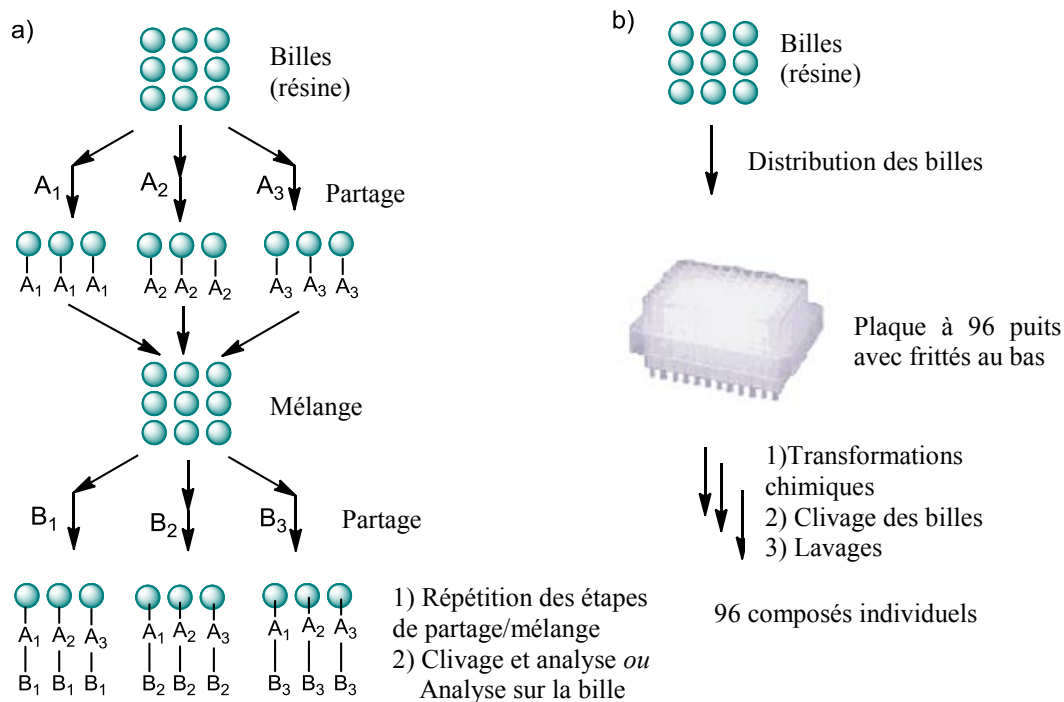


Figure 3.3. a) technique une-bille-un-composé. b) technique de synthèse en parallèle.

Dans une telle situation où on obtient un mélange statistique de plusieurs millions de composés, l'identification finale d'un peptide biologiquement actif peut se faire par l'ajout d'une étiquette moléculaire: les peptides peuvent être ancrés sur les billes de résine via deux ou trois espaceurs orthogonaux afin de permettre la libération du peptide et de l'étiquette moléculaire sous différentes conditions (Figure 3.4).⁹³ L'ensemble des billes est d'abord séparé sur une plaque en lots de 100-500 billes par puits et clivé du support solide en employant des conditions pour libérer le peptide du premier espaceur. Les filtrats sont analysés pour activité, puis les billes individuelles des lots actifs sont redistribuées dans une nouvelle plaque à puits multiples. Chaque bille est alors soumise aux conditions de clivage du second espaceur et les filtrats sont à nouveau analysés. Finalement, le troisième espaceur permet la libération finale du peptide ou de l'étiquette moléculaire à fins d'identification. Les techniques analytiques utilisées pour l'identification du peptide doivent être très sensibles dûs à la petite quantité (quelques picomoles) de matériel manipulée.

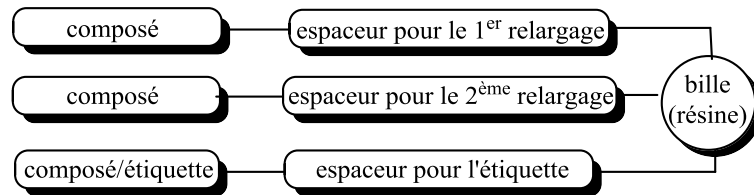


Figure 3.4. Stratégie pour l'identification tardive de composés par l'usage d'étiquettes moléculaires.⁹²

Cette approche a même été optimisée afin de permettre la ségrégation topologique de l'étiquette moléculaire à l'intérieur de la bille, de sorte que sa présence ne nuise pas lors de techniques de criblage directement appliquées sur support solide.⁹⁴ D'autres techniques plus laborieuses permettent l'identification d'une molécule active, telles que la déconvolution itérative,⁹⁵ la déconvolution récursive⁹⁶ et la déconvolution par balayage positionnel.⁹⁷

3.1.3 Automatisation du processus de synthèse peptidique sur support solide

Heureusement, le processus de synthèse peptidique a pu être automatisé peu de temps après le développement de la méthodologie de synthèse peptidique sur support solide.⁹⁸ Il s'est depuis adapté aux nombreuses techniques de synthèse en parallèle et combinatoire, s'équipant de bras capables de diviser et recombinaison la résine.

Dans tous les cas sus-mentionnés, les réactions effectuées doivent être quasi-quantitatives afin de minimiser la contamination du peptide désiré par la présence de peptides tronqués. Ceci est particulièrement important lorsque le concept une-bille-un-composé est appliqué, car un mélange statistique de composés est désiré afin d'éviter la sous représentation d'un peptide durant l'étape de criblage biologique. De façon générale, lorsque ce critère est respecté et que les monomères utilisés sont facilement accessibles, les étapes limitantes deviennent alors le criblage et, au besoin, l'identification de la structure du peptide actif. En effet, l'automatisation de la synthèse peptidique combinatoire a rendu le processus de synthèse encore plus efficace et accessible.

3.2 Synthèse combinatoire de peptidomimétiques

Le concept de synthèse combinatoire pour le développement de banques de peptidomimétiques a été mis en application dans certains cas, mais il consiste en un défi considérablement plus important. En effet, afin d'être considérée efficace, la synthèse parallèle de mimes peptidiques doit respecter les mêmes strictes prérequis que la synthèse combinatoire d'oligomères peptidiques: les monomères employés doivent être facilement accessibles ou commerciaux et leur incorporation et diversification subséquentes doivent être accomplies avec de très hauts rendements.

À titre d'exemple, les synthèses d'oligourées⁹⁹ et d'oligocarbamates¹⁰⁰ (Figure 3.5) ont été accomplies par le couplage automatisé de monomères pré-synthétisés en solution. Dans le cas de la synthèse d'oligourées, une variété de dix monomères a été préparée par la réduction de *N*-Fmoc acide aminés en alcools correspondants (**81a-j**), suivie de leur

conversion en amines primaires (**83a-j**), puis en carbamates (**84a-j**) (Schéma 3.1).⁹⁹ L'incorporation de ces monomères a ensuite été automatisée sur support solide.

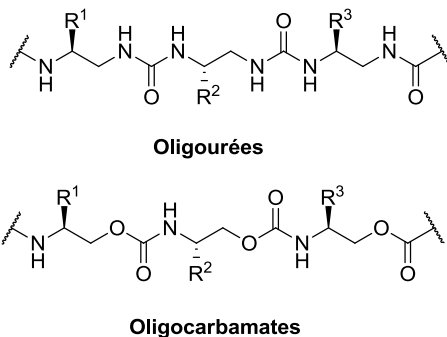


Figure 3.5. Structure d'oligourées et oligocarbamates.

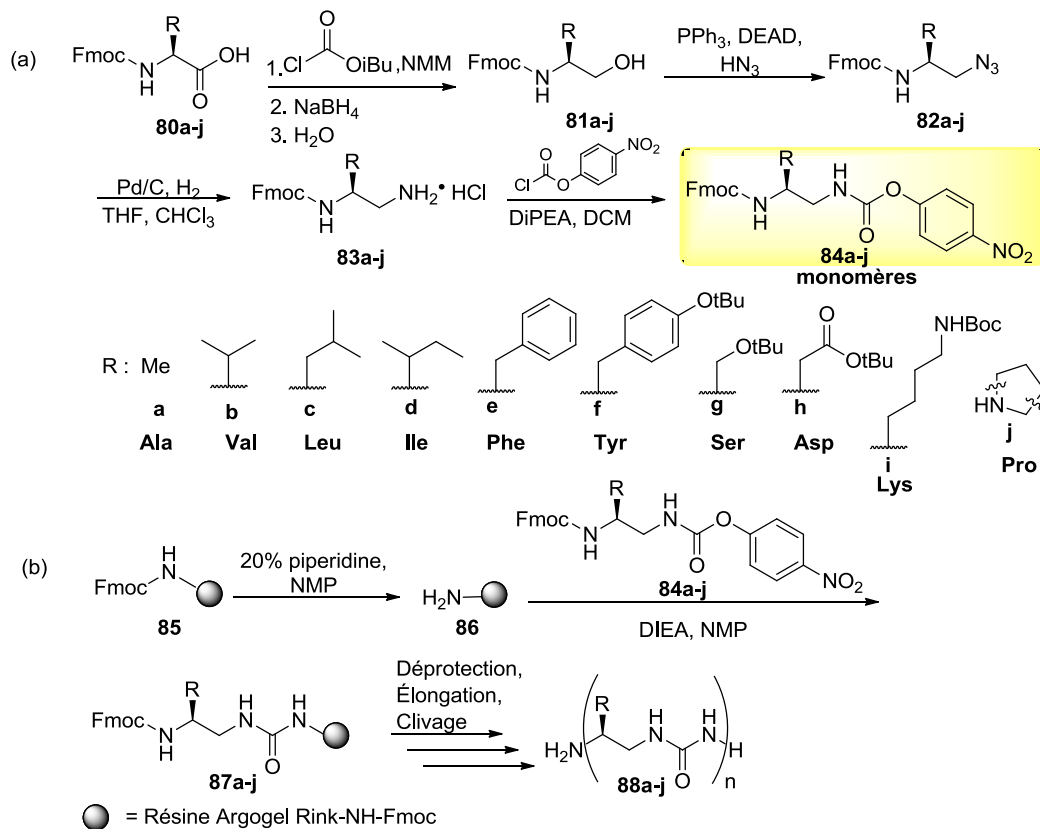


Schéma 3.1. (a) Synthèse en solution des monomères requis pour la synthèse d'oligourées sur support solide. (b) Synthèse d'oligourées sur support solide.⁹⁹

Quant à la synthèse combinatoire d'oligocarbamates (Figure 3.5), elle fait appel à l'utilisation de monomères semblables à celle des oligourées, sauf que les alcools primaires réagissent immédiatement avec le chloroformate de *p*-nitrophényle pour donner les monomères correspondants.¹⁰⁰ Dans les deux cas, bien que le processus d'incorporation des monomères sur support solide soit compatible avec la synthèse combinatoire automatisée, la préformation des monomères en solution requiert de deux à quatre étapes par monomère, ce qui n'est pas idéal.

3.2.1 Diversification de sous-unités communes sur résine : synthèse de larges banques de peptidomimétiques

Une technique plus favorable à la synthèse combinatoire de peptidomimétiques serait d'introduire la diversité directement sur support solide, sans faire appel à des étapes synthétiques en solution. Ceci a été accompli avec succès, notamment dans le cas de la synthèse de peptoïdes¹⁰¹ et dans la synthèse d'analogues avec groupement amides alkylés.¹⁰²

3.2.1.1 Approche « submonomer » pour la synthèse de peptoïde

Un des exemples les mieux établis est la synthèse de peptoïdes, une classe de mimes peptidiques où la chaîne latérale des acides aminés est déplacée sur l'azote pour donner des polymères de glycine *N*-substituées. Leur synthèse a été automatisée en un processus à deux étapes, soit (1) le couplage d'une sous-unité d'acide bromobenzoïque avec un résidu glycine *N*-substituée ancré sur support solide, suivi de (2) l'ajout d'une amine substituée pour donner un second résidu glycine *N*-substituée suite à un déplacement S_N2 du bromure (Schéma 3.2).¹⁰¹

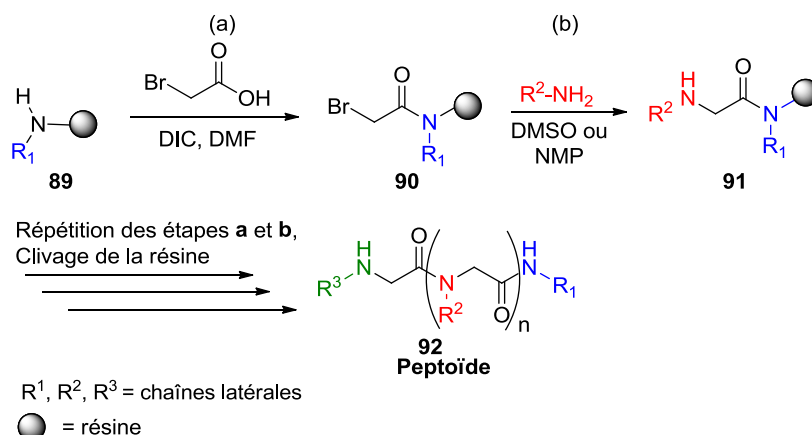


Schéma 3.2. Approche « submonomère » pour la synthèse de peptoides.

Étant donné la grande variété d'amines disponibles commercialement et l'efficacité remarquable de cette voie synthétique, la synthèse combinatoire d'une multitude de peptoides à propriétés distinctes est rendue possible, sans toutefois nécessiter une grande quantité de manipulations. Par exemple, l'identification de peptoides (15-mères) adoptant la conformation d'hélice α a été effectuée à partir d'une banque de 3 400 composés.¹⁰³ Dans une autre étude, des peptoides avec activités antimicrobiales intéressantes ont été identifiés à partir d'une banque de 10 000 peptoides (trimères).¹⁰⁴

3.2.1.2 Synthèse de « bibliothèques de bibliothèques » sur support solide

La possibilité d'alkyler les groupements amides d'un peptide directement sur support solide permet de créer des sous-bibliothèques de composés, c'est-à-dire d'accéder à une nouvelle banque de mimés peptidiques par la différenciation d'une bibliothèque de peptides préalablement synthétisée (« libraries from libraries »).¹⁰² Par exemple, en utilisant un excès d'hydruure de sodium et d'iodure de méthyle dans le DMSO, les groupements amides d'une banque de 37 791 360 (20×18^5) peptides liés sur support solide ont été méthylés.^{102a} Cette fonctionnalisation tardive d'une séquence peptidique a l'avantage de nécessiter un minimum de manipulations mais restreint la diversité sur les azotes amides à un groupement méthyle. L'incorporation d'une plus vaste gamme de chaînes latérales sur les

groupements amides peut être effectuée par une synthèse par étapes : l'alkylation successive des amides avec du *tert*-butoxide de lithium et cinq différents agents alkylants a été appliquée à la synthèse combinatoire d'une banque de 57 500 peptidomimétiques (Schéma 3.3).^{102b}

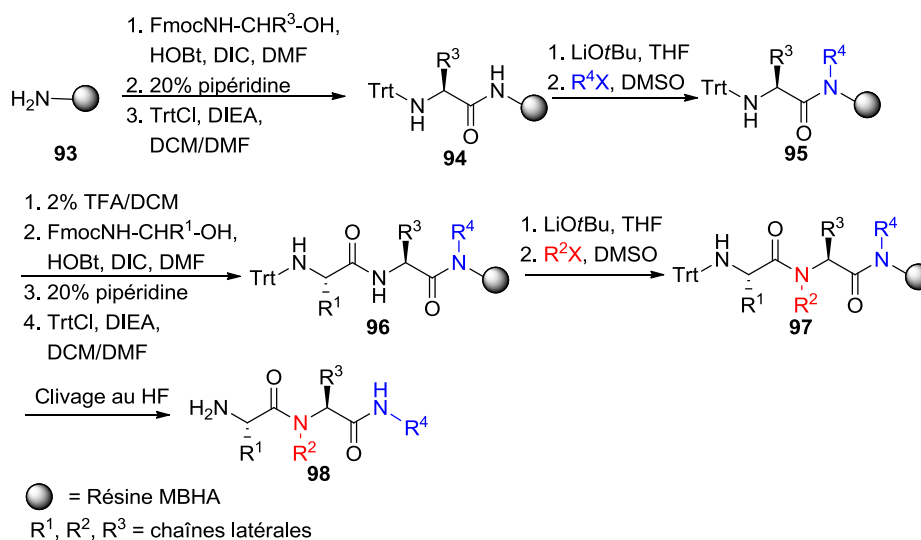


Schéma 3.3. Synthèse de peptidomimétiques par alkylations successives d'amides.^{102b}

Une banque de mimes peptidiques dont le premier résidu amide a été alkylé selon la stratégie décrite ci-haut a ensuite été diversifiée davantage. Suivant cette même stratégie, trois nouvelles « librairies de librairies » ont été créées : la première provenant de la réduction des carbonyles avec du diborane (**100**), et les deux autres dérivant de la cyclisation des peptidomimétiques résultant, avec le carbonyldiimidazole (CDI) ou le thiocarbonyldiimidazole (TCDI), pour donner des urées et thiourées, respectivement (**103**, Schéma 3.4).¹⁰⁵ Lorsque cette même séquence de transformations est employée sur un peptide où aucun des amides n'est préalablement alkylé, la formation de guanidines bicycliques (**101**) est observée. Cette stratégie a été utilisée pour la synthèse combinatoire de 102 459 (49 x 51 x 41) guanidines bicycliques (Schéma 3.4).

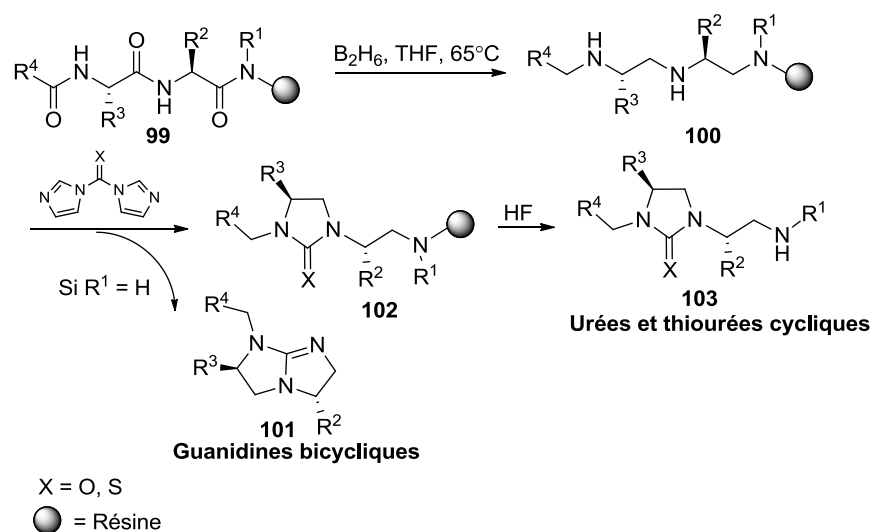


Schéma 3.4. Synthèse d'urées et de thiourées cycliques sur support solide.

3.2.2 Diversification de sous-unités communes sur résine: incorporation de chaînes latérales sur support solide

Toutes les stratégies discutées ci-haut, sauf la synthèse de peptoïdes, ont fait appel à des acides aminés commercialement disponibles comme monomères. O'Donnell *et al.* se sont démarqués par leur conception d'une stratégie pour introduire de la diversité au niveau des chaînes latérales des acides aminés.¹⁰⁶ Le design de cette approche est fondé sur trois étapes clés: (1) l'activation d'un résidu glycine par la formation d'une base de Schiff (2) l'alkylation chimiosélective du CH α en présence d'une base iminophosphorane (BEMP) et d'un agent alkylant pour introduire la chaîne latérale et (3) l'hydrolyse de la base de Schiff avec le chlorhydrate d'hydroxylamine (Figure 3.6).¹⁰⁶ Suite à la déprotection de l'imine, le couplage d'un nouveau résidu glycine peut être effectué et les étapes 1-3 peuvent être répétées. Bien sûr, les acides aminés non-naturels peuvent aussi être couplés à des acides aminés commerciaux et vice-versa.

Cette approche a généré neuf exemples d'acides aminés et de di- et tripeptides possédant un à trois acides aminés non naturels *racémiques* avec des rendements isolés de 37-55% (**113-121**, Figure 3.7). Le processus a ensuite été automatisé et appliqué à la

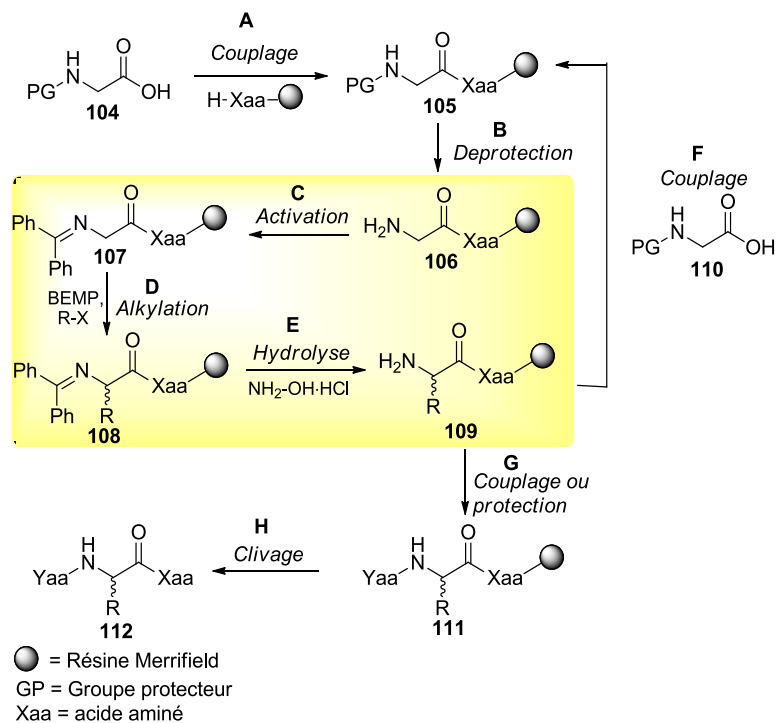


Figure 3.6. Stratégie utilisée par O'Donnell *et al.* pour l'incorporation d'acides aminés non naturels sur support solide.¹⁰⁶

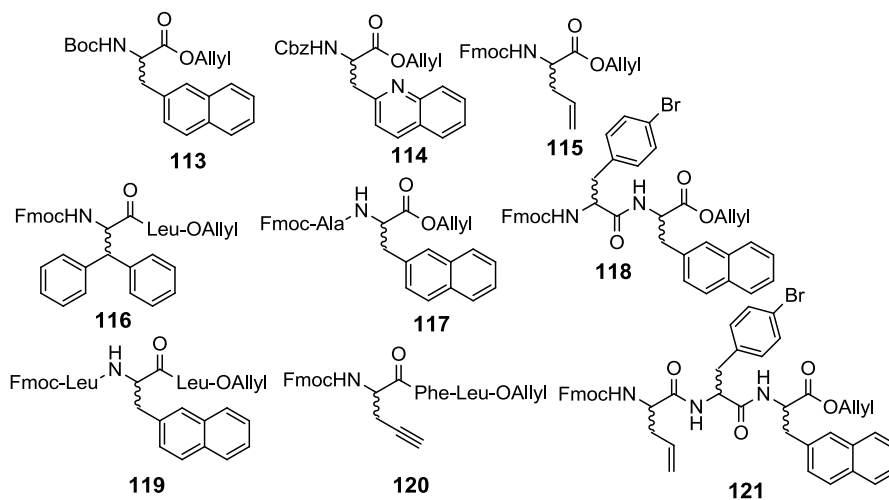


Figure 3.7. Acides aminés non naturels et peptides possédant un ou plusieurs acides aminés non naturels générés par O'Donnell *et al.*¹⁰⁶

synthèse de six analogues du dipeptide (D,L)-Phe-Leu, où une variété de bromures de benzyle substitués a été utilisée pour alkyler l'intermédiaire Gly-Leu ancré sur support solide.¹⁰⁶

Cette stratégie a inspiré notre approche pour une synthèse plus efficace d'azapeptides, où la diversification d'un atome d'azote plutôt qu'un atome de carbone élimine la problématique liée à la création d'un centre chiral racémique. Des séquences peptidiques plus longues devraient également être possibles, grâce à la différence de pKa de la semicarbazone générée par notre méthode versus les liaisons amides.

3.3 **Problématique sous étude**

Nous avons démontré au chapitre 2 que la synthèse d'azapeptides pouvait être accomplie dans des kits IRORI™ (Figure 3.2, à droite), ce qui a permis la synthèse de 34 azapeptides en parallèle tout en réduisant la quantité de récipients réactionnels à un minimum. Par contre, la synthèse de carbazates *N*-Fmoc-*N'*-alkyles pour chaque incorporation d'acide aminé « aza » requiert trois étapes en solution. Non seulement est-ce un processus qui demande du temps, la chimie employée, particulièrement l'étape d'hydrogénation ou de réduction de l'hydrazone, n'est pas nécessairement compatible avec certaines chaînes latérales non-naturelles (ex : allyle, propargyle).

Nous avons donc tenté d'élaborer une nouvelle stratégie « submonomer » qui nous permettrait d'incorporer les chaînes latérales du résidu « aza » directement sur support solide (Figure 3.8). Cette stratégie vise à incorporer une sous-unité aza-glycine adéquatement protégée afin de permettre l'introduction de la chaîne latérale de l'acide aminé « aza » sur résine via une alkylation chimiosélective de l'azote α . Le résidu aza-glycine doit être protégé de sorte que les groupements protecteurs soient (a) orthogonaux à ceux retrouvés sur les chaînes latérales des acides aminés précédents (Trt, Boc, TBDMS), (b) compatibles avec les conditions d'alkylations basiques utilisées et (c) déprotégés sous des conditions suffisamment douces ne menant pas au clivage prématuré du peptide de la résine.

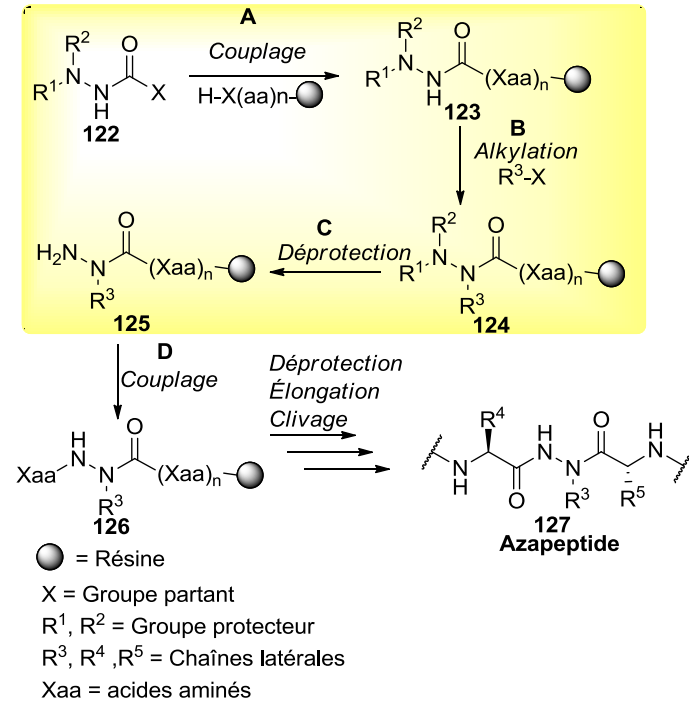


Figure 3.8. Stratégie conceptuelle pour la synthèse d'azapeptide sur support solide.

En effet, comparativement à la stratégie élaborée par O'Donnell *et al.*, qui était limitée à l'utilisation d'acides aminés à chaînes latérales aromatiques ou aliphatiques hydrophobes, l'application de notre méthodologie à la synthèse d'analogues du GHRP-6 doit tenir compte des groupements protecteurs sur les chaînes latérales des résidus His¹, D-Trp², Trp⁴ et Lys⁶.

3.4 Résultats

3.4.1 Développement d'une approche « submonomer » pour la synthèse combinatoire d'azapeptides sur support solide¹⁰⁷

Suite à une optimisation exhaustive, Dr David Sabatino a pu valider l'utilisation d'une sous-unité semicarbazone dérivée du benzaldehyde en tant qu'aza-glycine protégée pour la synthèse d'azapeptides (Schéma 3.5). Cette dernière est incorporée sur résine Rink amide suite à son activation avec le chloroformate de *p*-nitrophényle, qui minimise la formation de l'urée symétrique observée comme sous-produit majoritaire lors de

l'activation avec le phosgène ou le carbonyldiimidazole (CDI). En considérant notre intérêt pour la région D-Trp²-Ala³-Trp⁴ du peptide GHRP-6, laquelle nous croyons favorise la formation d'un repliement β , la sous-unité semicarbazone a été installée à ces trois positions pour analyses subséquentes. L'alkylation chimiosélective de la semicarbazone, en présence de plusieurs groupements amides, a été effectuée à l'aide de *tert*-butoxide de potassium comme base, suivi de l'ajout d'un agent alkylant.

L'étape de déprotection de l'hydrazone s'est avérée un défi considérable. Non seulement devait-elle laisser les groupements protecteurs des chaînes latérales intactes (Boc, Trt), elle devait également être effectuée dans un solvant qui permettait à la résine de gonfler, et sans provoquer le clivage du peptide de la résine. À cette fin, plusieurs conditions différentes ont été essayées par Dr David Sabatino, notamment l'utilisation d'une variété d'acides de Lewis et d'acides de Brønsted en présence de différents nucléophiles. L'addition d'une solution de 1.5 M de chlorohydrate d'hydroxylamine dans le méthanol chauffé à 60 °C pendant 12 heures nous a fourni une première lueur d'espoir : la masse de la semicarbazide correspondante était observée, mais la réaction de déprotection était incomplète. En passant d'un système où la résine se trouvait dans un tube en polypropylène chauffé dans un bain d'huile à (a) un système où le tube était chauffé dans un bain sonore ou (b) la résine était chauffée avec agitation dans une kan IRORI™, la réaction procédait jusqu'à complétude. Cependant, certaines ambiguïtés se sont imposées : d'abord, puisque les conditions de clivage de la résine (TFA:TES:H₂O, 95:2.5:2.5 v/v/v) déprotégeaient aussi les groupements protecteurs Boc et Trt retrouvés sur les chaînes latérales des résidus tryptophanes, histidine et lysine, il nous était impossible de savoir si de telles conditions étaient compatibles avec ces groupes protecteurs. Ensuite, ces conditions de clivage constituaient des conditions idéales pour la déprotection de la semicarbazone. Suite au prochain couplage, nous avons cependant été en mesure d'identifier certains sous-produits associés à des couplages multiples de l'alanine; il était évident que les groupements protecteurs Boc et Trt n'avaient pas résisté à ces conditions de déprotection de l'hydrazone.

La simple substitution du méthanol par la pyridine, un solvant qui à la fois gonflait mieux la résine tout en agissant comme base pour tamponer la solution acide de chlorohydrate d'hydroxylamine, a permis d'optimiser cette étape. Il était donc désormais possible de déprotéger l'hydrazone en chauffant avec sonication à 60 °C en présence d'une solution de 1.5 M de chlorohydrate d'hydroxylamine dans la pyridine (Schéma 3.5). Il est à noter que les étapes d'alkylation et de déprotection de la semicarbazone sont toutes deux plus efficaces avec une semicarbazone dérivée du benzaldéhyde, par opposition à une semicarbazone dérivée du benzophénone. La problématique de l'étape de couplage au résidu semicarbazide à nucléophilie réduite avait déjà été résolue par l'emploi de triphosgène (BTC)^{17,53,63} ou par l'activation en anhydride mixte ou symétrique de l'acide aminé avec isobutylchloroformate (IBC)⁶⁵ ou *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC),⁵⁸ respectivement. (Schéma 3.5). Suite à ce couplage difficile, des conditions standards pour la synthèse de peptide sur support solide pouvaient être utilisées afin de compléter la séquence peptidique.¹⁰⁸

Une fois optimisée cette technique s'est montrée utile à la synthèse de dix analogues du GHRP-6 (Tableau 3.1). À titre d'exemple, le tracé LCMS à 214 nm de l'azapeptide [azaPhe⁴]-GHRP-6 synthétisé avec la nouvelle approche « submonomer » révèle un pourcentage de pureté brute de 73% (Figure 3.9).¹⁰⁷ Les impuretés majeures les plus souvent rencontrées sont les résultats d'une déprotection incomplète (semicarbazone résiduel) et de la semicarbazide non-couplée. Ce sont dans les deux cas des azapeptides tronqués avec des temps de rétention nettement différents de celui de l'azapeptide désiré, qui alors est facilement isolable par HPLC préparative.

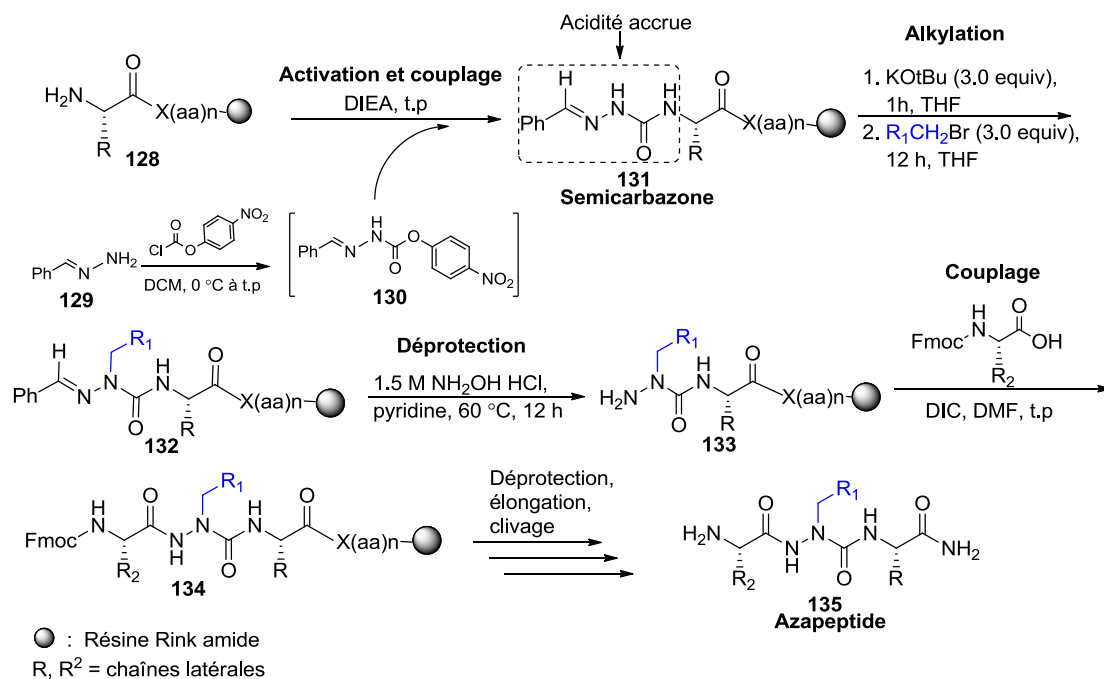


Schéma 3.5. Approche « submonomère » pour la synthèse d'azapeptides.¹⁰⁷

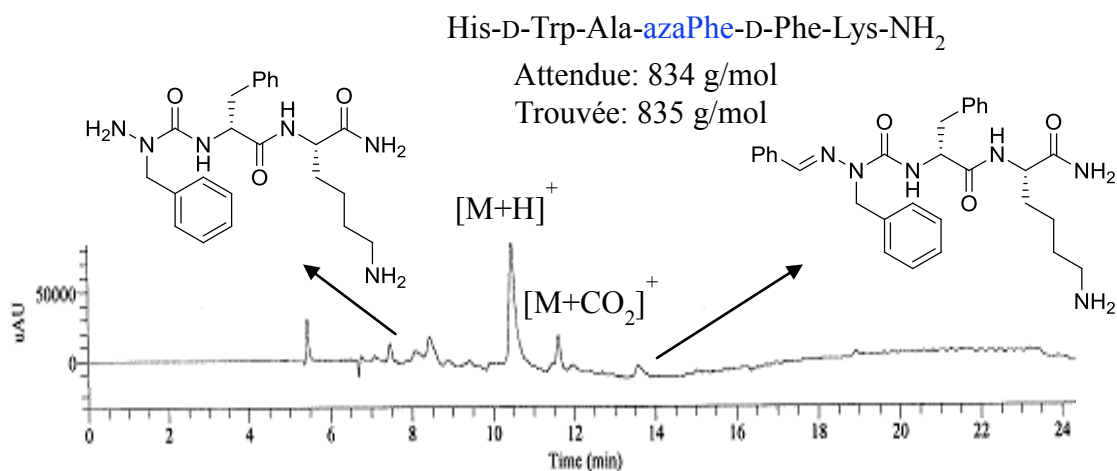
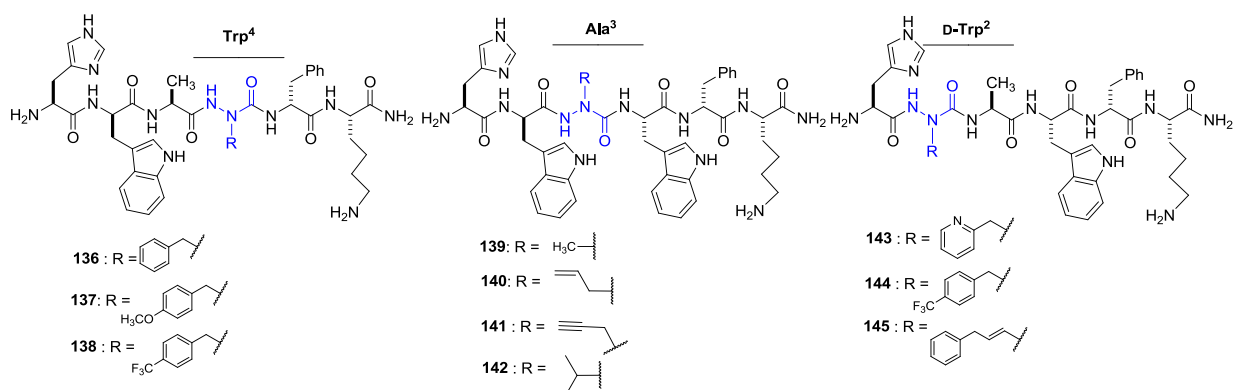


Figure 3.9. Tracé LCMS à 214 nm de l'azapeptide [AzaPhe⁴]-GHRP-6 brut.¹⁰⁷

Différents agents d'alkylations ont donc été utilisés pour introduire une variété de chaînes latérales aux positions D-Trp²-Ala³-Trp⁴ du peptide GHRP-6. Afin de mimer

l'acide aminé tryptophane, une série de bromures ou de chlorures aromatiques a été utilisée pour l'étape d'alkylation de la semicarbazone aux positions D-Trp² et Trp⁴ (Tableau 3.1, entrées 1-3 et 8-10). Quant à la troisième position du peptide GHRP-6, quatre agents alkylants aliphatiques, saturés et insaturés, ont été utilisés pour mimer la chaîne latérale de l'alanine à cette position (Tableau 3.1, entrées 4-7). Par le fait même, nous avons accédé à des résidus aza-propargylglycine et aza-allylglycine qui n'avaient jamais été synthétisés auparavant et qui permettaient désormais la synthèse de « bibliothèques de bibliothèques » d'analogues azapeptides.

Tableau 3.1 Caractérisation des analogues aza-GHRP-6 synthétisés.¹⁰⁷



peptide	R-X	pureté (brut) ^a %	pureté (isolé) ^b %	rendement ^c %	masse obs (theor)	t.r	
						MeOH ^d	MeCN ^e
136		73	>99	25	835.2 (835.4)	16.3	13.3
137		80	>99	27	865.2 (865.4)	16.9	13.2
138		71	>99	15	903.2 (902.9)	20.6	15.1
139	CH ₃ -I	49	>99	15	874.2 (873.9)	16.7	13.5
140		51	90	17	900.2 (900.4)	17.2	13.8
141		45	96	28	898.5 (898.4)	18.2	13.6
142		32	53 ^f	14	902.5 (902.5)	22.5	17.4
143		45	90	20	836.2 (836.4)	17.5	9.91
144		57	>99	25	903.4 (902.9)	21.1	14.9
145		81	>99 ^g	42	861.5 (861.5)	19.5	14.1

^aPureté brut déterminée par analyse LCMS à 254 nm en utilisant H₂O (0.1% FA) et MeOH (0.1% FA) ou MeCN (0.1% FA) comme éluant. ^bPureté isolée déterminée par analyse LCMS à 254 nm en utilisant H₂O (0.1% TFA) et MeOH (0.1% TFA) ou MeCN (0.1% TFA) comme éluant. ^cCalculé à partir du chargement (loading) de la résine. ^dMasse observée (masse attendue) en tant qu'ion [M + 1]⁺ par LCMS. ^eTemps de rétention en utilisant 2-40% MeCN/H₂O comme éluant. ^fMélange 63:37 de [azaVal³]-GHRP-6 et [azaGly³]-GHRP-6. ^gMélange 77 : 23 d'isomères de His.

De façon générale, les électrophiles les plus réactifs sont ceux qui sont des dérivés d'halogénures benzyliques, allyliques ou propargyliques primaires. Les bromures primaires aliphatiques saturés, tels que le (bromométhyl)cyclopropane, le 1-bromo-2-méthylpropane et le (bromométhyl)cyclohexane ne réagissent pas pour donner le produit alkylé désiré.¹⁰⁹ De plus, bien que le 2-iodo-2-méthylpropane réagit pour donner l'analogue [azaVal³]-GHRP-6 (**142**) avec une pureté isolée de 53% (Tableau 3.1, entrée 7), les chaînes latérales ramifiées sur l'acide aminé « aza » ne sont pas très stables aux conditions de clivage de la résine,¹¹⁰ contrairement à ce qui est observé dans les peptoïdes. [azaGly³]-GHRP-6 est donc dans ce cas la contamination majeure identifiée.

Suite à la déprotection chimiosélective de la semicarbazone et au couplage de la semicarbazide par activation avec IBC, la séquence des analogues aza-GHRP-6 a pu être terminée par l'emploi de conditions standards pour la synthèse peptidique sur support solide.¹⁰⁸ Ainsi, nous avons démontré avec succès qu'un balayage positionnel d'acides aminés « aza » de l'hexapeptide GHRP-6, résultant en la synthèse d'une banque de dix azapeptides, pouvait être effectué sans faire appel à la synthèse laborieuse de monomères en solution. De plus, nous avons pu incorporer des fonctionnalités qui auraient été plus difficilement incorporées par d'autres voies synthétiques, telles que les chaînes latérales allyl et propargyl.

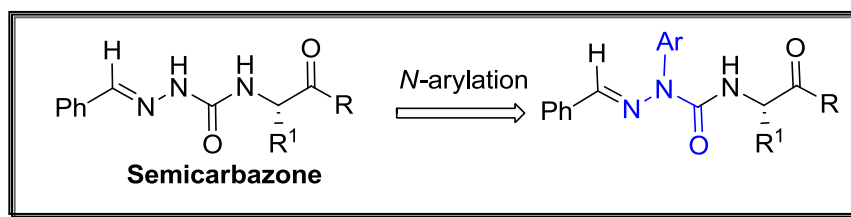
3.5 Conclusion et perspective

Le développement d'une méthodologie pour la synthèse parallèle d'azapeptides, faisant appel à la diversification d'une sous-unité semicarbazone liée sur support solide, a permis la synthèse rapide de dix nouveaux dérivés azapeptides possédant des chaînes

latérales naturelles et non-naturelles aux positions D-Trp²-Ala³-Trp⁴ de l'hexapeptide GHRP-6. Grâce à l'efficacité de cette approche, l'étape limitante lors des études SAR des azapeptides obtenus réside à présent au niveau des tests d'affinité des récepteurs GHS-R1a et CD36. La diversité au niveau des chaînes latérales de l'acide aminé « aza » est dictée par la banque d'électrophiles disponibles commercialement, ce qui augmente considérablement l'étendue de la voie synthétique mise au point par rapport aux méthodes antérieures. Par exemple, la réactivité d'un résidu aza-propargylglycine à la position Trp⁴ du GHRP-6, obtenu par le biais de cette nouvelle méthodologie, sera explorée aux chapitres 5 et 6 afin de créer des « librairies de librairies ».

Malgré les nettes améliorations apportées au processus de synthèse d'azapeptides, il existe encore des aspects à perfectionner. Par exemple, la méthodologie n'a pas encore fait ses preuves auprès de la synthèse peptidique automatisée. Pour ce faire, il faudrait parvenir à isoler l'intermédiaire activé de l'hydrazone, ou son équivalent, afin de pouvoir l'utiliser en tant que sous-unité dans le processus de synthèse automatisée. À défaut de pouvoir réaliser cet objectif, l'utilisation de cette méthodologie dans des Macrokan IRORITM devrait idéalement être validée.

Chapitre 4: *N*-arylation régiosélective d'une sous-unité semicarbazone pour la synthèse d'azapeptides possédant des résidus aza-arylglycines



Mise en contexte de l'article 2:

Étant donné notre succès avec l'alkylation chimiosélective d'une sous-unité semicarbazone ancrée sur support solide, nous avons voulu exploiter la réactivité de cette sous-unité envers d'autres types de chimie. En particulier, nous nous sommes intéressés à une réaction de *N*-arylation pour la synthèse de résidus aza-arylglycines qui n'avaient encore jamais été incorporés dans un peptide.

4.1 Importance des résidus arylglycines

Les arylglycines sont des acides aminés non-protéinogéniques prédominants dans la structure de plusieurs antibiotiques, notamment la Vancomycine (**146**) et les antibiotiques β -lactames tels que l'Ampicilline (**147**), l'Amoxicilline (**148**) et la Céphalexine (**149**) (Figure 4.1). De plus, ces motifs ont été employés lors de la synthèse d'agonistes et d'antagonistes de différents sous-types de récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs) (**151**, Figure 4.1).¹¹¹ La phénylglycine (Phg) est également présente en position

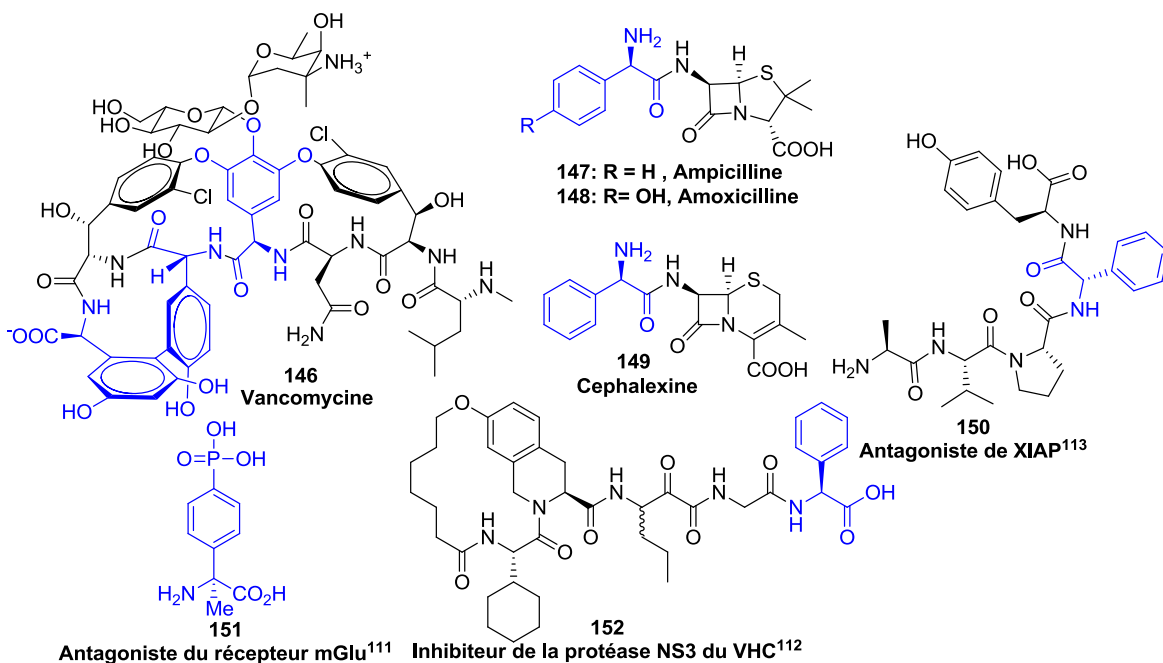


Figure 4.1. Substrats possédant des résidus arylglycines.

C-terminale dans la structure d'un inhibiteur macrocyclique de la protéase NS3 du virus de l'hépatite C (VHC) avec constante d'inhibition d'ordre nanomolaire (**152**, Figure 4.1).¹¹² Enfin, l'incorporation de la phénylglycine à la position Phe⁴ du pentapeptide Ala-Val-Pro-Phe-Tyr a fourni un des meilleurs antagonistes de la protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X (XIAP) (**150**, Figure 4.1).¹¹³

Malgré les efforts considérables vers le développement de méthodes asymétriques de synthèse d'arylglycines,¹¹⁴ il existe relativement peu d'exemples incorporant ces résidus dans des séquences peptidiques bioactives, en raison de leur potentiel de racémisation élevé. Par exemple, il a été démontré que la phénylglycine épimérise 30 fois plus rapidement que la phénylalanine et 60 fois plus rapidement que l'alanine, grâce à la capacité de stabilisation par résonance de l'anion formé après abstraction du proton.¹¹⁵ Des efforts récents sur l'optimisation d'une méthodologie assistée par micro-ondes afin de réduire le degré d'épimérisation lors de l'incorporation et la déprotection de la Phg ont démontré une réduction de la racémisation de 20% (29% vs 49%). Cette diminution a été accomplie en utilisant le tétrafluoroborate de 4-(4,6-diméthoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-méthylmorpholinium (DMTMM-BF₄) comme agent de couplage et la *N*-méthyl morpholine (NMM) comme base, suivi de 20% de piperidine dans le DMF pour la déprotection du groupement protecteur Fmoc sous conditions micro-ondes à 50°C.¹¹⁶ Malheureusement, la racémisation du résidu Phg n'a pas pu être éliminée complètement.

La substitution du carbone α chiral par un atome d'azote lors de la synthèse de résidus aza-arylglycine éliminerait le problème d'épimérisation tout en offrant la possibilité d'induire un repliement β dans un peptide. Notre objectif principal était donc de trouver des conditions optimales pour la *N*-arylation chimiosélective d'une sous-unité semicarbazone en présence d'une multitude de fonctionnalités amides pour la synthèse de mimes peptidiques du GHRP-6. Plus spécifiquement, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'analogues du GHRP-6 possédant des résidus aza-arylglycines aux positions D-Trp² et Trp⁴, en s'inspirant de nos récentes études SAR (Chapitre 2). À la lumière de ces résultats,

nous avons cherché à combler une lacune plutôt évidente, soit l'absence d'azapeptides stables avec chaînes latérales indolyle pour mimer les résidus tryptophanes.

4.2 Précédents de la littérature

4.2.1 Arylation de glycines protégées

Une stratégie conceptuellement similaire pour la synthèse de peptides possédant des dérivés arylglycines a été décrite en 2009, où l'activation C-H chimiosélective du carbone α d'un résidu *N*-*p*-méthoxyphényl (PMP) glycine a été accomplie en présence de bromure de cuivre et d'hydroperoxyde de *tert*-butyle (TBHP) (Figure 4.2).¹¹⁷ Le groupement PMP s'est avéré essentiel au couplage oxydatif, alors qu'aucune réactivité n'a été observée lorsque l'azote en *N*-terminale était protégé par un groupement *tert*-butyle carbamate (Boc), benzyle (Bn) ou tosyle (Ts).

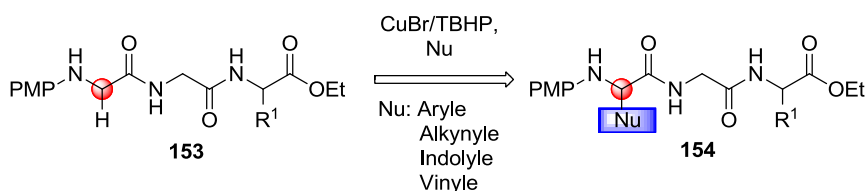


Figure 4.2. Fonctionnalisation C-H d'une glycine en *N*-terminale d'un tripeptide.

Cette chimie, faisant appel à des conditions douces, a été effectuée sur des esters de di- et tripeptides composés de sous-unités de glycine, alanine et leucine sans racémisation détectable. Le groupement PMP a ensuite pu être clivé avec de l'acide trichloroisocyanurique (TCCA) permettant l'élargissement subséquent du peptide. Par contre, malgré la diversité des chaînes latérales qui ont pu être incorporées en solution, cette méthodologie n'a pas été adaptée pour le processus de synthèse peptidique sur support solide. Il n'existe donc toujours pas de méthode permettant l'incorporation systématique de résidus arylglycines sur support solide comme outil pour faciliter des études SAR d'un

peptide biologiquement actif. Afin de s'adresser à cette même lacune au niveau des azapeptides, nous avons cherché à identifier des conditions pour la *N*-arylation d'une sous-unité semicarbazone.

4.2.2 *N*-arylation de carbazates et de *N*-acyles hydrazines

La réaction de couplage Buchwald-Hartwig permet la formation de liens carbone-hétéroatome entre un halogénure d'aryle et une variété d'amines sous catalyse au palladium.¹¹⁸ Cependant, un survol de la littérature a rapidement révélé l'absence de publications décrivant des conditions réactionnelles pour la *N*-arylation de semicarbazones. Malgré cela, quelques exemples de *N*-arylations et de *N*-alkenylations de carbazates et de *N*-acyles hydrazines ont pu être détectés (Schéma 4.1).^{119,120,121,122,123} Dans de tels systèmes, un problème de régiosélectivité apparente s'impose, où deux atomes d'azote peuvent théoriquement être arylés. Effectivement, lors de la *N*-arylation du *N*-Boc-hydrazine en présence d'iodure de cuivre, de 1,10-phénanthroline et de carbonate de césium, il a été démontré que la régiosélectivité de la réaction dépendait de la nature de l'iodure d'aryle utilisé, où les iodures d'aryles avec substitution en *ortho* avaient une régiosélectivité inverse (azote terminal) à celles substitués en *para* ou en *mé*ta (azote interne).¹¹⁹ Certains exemples décrivent néanmoins des réactions de *N*-arylation et *N*-alkenylation régiosélectives de *N*-acyl hydrazines (Schéma 4.1). Par exemple, dans une réaction de type Ullmann (Schéma 4.1a-b), le substrat *N*-Boc-hydrazine a pu être arylé régiosélectivement sur l'azote interne en alpha du groupement Boc.^{120,121} De façon similaire, le *tert*-butylcarbazate a subi une *N*-alkenylation catalysée au palladium régiosélective au niveau du *N*H₂Boc (Schéma 4.1c).¹²² Alternativement, la *N*-arylation de l'azote terminal de l'hydrazide benzoïque a été accomplie en présence de palladium, d'un ligand de type Josiphos, de bicarbonate de sodium et d'iodures d'aryles (Schéma 4.1d).¹²³ Le même type de réactivité a été observé par catalyse au cuivre (Schéma 4.1e).¹²¹

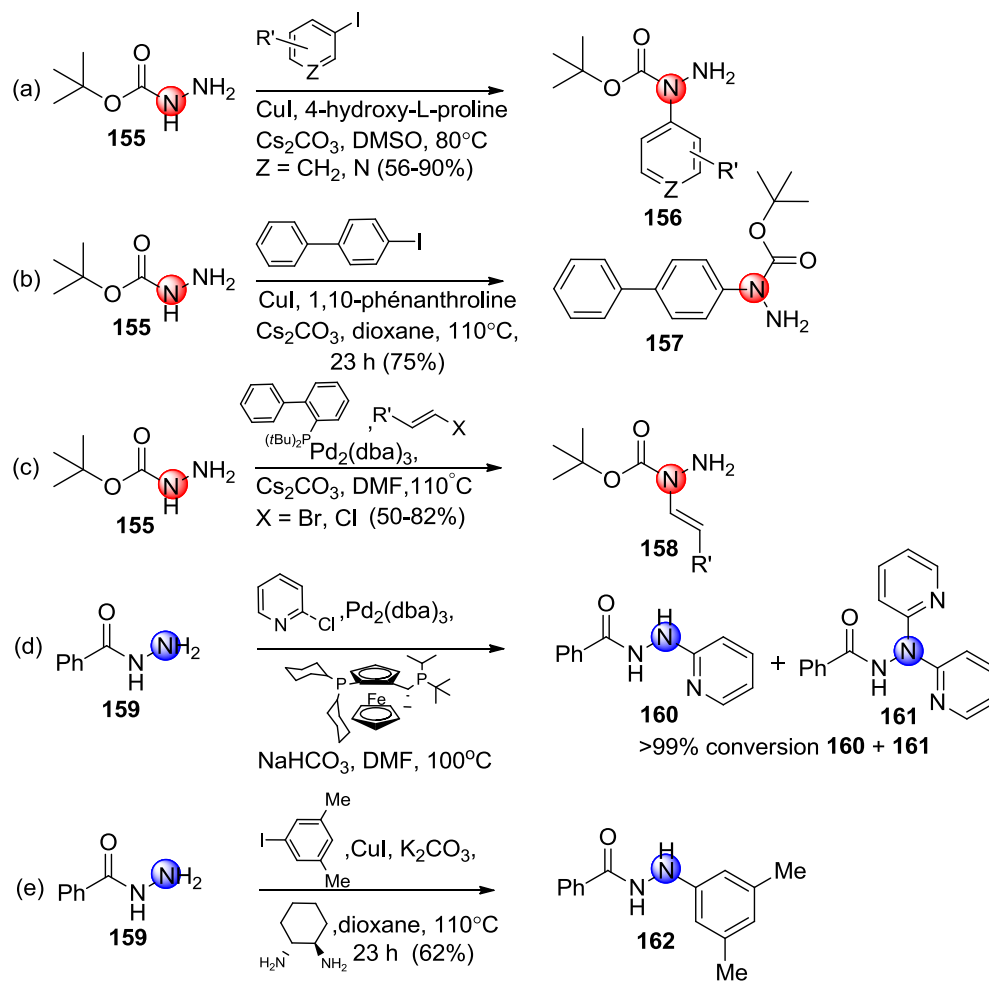


Schéma 4.1. Exemples de *N*-arylations et *N*-alkenylations régiosélectives de *N*-acyles hydrazines.

Malgré le nombre limité d'exemples dans la littérature, la régiosélectivité de la réaction semble être dictée par la nature du substituant sur l'hydrazine (facteur électronique, acidité des protons NH) et, dans certains cas, la position des substituants sur l'iodure d'aryle (facteur stérique). Ainsi, lorsque le substrat est le *N*-Boc-hydrazine et que l'iodure d'aryle est substitué en *para* ou *mé*ta, l'arylation semble avoir lieu sur l'azote interne alors que lorsque le substrat est l'hydrazide benzoïque, l'arylation a lieu sur l'azote terminal. Dans ce cas, un sous-produit provenant d'une bis-arylation sur l'azote terminal est

parfois observé. L'utilisation d'une semicarbazone pourrait éviter à la fois la formation de sous-produits diarylés et le problème de régiosélectivité en protégeant l'azote terminal sous forme d'hydrazone.

4.2.3 *N*-arylation de *N*-Boc hydrazones

Par analogie avec notre système, un seul exemple a été trouvé décrivant la *N*-arylation de *N*-Boc-hydrazone, masquant ainsi un des deux atomes d'azotes de l'hydrazine (**163**, Schéma 4.2).¹²⁴ Les conditions réactionnelles développées utilisent des organobismuthanes comme sources d'aryles ainsi que du cuivre en quantité stoechiométrique, ce qui n'est pas idéal.

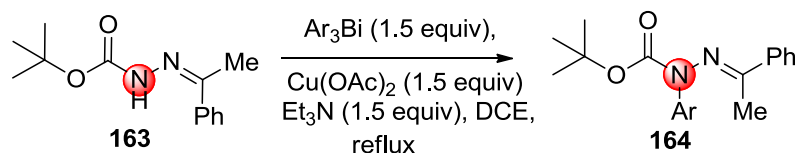


Schéma 4.2. *N*-arylation de *N*-Boc-hydrazone catalysée au cuivre.

Malgré le fait que ce système soit plus semblable à notre semicarbazone comparativement aux *N*-acyles hydrazines discutées ci-haut, les hydrazones protégés par un groupement carbamate (Boc) demeurent tout de même des exemples considérablement différents de la semicarbazone, où au moins trois atomes d'azote sont présents.

De toute évidence, l'adaptation de cette chimie à un système encore plus complexe, telle qu'une semicarbazone liée à un peptide ancré sur support solide, présente de nombreux défis tant aux niveaux de la réactivité que de la chimiosélectivité. Nous devons, entre autres, tenir compte de la réaction de Goldberg qui rend possible la *N*-arylation d'amides catalysée au cuivre.¹²⁵ En plus des défis de synthèse que l'on puisse rencontrer en solution lors de la *N*-arylation de semicarbazones, nous avons opté pour l'optimisation de cette réaction directement sur support solide, ce qui représente un défi additionnel.

4.2.4 Exemples d'arylations sur support solide

Lors d'une étude visant à développer des conditions pour effectuer une *N*-arylation de sulfonamide sur support solide, une série de substrats possédant différentes fonctionnalités (sulfonamide, carbamate, benzamide, urée) ont été soumis aux mêmes conditions réactionnelles.¹²⁶ En utilisant 2 équivalents d'acétate de cuivre, 4 équivalents de 4-MePhB(OH)₂ et de triéthylamine (TEA) dans le THF en présence de tamis moléculaire 4Å en poudre, seul le groupement sulfonamide a réagi pour donner le produit désiré (Schéma 4.3).¹²⁶

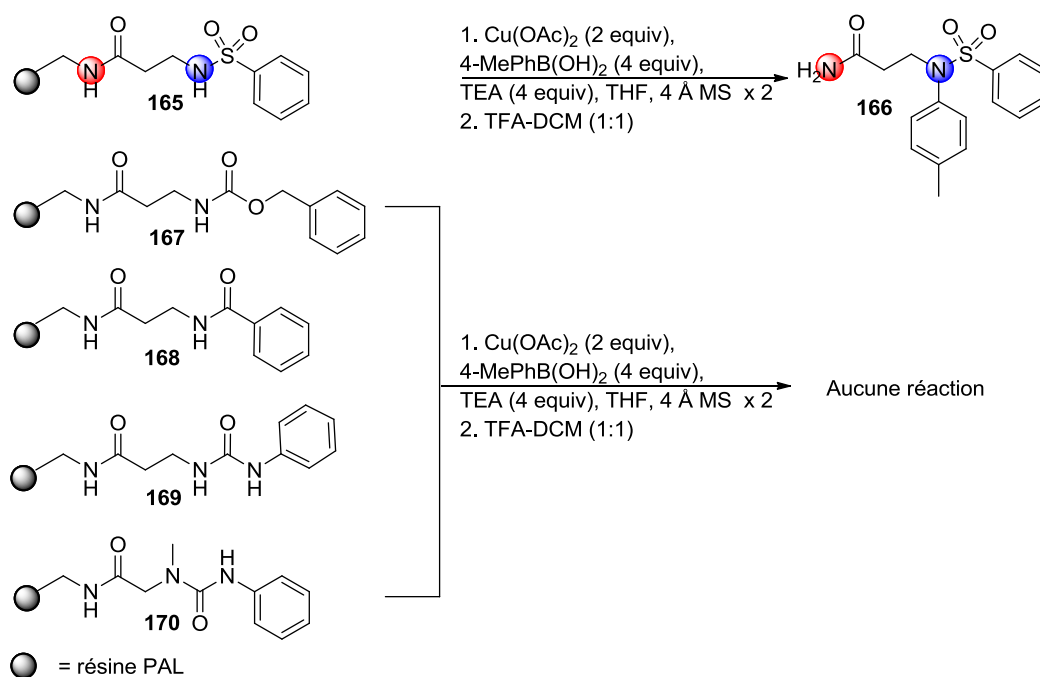


Schéma 4.3. Essais vers la *N*-arylation sur support solide catalysée au cuivre de diverses fonctionnalités.

L'ajout de tamis moléculaire en poudre s'est avéré essentiel pour la conversion complète du substrat en produit désiré, avec une conversion de seulement 33% en absence de tamis moléculaire.¹²⁶

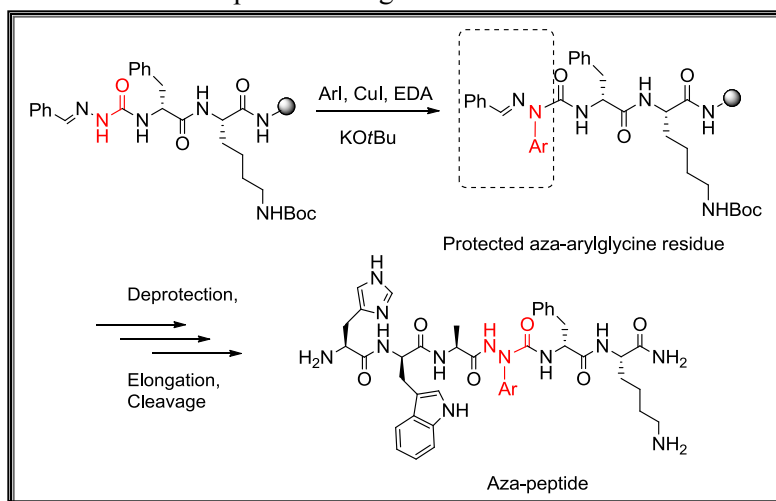
Ces résultats illustrent bien la réactivité différentielle d'une variété de fonctionnalités vis-à-vis les mêmes conditions réactionnelles. L'absence de réactivité pour le benzamide et le carbamate de benzyle suggère que des liaisons peptidiques et des liens carbamates des groupements protecteurs de la lysine et des résidus tryptophanes (Boc) pourraient potentiellement demeurer inertes lors de la *N*-arylation de la semicarbazone. D'autres exemples un peu moins rapprochés à notre système décrivent la *N*-arylation sur support solide de divers hétérocycles, notamment la *N*-arylation d'indoles,¹²⁷ de 2(1*H*)-pyrazinones,¹²⁸ et de pipérazines.¹²⁹

Avec ces informations en main comme point de départ, nous avons tenté d'atteindre notre objectif de démontrer pour la première fois la *N*-arylation chimiosélective d'une semicarbazone ancrée sur support solide pour la synthèse de mimes peptidiques du GHRP-6. L'article 2 décrit les résultats obtenus.

Article 2:

Proulx, C.; Lubell, W. D. Copper-Catalyzed *N*-Arylation of Semicarbazones for the Synthesis of Aza-Arylglycine-Containing Aza-Peptides. *Org. Lett.* **2010**, *12*(13), 2916-2919.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ol100932m>



Copper-Catalyzed *N*-Arylation of Semicarbazones for the Synthesis of Aza-Arylglycine-Containing Aza-peptides

*Caroline Proulx and William D. Lubell**

Département de Chimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville,
Montréal, Québec H3C 3J7

Abstract

Parallel synthesis of 13 aza-arylglycine peptides, based on the hexapeptide sequence of Growth Hormone Releasing Peptide-6 (GHRP-6), was accomplished via selective *N*-arylation of a semicarbazone peptide building-block anchored on Rink amide resin. Aza-peptides possessing aza-indolyglycine and aza-imidazolylglycine residues were obtained through use of the corresponding heteroaryl iodides, yielding, respectively, aza-Trp and aza-His peptidomimics. CD spectroscopy indicated the propensity for aza-peptides, containing aza-arylglycines at the Trp⁴ position of the GHRP-6 sequence, to adopt β turns.

Substituted hydrazines constitute important synthetic building blocks employed, namely, as precursors of a wide variety of medicinally relevant heterocycles such as pyrazolidines,¹ pyrazoles,² 1,3,4-triazoles,³ as well as 1,3,4-oxa- and thiazoles.⁴ Furthermore, they are key components of aza-peptides, a type of peptidomimetic in which the α -carbon of one or more amino acid residues has been substituted by a nitrogen atom.⁵ In aza-peptides, the replacement of C α by nitrogen may confer enhanced stability,⁶ resistance to proteases,⁷ and conformational rigidity, such that β -turn conformers have been observed by X-ray crystallography, NMR spectroscopy, and computational analysis.⁸

In spite of the importance of substituted hydrazines, the inherent difficulty in distinguishing their two available nitrogen atoms has often led to the extensive use of protective groups for their regioselective assembly.⁹ In exploring the combinatorial synthesis of aza-peptides on solid support, we have recently described a three-step procedure exploiting the use of a semicarbazone moiety to achieve selective alkylation and

incorporation of hydrazine moieties in peptides.¹⁰ We now report a method for selective *N*-arylation of the semicarbazone moiety in the presence of the multiple amide and carbamate nitrogen within the aza-peptide by employing copper catalysis. This novel chemistry constitutes the gateway for the rapid synthesis of aza-arylglycine moieties, whose arylglycine counterparts have long sparked interest due to their nature as non-proteogenic α -amino acids found in β -lactam¹¹ and peptide antibiotics,¹² such as ampicillin and vancomycin. Furthermore, inherent issues of racemization that plague the use of arylglycines¹³ are alleviated by employing their aza-amino acid counterparts.

Our interest in aza-arylglycine peptide synthesis stems from the desire to replace tryptophan (Trp) with aza-residues bearing indolyl moieties in peptidomimetics of the hexapeptide Growth Hormone Releasing Peptide-6 (GHRP-6, His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂), a lead for developing novel antiangiogenic compounds.¹⁰ Although incorporation of an aza-Phe residue at the Trp⁴ position conferred selectivity for the CD36 receptor as compared to the native sequence,¹⁰ attempts to prepare aza-Trp peptide met with loss of the indolylmethyl moiety giving the aza-Gly counterpart after acidic cleavage with TFA (Figure 1).¹⁴ Pursuing aza-indolylglycine as a stable aza-Trp surrogate, we have conceived a general method for making aza-arylglycine peptide analogs, featuring *N*-arylation of a resin-bound aza-glycine peptide with a variety of aryl and heteroaryl iodides using CuI, ethylene diamine (EDA), and potassium *tert*-butoxide in dioxane.¹⁵ To the best of our knowledge, this method constitutes the first example of selective semicarbazone monoarylation. Moreover, use of *N*-Boc-3-iodoindole¹⁶ and *N*-trityl-4-iodoimidazole¹⁷ in Cu-catalyzed C-N bond formation gave access to unprecedented aza-Trp and aza-His mimics. Conditions for *N*-arylation were initially screened using semicarbazone **3** anchored on Rink amide resin (Scheme 1).

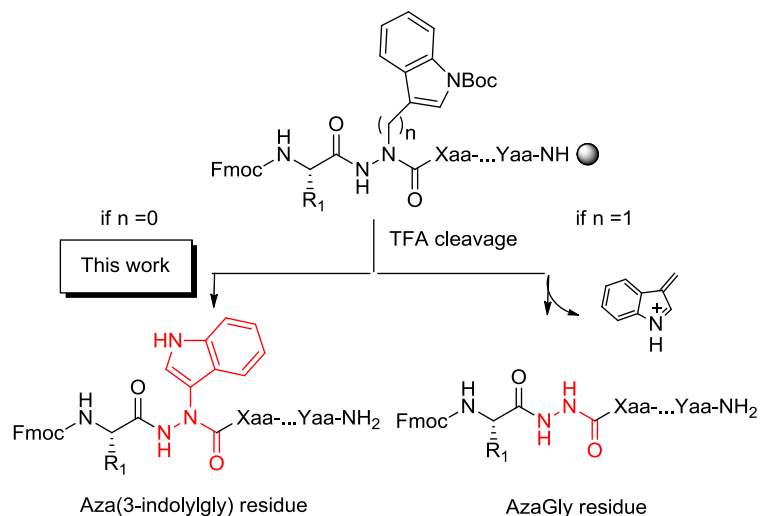









Figure 1. Synthesis aza-peptide bearing indolyl moieties.

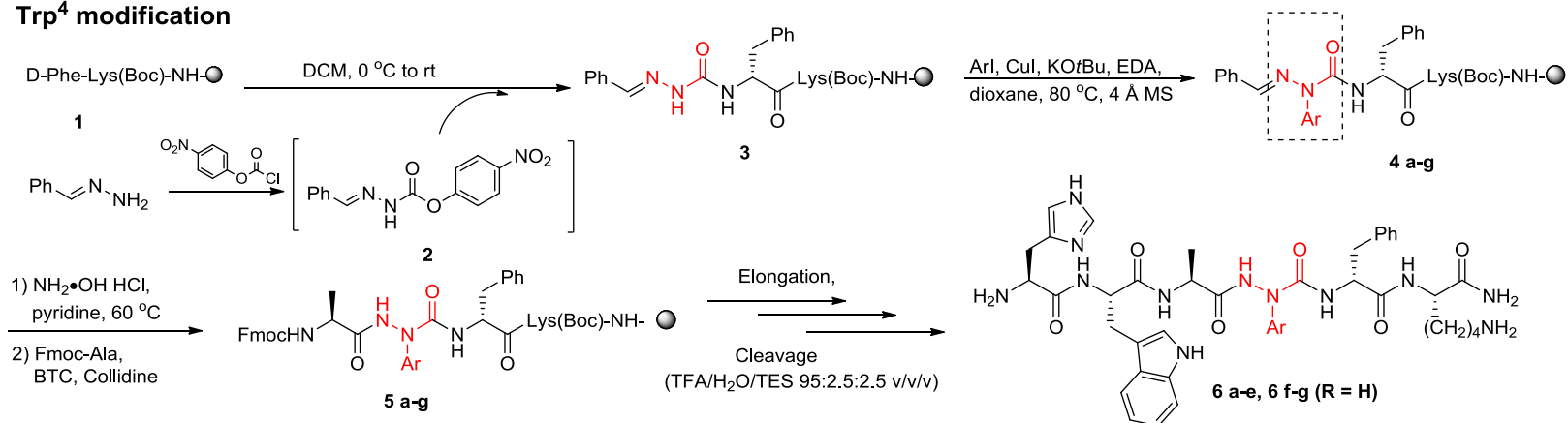
Among the different combinations of bases, copper salts, ligands, and solvents tested (see supporting information), the best results were achieved using a 5-fold excess of CuI, KO t Bu, EDA, and ArI in dioxane in the presence of 4 Å powdered molecular sieves for 24 h. Under these conditions, *N*-arylation of the semicarbazone at the Trp⁴ position of the GHRP-6 sequence proceeded with conversions between 52 to 94% (Table 1).

Table 1. *N*-arylation at residue positions 2 and 4 of GHRP-6.

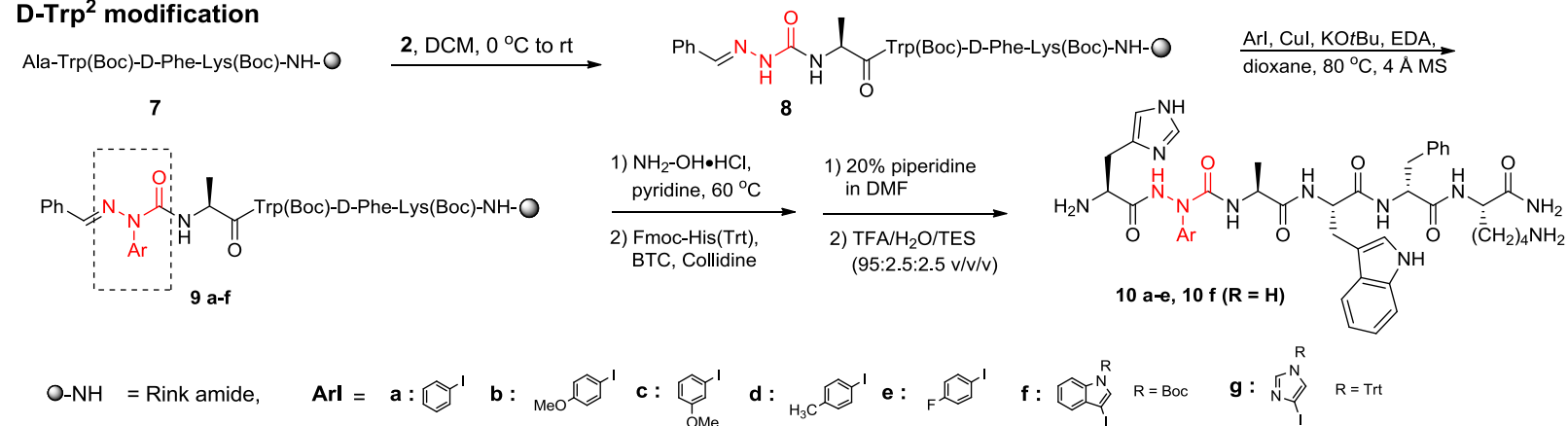
entry	ArI	LCMS conversions at 214 nm	
		Trp ⁴ modification	D-Trp ² modification
1		52	39
2		56	27
3		94	57
4		92	39
5		89	23
6		77	10
7		67	N/A

Scheme 1. Synthesis of [aza-aryl]glycine] GHRP-6 analogs.

Trp⁴ modification



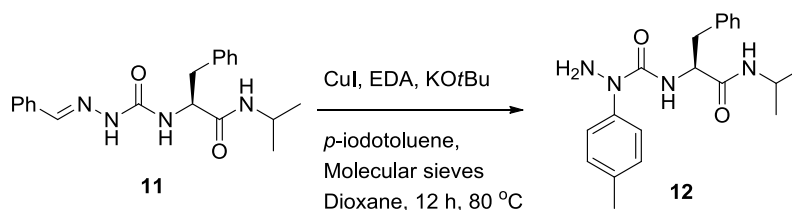
D-Trp² modification



In all cases, LCMS analysis indicated complete consumption of starting material with formation of byproduct. It is noteworthy that arylation using the same conditions, yet further along the peptide sequence, afforded Trp² analogs in lower conversions, suggesting that arylation may be impeded by the peptide adopting secondary structure on solid support. In spite of lower conversions in the arylation at the 2-position, six GHRP-6 analogs (**10a-f**, R = H) could be obtained in suitable yield and purity after completion of the peptide sequence, cleavage, and HPLC purification (Table 2).

To gain additional insight into the arylation reaction, benzylidene aza-glycinyphenylalaninyl isopropyl amide **11** (Scheme 2) was prepared and examined as a model in the solution-phase *N*-arylation, which occurred with concurrent hydrazone deprotection to afford aza-toluylglycine dipeptide amide **12** as a single product, albeit in a 20% yield. Hydrazone removal may occur as a result of nucleophilic attack by ethylene diamine. By comparison, deprotection of arylated material was also observed as a minor product peak in the LCMS analysis of material cleaved from the solid support.

Scheme 2. Solution-Phase *N*-arylation of Aza-Glycinyphenylalanine Isopropylamide



On solid support, completion of the peptide sequence necessitated scavenging of copper by shaking the resin with a 3:1 DMF: 0.1 N HCl mixture overnight.¹⁸ Chemoselective deprotection of the hydrazone was achieved using $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ in pyridine.¹⁰ The remaining sequences were completed according to general methods for peptide synthesis¹⁹ to afford [aza-arylglycine] GHRP-6 analogs with crude purities ranging from 7 to 65% (Table 2). Material of $\geq 91\%$ purity was subsequently isolated by reverse-phase HPLC and used in circular dichroism (CD) spectroscopic studies (Figure 2) for

assessing the conformational effects of the aza-arylglycine moiety on peptide conformation.

Affinity for the CD36 receptor is under investigation and will be reported in due time.

Table 2. Yields and Purities of Aza-Arylglycine-Containing GHRP-6 analogues **10a-f** and **6a-g**.

peptide	crude purity ^a (%)	purity ^b (%)		yield (%)	HRMS [M+H] ⁺ or [M+Na] ⁺ ions	
		MeOH	MeCN		m/z	
					(calcd)	(obsd)
10a His-Aza(phenylgly)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	23	>99	>99	2.0	821.4205	821.4204
10b His-Aza(<i>m</i> -methoxyphenylgly)-Ala-Trp- D-Phe-Lys-NH ₂	22	>99	>99	1.2	851.4311	851.4296
10c His-Aza(<i>p</i> -methoxyphenylgly)-Ala-Trp- D-Phe-Lys-NH ₂	34	>99	>99	1.4	851.4311	851.4300
10d His-Aza(<i>p</i> -toluylgly)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	16	>99	>99	1.2	835.4362	835.4358
10e His-Aza(<i>p</i> -fluorophenylgly)-Ala-Trp- D-Phe-Lys-NH ₂	7	>99	>99	1.4	839.4111	839.4105
10f His-Aza(3-indolylgly)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	9	91	92	0.8	882.4134	882.4121
6a His- D-Trp-Ala-Aza(phenylgly)-D-Phe-Lys-NH ₂	65	>99	>99	1.0	821.4205	821.4217
6b His- D-Trp-Ala-Aza(<i>m</i> -methoxyphenylgly)- D-Phe-Lys-NH ₂	22	>99	>99 ^d	1.0	851.4311	851.4293
6c His- D-Trp-Ala-Aza(<i>p</i> -methoxyphenylgly)- D-Phe-Lys-NH ₂	23	>99	>99	1.2	851.4311	851.4307
6d His- D-Trp-Ala-Aza(<i>p</i> -toluylgly)-D-Phe-Lys-NH ₂	45	92	>99	3.4	835.4362	835.4352
6e His- D-Trp-Ala-Aza(<i>p</i> -fluorophenylgly)- D-Phe-Lys-NH ₂	28	>99 ^d	>99 ^d	2.8	839.4111	839.4106
6f His- D-Trp-Ala-Aza(3-indolylgly)- D-Phe-Lys-NH ₂	27	>99	>99	1.6	860.4314	860.4321
6g His- D-Trp-Ala-Aza(5-imidazolylgly)- D-Phe-Lys-NH ₂	65	96	>99	1.6	811.4110	811.4080

- RP-HPLC purity at 214 nm of the crude peptide in MeOH/H₂O eluant containing 0.1% formic acid.
- RP-HPLC purity at 214 nm of the purified peptide in MeOH/H₂O and MeCN/H₂O eluant containing 0.1% formic acid.
- Yields after purification by RP-HPLC are based on resin loading.
- Azapeptide was isolated as a mixture of His epimers.

In the CD spectra in water, native GHRP-6 and aza-peptide analogues **10a-f** (R = H), in which D-Trp² was replaced by the aza-arylglycine moiety, all displayed CD signatures characteristic of a random coil, exhibiting a minimum around 190 nm. Conversely, CD signatures of [aza-arylgly⁴]-GHRP-6 analogues **6a-g** (R = H) displayed distinctive minima at 230 and 190 nm, and a maximum at 215 nm, suggestive of a β -turn conformation.

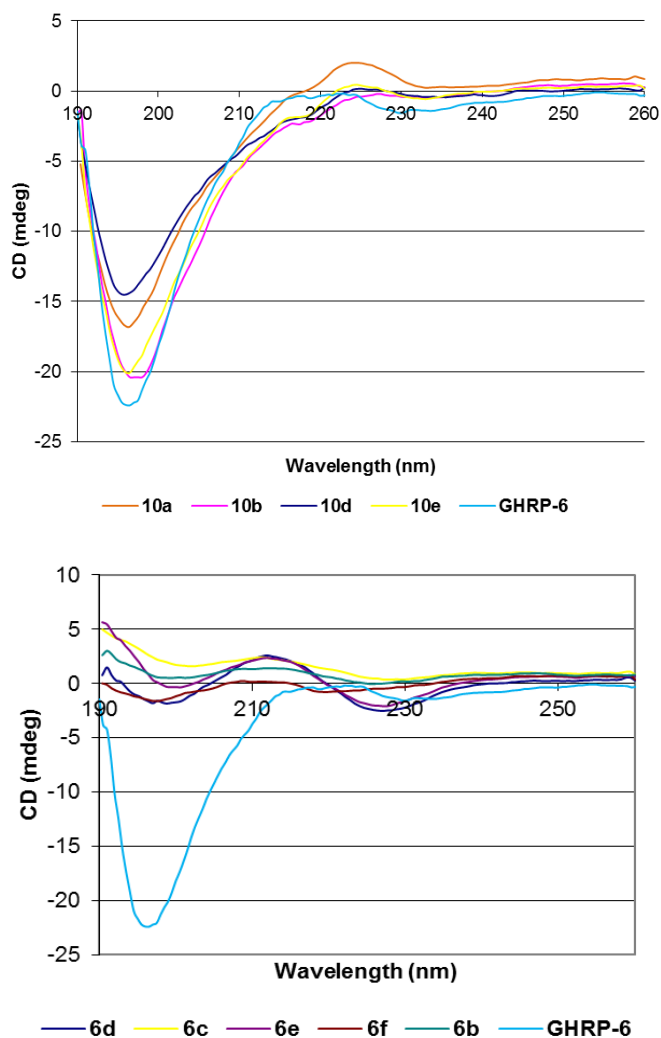


Figure 2. Circular dichroism spectra of GHRP-6 (light blue), [aza-arylgly²]- (upper) and [aza-arylgly⁴]-GHRP-6 analogues (lower) in water.

A novel solid-phase methodology featuring the copper-catalyzed *N*-arylation of a semicarbazone has furnished 13 aza-arylglycine GHRP-6 analogues. Employing heteroaryl iodides, aza-peptides bearing indole and imidazole side-chains were synthesized as aza-Trp and aza-His surrogates. Replacement of Trp⁴ with aza-arylglycine residues in the GHRP-6 sequence induced a β -turn conformation in water as indicated by circular dichroism spectroscopy. Their effective synthesis and the conformational bias of the aza-arylglycine residues make this methodology particularly attractive for studying structure-activity relationships of biologically active peptides.

Acknowledgment This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT). CP is grateful to NSERC and Boehringer Ingelheim for graduate student fellowships. The authors thank Dr. A. Fürtös, K. Venne, and M-C. Tang (Université de Montréal) for assistance with mass spectrometry, and Dr. David Sabatino (Université de Montréal) for help with CD spectroscopy.

Supporting Information Available Experimental procedures and characterization data.

References

- 1 For a selected example, see Ahn, J. H.; Kim, J. A.; Kim, H-M.; Kwon, H-M.; Huh, H-C.; Rhee, S. D.; Kim, K. R.; Yang, S-D.; Park, S-D.; Lee, J. M.; Kim, S. S.; Cheon, H. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1337.
- 2 Deng, X.; Mani, N. S. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2412 and references within.
- 3 Review of synthesis and pharmacological importance: Al-Masoudi, I. A.; Al-Soud, Y. A.; Al-Salihi, N. J.; Al-Masoudi, N. A. *Chem. Het. Comp.* **2006**, *42*, 1377.
- 4 (a) Taylor, E. C.; Wipf, P. *Oxazoles: Synthesis, Reactions, and Spectroscopy*; John Wiley & Sons: Hoboken, 2003. (b) Lewis, J. R. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 389.

- 5 (a) Gante, J. *Synthesis* **1989**, 405. (b) Huang, Y.; Malcom, B.A.; Vederas, J.C. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 607.
- 6 (a) Gassman, J. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1771. (b) Wipf, P.; Adeyeye, C. M.; Rusnak, J. M.; Lazo, J. S. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1585.
- 7 Dugave, C.; Demange, L. *Lett. Pept. Sci.* **2003**, *10*, 1.
- 8 (a) Reynolds, C. H.; Hormann, R. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9395-9401. (b) Lee, H.-J.; Song, J.-W.; Choi, Y.-S.; Park, H.-M.; Lee, K.-B. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11881-11893. (c) André, F.; Boussard, G.; Bayeul, D.; Didierjean, C.; Aubry, A.; Marraud, M. *J. Peptide Res.* **1997**, *49*, 556-562. (d) André, F.; Vicherat, A.; Boussard, G.; Aubry, A.; Marraud, M. *J. Pept. Res.* **1997**, *50*, 372-381.
- 9 For a review on the synthesis of alkyl substituted hydrazines see: Ragnarsson, U. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 205.
- 10 Sabatino, D.; Proulx, C.; Klocek, S.; Bourguet, C. B.; Boeglin, D.; Ong, H.; Lubell, W. D. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3650.
- 11 Townsend, C. A.; Brown, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 913.
- 12 Williams, D. H.; Waltho, J. P. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 133.
- 13 Smith, G. G.; Sivakua, T. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 627.
- 14 Boeglin, D.; Lubell, W. D. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 864.
- 15 Similar conditions used for arylation of indoles on solid support in Wu, T. Y. H.; Schultz, P. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4033.
- 16 Wiltulski, B.; Buschmann, N.; Bergsträber, U. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8473.
- 17 Cliff, M. D.; Pyne, S. G. *Synthesis* **1994**, 681.
- 18 Xu, W.-M.; Huang, X.; Tang, E. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 726.
- 19 Lubell, W. D.; Blankenship, J. W.; Fridkin, G.; Kaul, R. (2005) "Peptides." *Science of Synthesis* 21.11, Chemistry of Amides. Thieme, Stuttgart, 713.

4.3 Informations supplémentaires à l'article 2 : Études comparatives entre [azaPhe⁴]-GHRP-6, [aza-(phenylgly)⁴]-GHRP-6 et [aza-(3-indolylgly)⁴]-GHRP-6

Depuis la publication de notre article, l'affinité de deux composés possédant des résidus aza-arylglycines à la position Trp⁴ du GHRP-6 pour le récepteur CD36, [aza-(Phenylgly)⁴]-GHRP-6 (**6a**) et [aza-(3-Indolylgly)⁴]-GHRP-6 (**6f**), a été testée dans le laboratoire du Dr Huy Ong, (Tableau 4.1).

Tableau 4.1 Affinités de [aza-(Phenylgly)⁴]-GHRP-6 (**6a**) et [aza-(3-Indolylgly)⁴]-GHRP-6 (**6f**) pour les récepteurs GHS-R1a et CD36.

Composé	CD36 IC ₅₀ (M)
GHRP-6	2.03 x 10 ⁻⁶
[azaPhe ⁴]-GHRP-6	1.34 x 10 ⁻⁶
6a [aza-(Phenylgly) ⁴]-GHRP-6	14.3 x 10 ⁻⁶
6f [aza(3-Indolylgly) ⁴]-GHRP-6	13.4 x 10 ⁻⁶

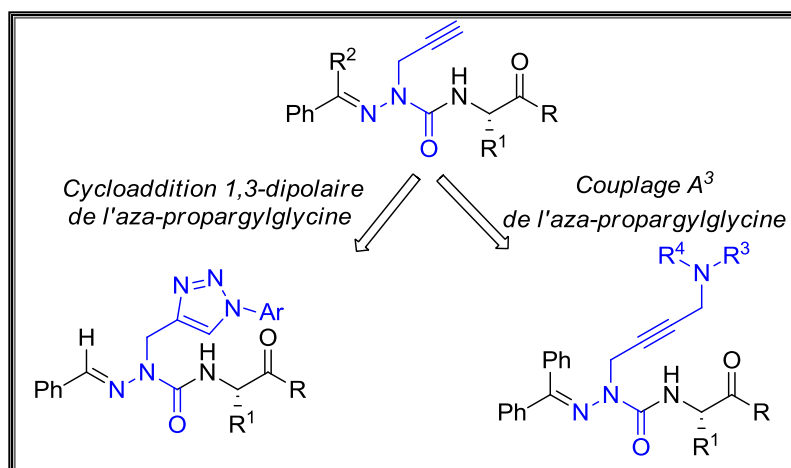
Ces deux mimes peptidiques ont démontré une affinité réduite par un facteur de dix pour le récepteur CD36, en comparaison à [azaPhe⁴]-GHRP-6 et au peptide parent. Bien que le peptide **6f** maintienne dans la chaîne latérale de son acide aminé « aza » la fonctionnalité indole de l'acide aminé tryptophane du peptide parent, la flexibilité de l'indolyl est réduite par l'absence du groupement méthylène. En effet, en raison de la délocalisation possible du doublet d'électrons libre de l'azote dans le groupement aryle, la configuration de l'azote pourrait être déviée de pyramidale à planaire, ce qui pourrait engendrer des changements de conformation. L'emplacement de la chaîne latérale dans la pochette du récepteur est nécessairement affecté, dans ce cas de façon détrimentale. Alternativement, la baisse d'affinité pour le récepteur CD36 pourrait également être causée par un changement de conformation global du peptidomimétique.

4.4 **Conclusion et perspectives**

Le développement d'une méthodologie permettant la *N*-arylation chimiosélective d'une semicarbazone liée à un peptide ancré sur support solide a permis la synthèse de treize dérivés [aza-arylglycine² et aza-arylglycine⁴]-GHRP-6. L'approche développée constitue le premier exemple de (1) *N*-arylation d'une semicarbazone, à la fois en solution et sur support solide, et de (2) balayage d'acides aminés aza-arylglycines pour des études SAR. Parmi les résidus aza-arylglycines incorporés dans le peptide GHRP-6, des mimes d'aza-histidine et d'aza-tryptophane stables ont pu être obtenus. Les deux analogues synthétisés dont l'affinité pour le récepteur CD36 a pu être déterminée, soit [aza-(Phenylgly)⁴]-GHRP-6 et [aza-(3-Indolylgly)⁴]-GHRP-6, ont démontré une baisse d'affinité d'un facteur de dix en comparaison avec GHRP-6.

Il serait intéressant d'entreprendre des études plus détaillées sur l'effet de l'incorporation d'un résidu aza-phénylglycine, en comparaison avec un résidu aza-phénylalanine, sur la conformation d'un peptide. Par exemple, la synthèse d'un aza-térapeptide en solution et l'analyse de sa conformation en solution par RMN pourrait être effectuée. De plus, la cristallisation de l'aza-tripeptide pour analyse par rayons X révélerait la conformation adoptée à l'état solide. À cette fin, il faudrait ré-optimiser nos conditions réactionnelles pour la *N*-arylation d'une semicarbazone en solution.

Chapitre 5: Synthèse de « bibliothèques de bibliothèques » via la fonctionnalisation d'une sous-unité aza-propargylglycine



Dans le chapitre 3, nous avons décrit la *N*-alkylation chimiosélective d'une semicarbazone ancrée sur support solide pour la synthèse de dix azapeptides. Parmi les dérivés aza-GHRP-6 synthétisés, nous avons pu accéder à un résidu aza-propargylglycine via l'alkylation de la semicarbazone avec du bromure de propargyle. Le présent chapitre vise à exploiter la réactivité de l'alcyne nouvellement incorporé dans la chaîne latérale du résidu « aza », afin de créer des « bibliothèques de bibliothèques » d'azapeptides. Il sera divisé en deux parties, incluant la diversification par (1) une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire (Partie A) et (2) une réaction de couplage A³ (amine, aldéhyde, alcyne) (Partie B).

Partie A - Fonctionnalisation d'une sous-unité aza-propargylglycine par une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire

Les études SAR des dérivés aza-GHRP-6, dont nous avons discutées dans le chapitre 2, ont permis d'identifier certains candidats prometteurs pour le développement d'azapeptides sélectifs au récepteur CD36, dont plusieurs possédant des résidus « aza » avec chaînes latérales aromatiques aux positions D-Trp² ou Trp⁴. Suivant le même ordre d'idées présenté dans le chapitre 3, nous avons cherché à synthétiser différents analogues aptes à servir en tant que mimes de l'aza-tryptophane, misant cette fois nos efforts vers la synthèse d'aza-1-aryl, 2,3-triazole-3-alanine (Figure 5.1).

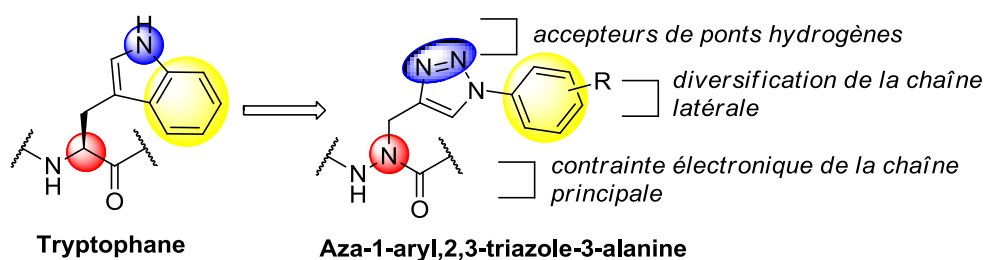


Figure 5.1. Utilisation d'aza-1-aryl,2,3-triazole-3-alanines comme mimes de tryptophanes.

Mise en contexte de l'article 3 :

5.1 La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire

La cycloaddition 1,3-dipolaire, ou cycloaddition de Huisgen, est une réaction de cycloaddition concertée entre un azoture et un alcyne monosubstitué pour donner un mélange 1 : 1 de 1,2,3-triazoles 1,4- et 1,5-disubstitués.¹³⁰ Suite à la découverte de cette réaction, il a été démontré que l'ajout d'une quantité de cuivre catalytique causait non seulement une accélération de 7-8 ordres de magnitude, mais aussi une nouvelle sélectivité pour le régioisomère 1,4-disubstitué.¹³¹ Par la suite, l'utilisation de ruthénium pour catalyser cette réaction a permis d'obtenir le régioisomère opposé, soit un 1,2,3-triazole 1,5-disubstitué.¹³² Ces améliorations en ont fait une réaction de type « click »,¹³³ une terminologie proposée par Barry K. Sharpless en 2001 englobant des réactions hautement stéréospécifiques avec étendues larges et rendements élevés, fournissant des produits stables purifiés par des méthodes simples (recristallisation, distillation).

Grâce à ces propriétés avantageuses, les réactions de cycloadditions azoture-alcyne catalysées au cuivre (CuAAC) et au ruthénium (RuAAC), ainsi que certaines variantes non-catalysées basées sur la libération de tension de cycle de dérivés cyclooctynes, sont désormais utilisées pour une vaste gamme d'applications. Ce type de cyclization 1,3-dipolaire a été utilisé, entre autres, en tant qu'outil de ligation chimiosélective pour la fonctionnalisation de biopolymères (ADN,¹³⁴ polysaccharides,¹³⁵ protéines¹³⁶), de virus,¹³⁷ de bactéries¹³⁸ et de cellules.¹³⁹ La chimie « click » a aussi expédié le processus de découverte de nouveaux médicaments (drug discovery)¹⁴⁰ non seulement en étant un précieux atout pour la chimie combinatoire,¹⁴¹ mais en donnant aussi accès à des isostères non-classiques de liaisons amides,¹⁴² du noyau imidazole de l'histidine¹⁴³ et autres hétérocycles, ainsi que d'acides carboxyliques.¹⁴⁴

5.2 Les triazoles et le peptidomimétisme

En tant que bioisostères, les triazoles ont l'avantage d'être résistants à la dégradation enzymatique et stables sous conditions d'hydrolyse et de réduction/oxydation. Ils possèdent un large moment dipolaire ($\sim 5D$)¹⁴⁵ et offre la possibilité de former des interactions π - π avec d'autres noyaux aromatiques.

5.2.1 Les triazoles comme isostères de liaisons amides

Certains hétérocycles sont utilisés comme bioisostères de liaisons amides, tels que les pyrroles, pyrazoles, tétrazoles et triazoles.¹⁴⁶ La conformation planaire des 1,4- et 1,5-triazoles et la disposition d'un accepteur (N3 ou N2) et d'un donneur de pont hydrogène (lien C(5)-H ou C(4)-H polarisé) de façon analogue à l'oxygène du groupement carbonyle et au NH des liaisons amides en font d'excellents isostères de liens amides (Figure 5.2). De plus, la distance qui sépare les groupements de part et d'autre de la liaison amide est égale ou similaire (+1.1 Å) à celle qui les sépare dans le cas des 1,4 et 1,5-triazoles (Figure 5.2).¹⁴²

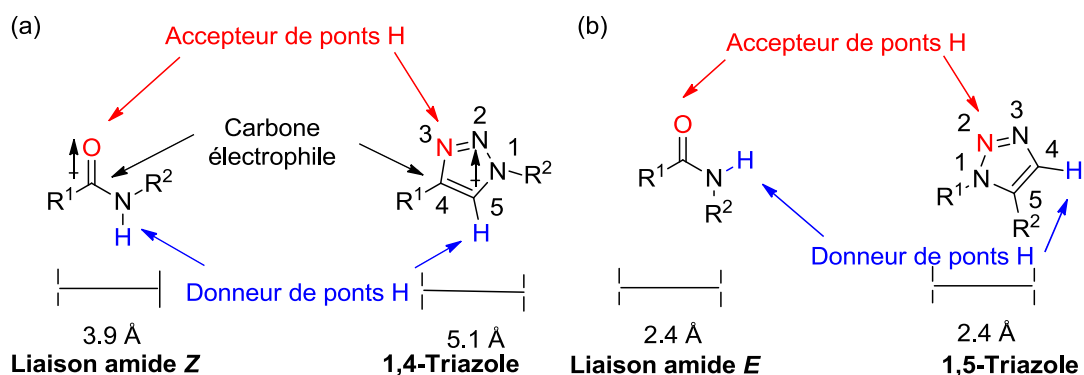


Figure 5.2. Utilisation de triazoles comme isostères non-classiques de liaisons amides *Z* (a) et *E* (b).^{142,147}

Plus précisément, les 1,2,3-triazoles 1,4-disubstitués sont des isostères de liaisons amides *Z* alors que les 1,2,3-triazoles 1,5-disubstitués sont des isostères de liaisons amides *E*. Ces

propriétés en ont fait de bons candidats lors de la conception de mimes peptidiques adoptant la conformation de repliement β , d'hélices α , ou de ruban β . Par exemple, le synthon Asn-1,5-triazole-Ala a été conçu pour mimer le repliement β de type VI induit par les résidus Asn¹¹³-Pro¹¹⁵ de la RNase A (Figure 5.3).¹⁴⁸ L'utilisation de 1,2,3-triazole 1,5-disubstitué élimine l'isomérisation *cis/trans* observée dans les séquences de type Xaa-Pro et fixe les résidus avoisinants dans une conformation en repliement β de type VI.

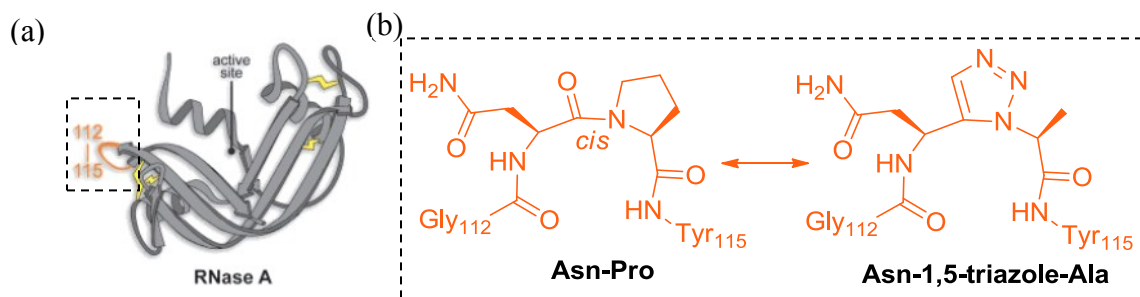


Figure 5.3. (a) RNase A. (b) Repliement β de type VI induit par les résidus Asn¹¹³-Pro¹¹⁵ et stratégie pour mimer la liaison amide *cis* à l'aide d'un 1,2,3-triazole 1,5-disubstitué.¹⁴⁸

Par ailleurs, le concept d'utiliser une réaction 1,3-dipolaire intermoléculaire entre deux fragments peptidiques pour la synthèse convergente de peptidomimétiques a été validé par des groupements espaceurs à trois carbones entre les amides et les fonctionnalités alcynes et azotures des deux synthons peptidiques respectifs, qui se sont avérés optimaux pour la formation d'un repliement β (**175**, Schéma 5.1).¹⁴⁹

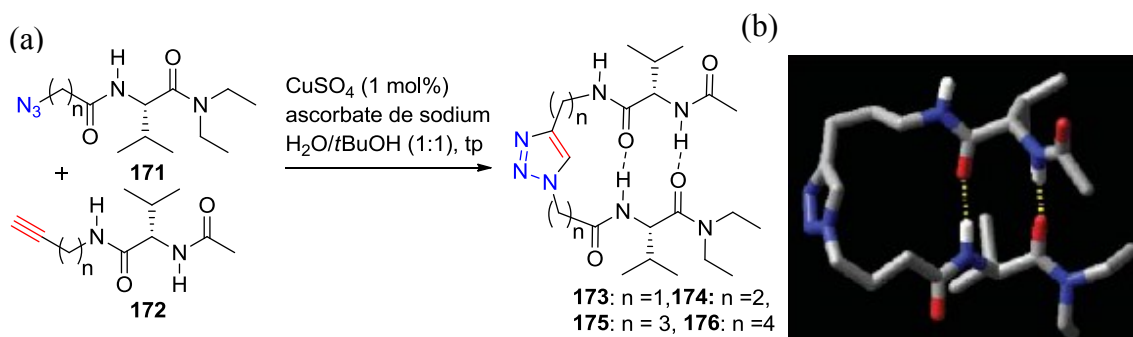


Schéma 5.1. (a) Utilisation de chimie « click » pour la synthèse convergente de mimes peptidiques adoptant une conformation en repliement β . (b) conformation la plus stable

déterminée par modélisation moléculaire. Les lignes pointillées représentent les liaisons hydrogène.

De façon similaire, un squelette 1,4-diphényl-1,2,3-triazole a récemment été synthétisé par une approche convergente pour rigidifier une conformation en ruban β (**179**, Schéma 5.2).¹⁵⁰

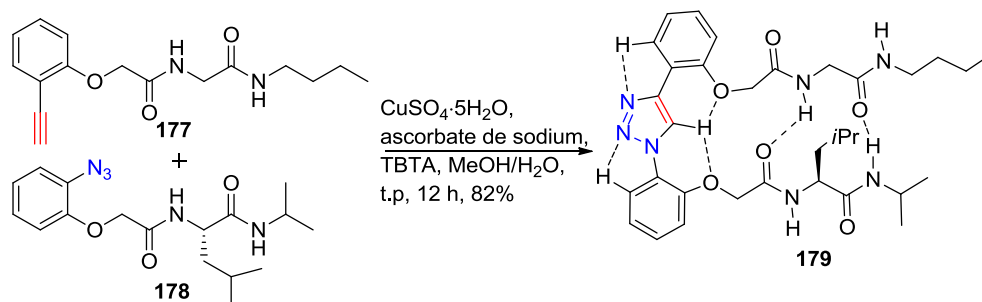


Schéma 5.2. Utilisation de chimie « click » pour la synthèse convergente de mimes peptidiques adoptant une conformation en ruban β . Les lignes pointillées représentent les liaisons hydrogène.

Lorsque ces deux groupements fonctionnels (alcyne et azoture) se retrouvent sur le même peptide linéaire, la cycloaddition [3+2] peut également mener à la formation de peptidomimétiques cycliques.^{151,152,153,154,155,156} Par exemple, un analogue de *cyclo*-[Pro-Tyr-Pro-Val], inhibiteur de tyrosinase isolé de *L. helveticus*,¹⁵⁷ a été synthétisé où la liaison amide entre la valine et la proline a été remplacée par un 1,2,3-triazole 1,4-disubstitué sans affecter l'activité biologique du cyclopeptide parent.^{151a} Dans ce cas, l'utilisation d'une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire pour cycliser le térapeptide s'est avérée beaucoup plus efficace qu'une fermeture de cycle via lactamisation en utilisant des conditions standards de couplage peptidique.^{151a}

Les 1,2,3-triazoles 1,4-disubstitués ont également été incorporés dans des séquences peptidiques adoptant la conformation d'hélice α . À titre d'exemple, la substitution de K₁₅L₁₆ par un acide aminé ϵ avec noyau triazole dans le mutant pLI-GCN4 (Figure 5.4(a)) n'a causé aucune perturbation au niveau de sa structure quaternaire en faisceau torsadé d'hélices α (coiled coils), telle que démontré par cristallographie à rayons X (Figure

5.4(b)).¹⁵⁸ Les données cristallographiques ont pu confirmer que le triazole participe à la formation des ponts hydrogènes normalement observés entre les résidus i et $i + 4$ de l'hélice α , soit avec l'azote N2 agissant comme accepteur de pont hydrogène et C(5)-H agissant comme donneur de pont hydrogène.¹⁵⁸

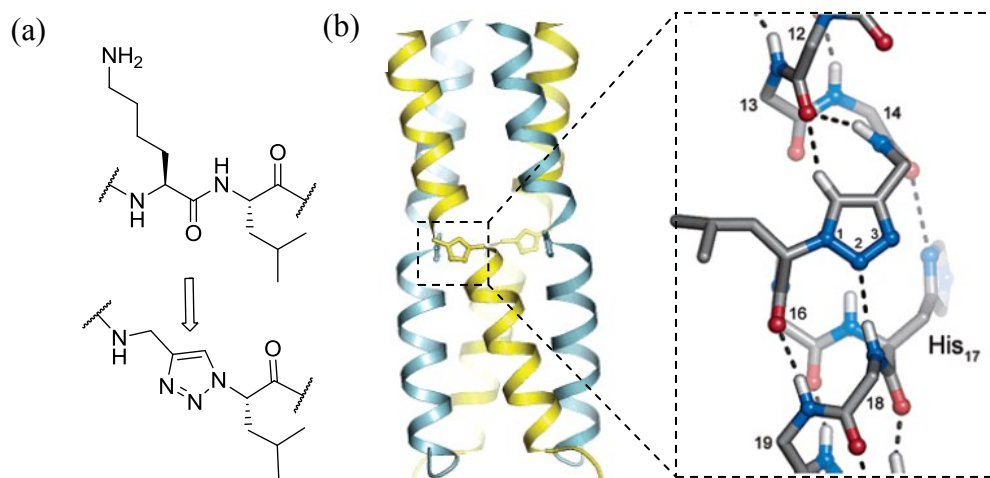


Figure 5.4. (a) substitution K₁₅L₁₆ par un acide aminé ϵ avec noyau triazole. (b) cristallographie à rayons X du faisceau torsadé d'hélices α obtenu avec noyau triazole.

La chimie « click » a également été utilisée comme technique « d'agrafage moléculaire », par analogie avec la technique de fermeture de cycle par métathèse, afin de rigidifier la conformation en hélice α d'un peptide via une liaison covalente entre les chaînes latérales de deux acides aminés.¹⁵⁹

Enfin, l'utilisation d'oligomères de 1,2,3-triazoles 1,4-disubstitués séparés par un carbone avec chaîne latérale a fourni des mimes peptidiques adoptant la conformation de ruban β , une conséquence d'interactions dipôle-dipôle plaçant les noyaux imidazoles en conformation dite « zig-zag » les uns par rapport aux autres (Figure 5.5).¹⁶⁰

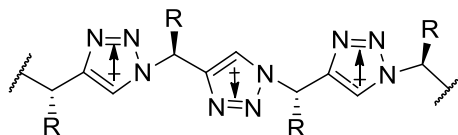


Figure 5.5. Oligomère de triazoles adoptant la conformation de ruban β .

5.2.2 Les triazoles comme isostères d'imidazoles et d'indoles

5.2.2.1 Les triazoles en tant qu'isostères d'imidazoles pour la synthèse d'analogues d'histidine

En plus d'être employés comme isostères de liaisons amides, les triazoles peuvent également agir comme isostères d'imidazoles, en raison de leur ressemblance structurale et électronique.^{131a,143,161,162,163} Par exemple, la synthèse d'analogues d'histidines *N*-substituées a été accomplie via une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre un résidu propargylglycine lié à un peptide ancré sur support solide (**180**) et cinq azotures différents, donnant les triazoles désirés avec des conversions de 75-90% (Schéma 5.3).^{131a}

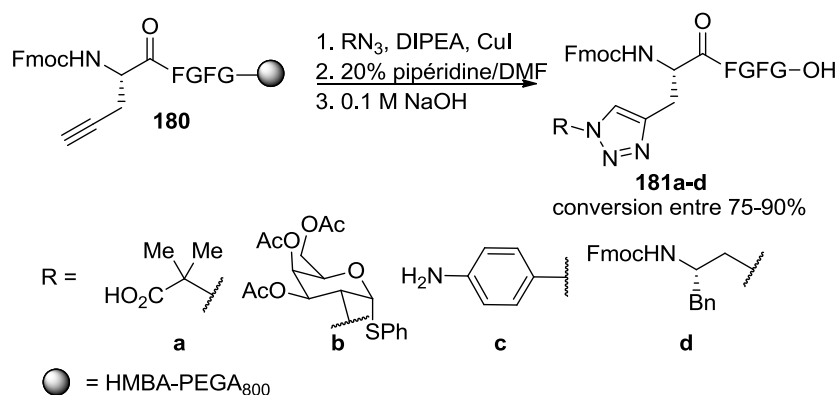


Schéma 5.3. Préparation d'histidines *N*-substituées à partir de la propargylglycine.^{131a}

Une version intramoléculaire a également été utilisée pour générer des amino-triazolodiazepinones (Ata), tel que **185**, en tant que mimes rigidifiés d'histidine (Schéma 5.4).¹⁶⁴ Afin de valider leur utilisation comme mimes d'histidine, **185** a été incorporé aux

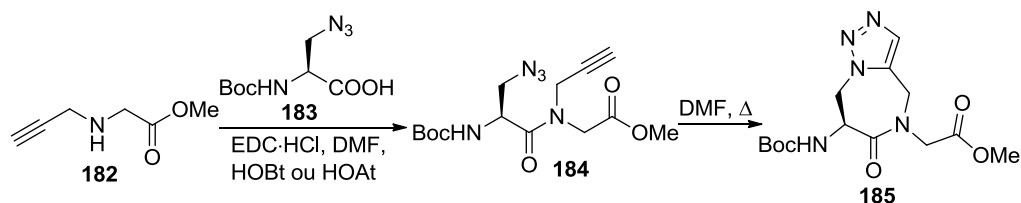


Schéma 5.4. Construction d'amino-triazolodiazepinone (Ata) comme mimes d'histidine.

positions His⁴-Pro⁵ de l'angiotensine IV (Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), générant un peptidomimétique à puissance égale au peptide parent.

De plus, lors d'une étude visant à incorporer différents analogues d'histidines dans des protéines *in vivo*, l'analogue β -(1,2,3-triazol-4-yl)-L-alanine a pu être reconnu par l'His-tARN synthétase de *Escherichia coli* (*E. coli*), contrairement à d'autres mimes proposés, telle que la β -(1,2,3,4-tetrazol-5-yl)-L-alanine.¹⁴³ Ces résultats témoignent de la ressemblance entre les noyaux imidazoles et triazoles, malgré les différences de pKa.¹⁶⁵ Les régioisomères du 1,2,3-triazole (pKa = 9.26) et de l'imidazole (pKa = 14.52) calculés les plus stables placent le groupement NH à la même position (ϕ), un facteur postulé important pour la formation d'un pont hydrogène avec le résidu Glu131 de l'enzyme His-tARN synthétase (Figure 5.6).

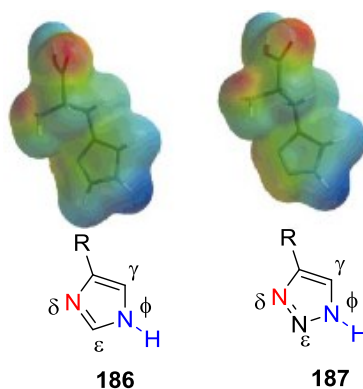


Figure 5.6. Cartes de densités électroniques des régioisomères les plus stables pour l'histidine (à gauche) et l'analogue 1,2,3-triazole (à droite).¹⁴³

Finalement, la synthèse d'analogues stables de la 1-phosphohistidine (1-pHis) et de la 3-phosphohistidine (3-pHis) a été accomplie suite à une réaction 1,3-dipolaire catalysée au cuivre et au ruthénium entre un dérivé azidoalanine et un alcyne avec groupement phosphonate, générant deux isomères de la phosphoryltriazolylalanine (pTza). Ceux-ci ont l'avantage de convertir le lien N-P facilement hydrolysable des pHis en un lien C-P beaucoup plus stable.¹⁶⁶

5.2.2.2 Les triazoles substitués par des groupements aryles en tant qu'isostères d'indoles pour la synthèse d'analogues de tryptophane

En chimie médicinale, les triazoles substitués par un groupement aryle sont rarement utilisés pour mimer le groupement fonctionnel indole des résidus tryptophanes. Il existe tout de même un exemple dans la littérature démontrant l'utilisation de composés basés sur le squelette du 4-phényl-1,2,3-triazole en tant qu'inhibiteurs de l'indoleamine 2,3-dioxygénase 1 (IDO1), une enzyme qui catalyse la décomposition du tryptophane (Figure 5.7).¹⁶⁷ Cette étude décrit le 4-chloro-2-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)phénol (**189**) comme étant un des meilleurs inhibiteurs. Elle révèle également l'importance du positionnement du substituant aryle en démontrant que le 1-phényl-1,2,3-triazole (**190**) n'inhibe pas l'IDO1 malgré les ressemblances stériques et électroniques avec le 4-phényl-1,2,3-triazole (**188**) (Figure 5.7).

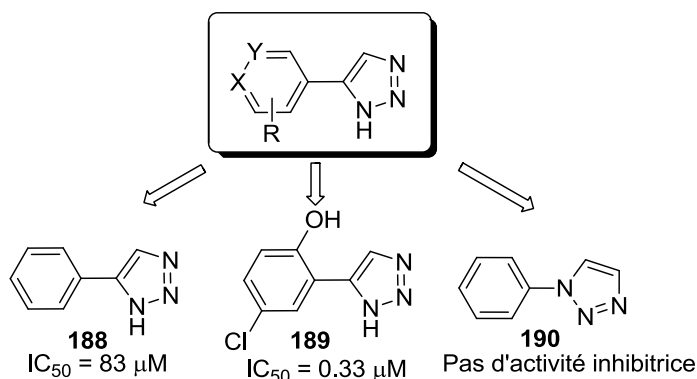


Figure 5.7. Inhibiteurs de l'IDO1 basés sur le squelette 4-phényl-1,2,3-triazole.

5.3 La formation d'azotures *in situ* pour la synthèse de triazoles

L'utilité des triazoles dans le domaine de la chimie peptidique et la facilité d'application de la cycloaddition 1,3-dipolaire ont mené au désir d'adapter cette méthodologie sur support solide. En vue d'augmenter l'accessibilité de ce type de réaction en chimie médicinale, le développement de méthodes permettant la synthèse *in situ* des azotures d'aryles et d'alkyles de nature potentiellement explosive s'est également démarqué comme objectif important.^{168,169} À cette fin, une variété d'approches ont été décrites dans la

littérature pour la synthèse de 1,2,3-triazoles 1,4 disubstitués en solution (Schéma 5.5). La première fait réagir un bromure d'alkyle avec de l'azoture de sodium, pour générer l'azoture d'alkyle correspondant *in situ*, en présence d'un alcyne sous micro-ondes pour donner le triazole 1,4-disubstitué en 10-15 minutes (Schéma 5.5(a)).¹⁷⁰ La deuxième fait appel à de l'azoture de triflyle (TfN₃) en tant qu'agent de transfert de diazo pour la conversion d'une alkyle amine en azoture *in situ* en présence de cuivre, suivie par une réaction de cycloaddition azoture-alcyne (Schéma 5.5(b)).¹⁷¹ La troisième méthode comporte l'avantage d'utiliser deux réactifs non-explosifs, soit le *tert*-butyl nitrite (*t*-BuONO) pour former à partir d'une amine aromatique un sel de diazonium, et l'azoture de

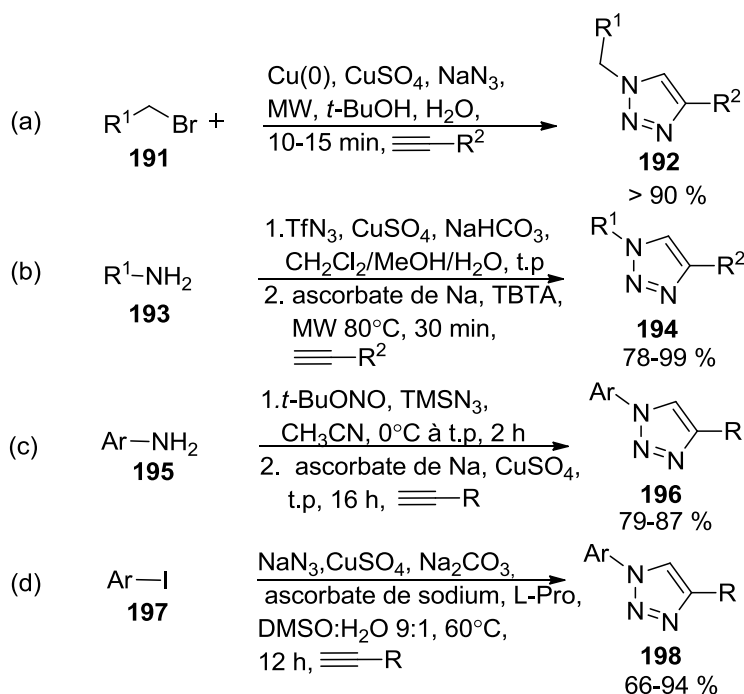


Schéma 5.5. Exemples de stratégies utilisées pour la génération *in situ* d'azotures suivie par une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire.

triméthylsilyle (TMSN₃) pour le transfert d'azoture (Schéma 5.5(c)).¹⁷² Finalement, la quatrième approche décrit la formation *in situ* d'azotures d'aryles via une réaction entre un iodure d'aryle et de l'azoture de sodium catalysée au cuivre (Schéma 5.5(d)).¹⁷³ Cette méthodologie a été utilisée avec succès pour générer des triazoles sur support solide dans

un processus « one pot » impliquant la formation d'azotures d'aryles à partir d'iodure d'aryles et d'azoture de sodium, suivie par la cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre (Schéma 5.6).¹⁷⁴

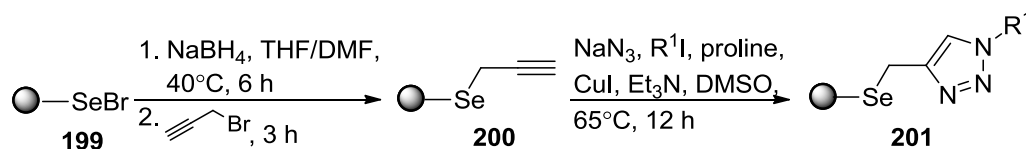


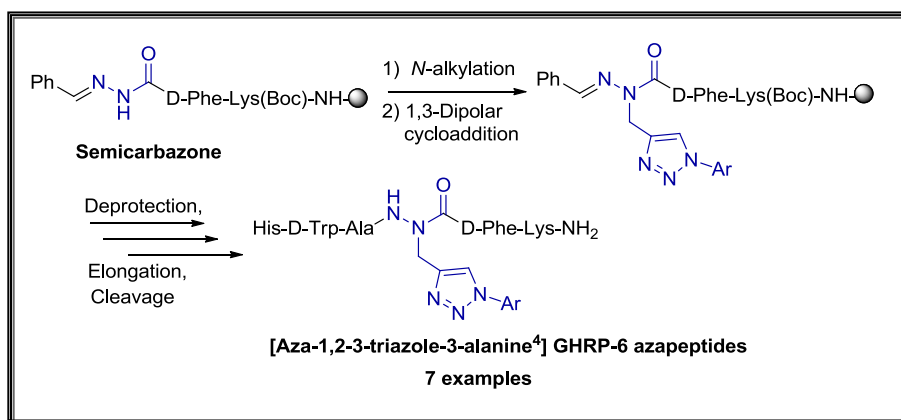
Schéma 5.6. Synthèse de triazole via cyclisation 1,3-dipolaire et formation in situ d'azoture d'aryles.¹⁷⁴

Avec ces conditions en main et notre substrat aza-propargylglycine ancré sur support solide à la position Trp⁴ du peptide GHRP-6, nous avons tenté d'effectuer une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire intermoléculaire avec des azotures d'aryles générés *in situ* afin de donner des 1-aryl,2,3-triazole 1,4 disubstitués comme mimes de tryptophane. Cette méthodologie est décrite dans l'article 3.

Article 3:

Proulx, C.; Lubell, W. D. Aza-1,2,3-triazole-3-alanine Synthesis via Copper-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloaddition on Aza-progargylglycine. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*(15), 5385-5387.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jo100957z>



**Aza-1,2,3-triazole-3-alanine Synthesis via Copper-catalyzed 1,3-Dipolar Cycloaddition
on Aza-propargylglycine**

*Caroline Proulx and William D. Lubell**

Département de Chimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville,
Montréal, Québec H3C 3J7

Abstract

The parallel synthesis of seven aza-1,2,3-triazole-3-alanine azapeptides mimetics of the Growth Hormone Releasing Peptide-6 (GHRP-6) was accomplished via a Cu-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition on an aza-propargylglycine residue anchored on Rink amide resin. Circular dichroism spectroscopy in water demonstrated that azapeptides which possess an aza-1,2,3-triazole-3-alanine residue at the Trp⁴ position of the GHRP-6 sequence adopt β -turn conformations.

Azapeptides are peptidomimetics in which the alpha carbon of one or more amino acids has been replaced with a nitrogen atom.¹ The longstanding interest in aza-amino acids as peptide mimics stems from their increased stability,² resistance to proteases,³ and ability to induce conformational rigidity, favoring the formation of β turns.⁴ Until recently, the incorporation of side-chain diversity onto the aza-amino acid residue was limited by the solution-phase synthesis of protected *N*-alkyl hydrazine building blocks prior to their activation and incorporation onto a growing peptide chain. Towards combinatorial synthesis of azapeptides, we described recently a three-step procedure featuring regioselective alkylation and chemoselective deprotection of an azaglycine semicarbazone to afford a variety of azapeptides directly on solid support.⁵ With the idea that multiple combinatorial libraries of azapeptides could be obtained via the making of “libraries from libraries”,⁶ we have incorporated aza-propargylglycine moieties within a peptide to introduce a new series of aza-1,2,3-triazole-3-alanine residues (Figure 1).

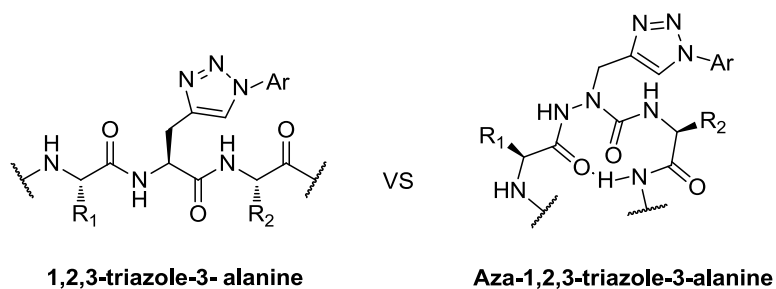
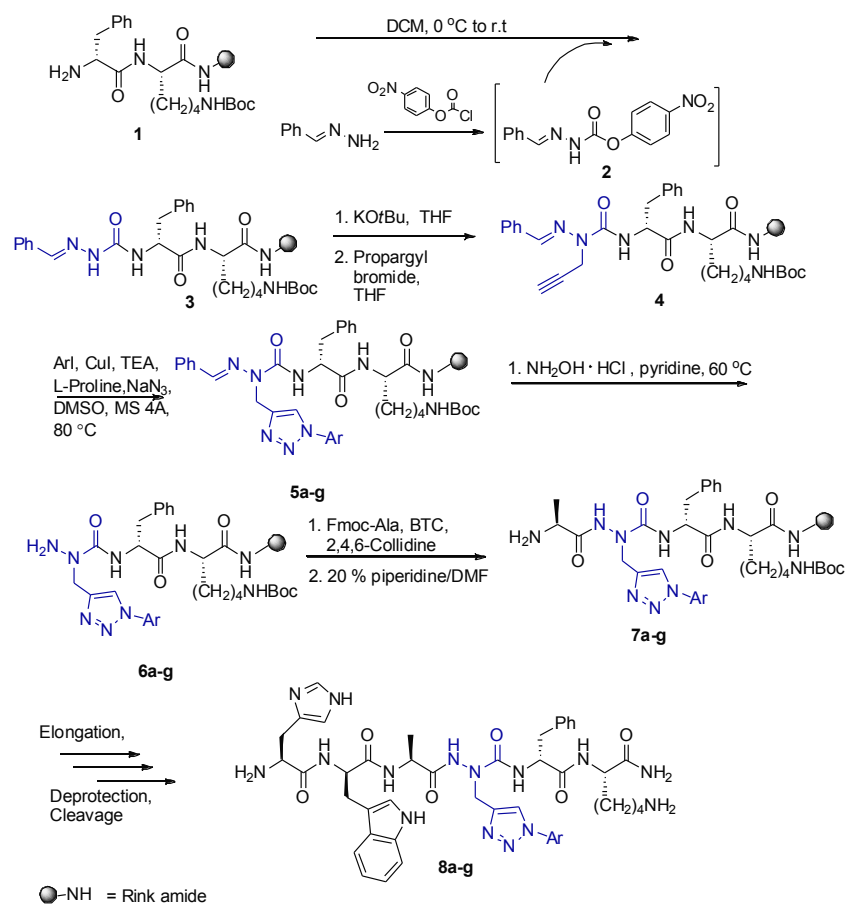


Figure 1. 1,2,3-triazole-3-alanine and aza-1,2,3-triazole-3-alanine residues.

Growth Hormone Releasing Peptide-6 (His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂, GHRP-6), a synthetic hexapeptide that binds to two distinct receptors,⁷ was chosen as the target peptide to develop this methodology. Incorporation of aza-Phe for Trp⁴ conferred selectivity for the CD36 receptor,⁵ a target for the development of treatments of angiogenesis-related diseases. A combinatorial approach to incorporate novel heteroaryl alanine residues at the 4-position was deemed desirable for improving binding affinity of the lead [azaPhe⁴]-GHRP-6 azapeptide.

The Cu-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition has proven effective for making triazole peptidomimetics.⁸ Propargyl glycine, propargyl amides, and *N*-propargyl glycine peptoids, all have served as substrates for triazole formation leading to macrocyclization,^{9,10} carbohydrate ligation,¹¹ peptoid oligomer functionalization,¹² as well as amide bond and histidine isostere synthesis.^{8a,13} Precluding the solution-phase synthesis of azido acids and propargyl glycine residues, and taking advantage of the propensity for aza-amino acids to adopt β -turns, we describe now the solid phase synthesis of aza-1,2,3-triazole-3-alanine-containing azapeptides using aza-propargylglycine residues anchored on Rink amide resin.

[Aza-1,2,3-triazole-3-alanine⁴]-GHRP-6 analogs were synthesized by elaboration of the submonomer methodology for aza-propargylglycine synthesis using propargyl bromide as electrophile⁵ to alkylate a semicarbazone residue on solid phase. Subsequent 1,3-dipolar cycloaddition was accomplished using aryl iodides, sodium azide, and copper iodide in a tandem aryl azide formation/cycloaddition reaction cascade (Table 1, Figure 2).¹⁴



Scheme 1. Synthesis of [Aza-1,2,3-triazole-3-alanine]-GHRP-6 analogs.

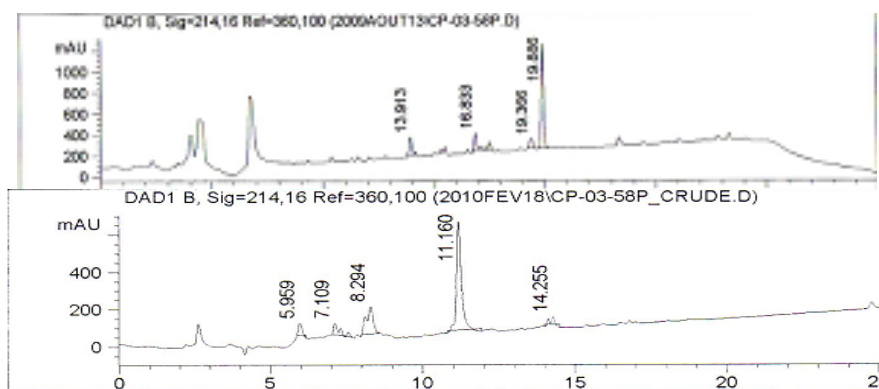
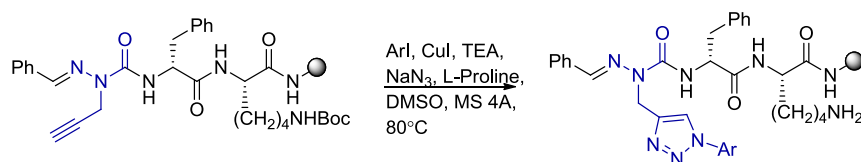


Figure 2 Representative LCMS traces of intermediate **5a** (upper) and peptide **8a** (lower) using MeOH/H₂O eluant (0-80 % MeOH) containing 0.1% formic acid.

Seven triazoles were synthesized in this way and subsequently converted to GHRP-6 analogs modified at the Trp⁴ position (Scheme 1).

Table 1. LCMS conversions of the aryl azide formation/1,3-dipolar cycloaddition step.



entry	ArI	LCMS conversions at 214 nm (%)
a	Iodobenzene	61
b	4-iodoanisole	82
c	3-iodoanisole	58
d	4-iodotoluene	80
e	4-fluoroiodobenzene	69
f	3-trifluoromethyl iodobenzene	79
g	1-iodonaphthalene	62

Addition of 4Å powdered molecular sieves to the resin proved to be essential to afford the desired triazoles in good conversions. Both electron-rich and electron-poor aryl iodides furnished aza-1,2,3-triazole-3-alaninyl residues in good conversions (Table 1), with complete disappearance of starting material as indicated by LCMS analysis after resin cleavage. Copper scavenging was achieved by shaking the resin in a 3:1 DMF : 0.1 N HCl mixture for 12 h. Selective removal of the hydrazone to reveal the aza-amino acid residue was accomplished using hydroxylamine in pyridine under previously established conditions,⁵ and azapeptide elongation was completed according to standard Fmoc protocols for solid-phase peptide synthesis.¹⁵ Azapeptides **8a-g** were obtained in crude purities ranging from 52 to 69% and purified using reverse-phase HPLC to afford product of >99% purity in 5-11% overall yields based on initial resin loading (Table 2).

Table 2. Yields and purities of GHRP-6 azapeptides **8a-g**.

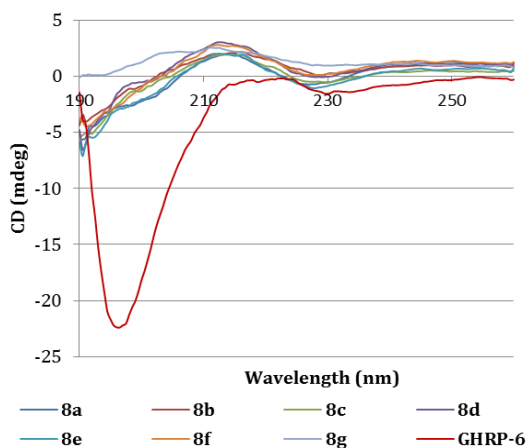
peptide	crude purity ^a (%)	purity ^b (%)	yield ^c (%)	HRMS	
				[M+H] ⁺ or [M+Na] ⁺ ions	
				m/z(calcd)	m/z (obsd)
8a	63	>99	5	902.4532	902.4516
8b	52	>99	8	932.4638	932.4617
8c	59	>99	8	932.4638	932.4617
8d	66	>99	8	916.4689	916.4657
8e	65	>99	9	920.4438	920.4423
8f	69	>99	10	970.4406	970.4375
8g	52	>99	11	952.4689	952.4660

a- RP-HPLC purity at 214 nm of the crude peptide in MeOH/H₂O eluent containing 0.1 % formic acid (FA).

b- RP-HPLC purity at 214 nm of the purified peptide in MeOH/H₂O eluent containing 0.1 % formic acid (FA).

c- Yields after purification by RP-HPLC are based on resin loading.

Circular dichroism (CD) spectroscopy in water was used in order to study the conformational bias of the [aza-1,2,3-triazole-3-alanine⁴]-GHRP-6 analogs and compared with the native sequence (Figure 3). The CD curve of the native GHRP-6 sequence in water is characteristic of a random coil exhibiting a minimum around 190 nm. On the other hand, azapeptides **8a-g** displayed CD signatures consistent with β -turn conformations

**Figure 3.** Circular dichroism in water of azapeptides **8a-g** and native GHRP-6 (red).

exhibiting distinct minima at 230 nm and 190 nm, and a distinct maximum at 215 nm. A similar curve shape was observed for [aza-Phe⁴]GHRP-6 indicating that such modification of the aza-residue side chain does not alter the backbone conformation of the azapeptide in water.

Seven new GHRP-6 azapeptides containing aza-1,2,3-triazole-3-alanine residues were prepared employing aza-propargylglycine in a copper-catalyzed tandem aryl azide formation/1,3-dipolar cycloaddition approach on Rink amide resin. Considering that aza-propargylglycine may be effectively introduced anywhere in a peptide sequence by submonomer solid-phase azapeptide synthesis, featuring semicarbazone propargylation,⁵⁵ this libraries-from-libraries methodology should find general application for modifying peptide structures, because solution phase synthesis of the propargyl moiety and aryl azide are avoided. The effectiveness of this reaction cascade combined with the conformational rigidity imposed by the aza-amino acid residue, make this method particularly attractive for structure-activity studies of biologically active peptides.

Experimental Section

Representative triazole synthesis (5a). In a 6.0 mL filtration tube, equipped with caps and stopcocks, under argon, swollen semicarbazone resin **4** (200 mg, 0.128 mmol) in DMSO was treated sequentially with iodobenzene (15 μ L, 5 equiv, 0.64 mmol), CuI (122 mg, 0.64 mmol, 5 equiv), L-proline (74 mg, 0.64 mmol, 5 equiv), sodium azide (42 mg, 0.64 mmol, 5 equiv), triethyl amine (89 μ L, 0.64 mmol, 5 equiv), and powdered 4Å molecular sieves. The filtration tube was flushed with argon, capped, sealed with parafilm, and heated in a water bath with a sonicator at 80 °C for 24 h. The resin was filtered and washed with DMF (3 x 10 mL), DMF/ 0.1 N HCl (3:1, 3 x 10 mL), H₂O (3 x 10 mL), MeOH (3 x 10 mL), THF (3 x 10 mL), and DCM (3 x 10 mL). The resin was suspended in a DMF/ 0.1 N HCl mixture for 12 h, filtered and subsequently, washed with solvent as above. The extent of reaction conversion was shown to be 61% by LCMS analysis of the

crude filtered solution, after cleavage of an aliquot of resin using TFA/TES/H₂O (95:2.5:2.5, v/v/v. Figure 2). LCMS (0-80% MeOH, 35 min) retention time (R.T.) = 19.89 min; LCMS (ESI) calcd for C₃₂H₃₈N₉O₃ [M+H]⁺, 596.3 found *m/z* 596.2.

Acknowledgment. This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT). CP is grateful to NSERC and Boehringer Ingelheim for graduate student fellowships. The authors thank Dr. A. Fürtös, K. Venne, and M-C. Tang (Université de Montréal) for assistance with mass spectrometry.

Supporting Information Available: General Experimental Methods, compound characterization data and copies of LCMS traces. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>."

References

- 1 Gante, J. *Synthesis* **1989**, 405.
- 2 (a) Gassman, J. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 1771. (b) Wipf, P.; Adeyeye, C. M.; Rusnak, J. M.; Lazo, J. S. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 1585.
- 3 Dugave, C.; Demange, L. *Letters in Peptide Science* **2003**, 10, 1.
- 4 (a) Reynolds, C. H.; Hormann, R. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9395-9401. (b) Lee, H-J.; Song, J-W.; Choi, Y-S.; Park, H-M.; Lee, K-B. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11881-11893. (c) André, F.; Boussard, G.; Bayeul, D.; Didierjean, C.; Aubry, A.; Marraud, M. *J. Peptide Res.* **1997**, 49, 556-562. (d) André, F.; Vicherat, A.; Boussard, G.; Aubry, A.; Marraud, M. *J. Pept. Res.* **1997**, 50, 372-381.
- 5 Sabatino, D.; Proulx, C.; Klocek, S.; Bourguet, C. B.; Boeglin, D.; Ong, H.; Lubell, W. D. *Org. Lett.* **2009**, 11, 3650.

- 6 Houghten, R. A.; Blondelle, S. E.; Dooley, C. T.; Dörner, B.; Eichler, J.; Ostresh, J. M. *Molecular Diversity* **1996**, *2*, 41.
- 7 Demers, A.; McNicoll, N.; Febbraio, M.; Servant, M.; Marleau, S.; Silverstein, R.; Ong, H. *Biochem. J.* **2004**, 417.
- 8 (a) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064. (b) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- 9 Selected examples include: (a) Bock, V. D.; Speijer, D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 971. (b) Turner, R. A.; Oliver, A. G.; Lokey, R. S. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5011.
- 10 Selected examples include: (a) Holub, J. M.; Jang, H.; Kirshenbaum, K. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3275. (b) Jagasia, R.; Holub, J. M.; Bollinger, M.; Kirshenbaum, K.; Finn, M. G. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2964-2974.
- 11 (a) Kuijpers, B. H. M.; Groothuys, S.; Keereweer, A. R.; Quaedflieg, P. J. L. M.; Blaauw, R. H.; van Delft, F. L.; Rutjes, F. P. J. T. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3123. (b) Lee, D. J.; Mandal, K.; Harris, P. W. R.; Brimble, M. A.; Kent, S. B. H. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5270.
- 12 Holub, J. M.; Jang, H.; Kirshenbaum, K. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1497.
- 13 Gajewski, M.; Seaver, B.; Esslinger, C. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4163–4166.
- 14 A one-pot aryl azide formation/1,3-dipolar cycloaddition sequence on solid support was reported in: Xu, W-M, Huang, X.; Tang, E. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 726-733.
- 15 Lubell, W. D.; Blankenship, J. W.; Fridkin, G.; Kaul, R. (2005) "Peptides." *Science of Synthesis* 21.11, Chemistry of Amides. Thieme, Stuttgart, 713.

5.4 Informations supplémentaires à l'article 3 : affinité des dérivés [aza-1-aryl,2,3-triazole-3-alanine⁴]-GHRP-6 pour le récepteur CD36

En collaboration avec le laboratoire du Dr Jean-François Masson, les dérivés [aza-1-aryl, 2, 3-triazole-3-alanine⁴]-GHRP-6 ont pu être testés pour affinité au récepteur CD36 en utilisant une technique de résonance des plasmons de surface (SPR).¹⁷⁵ Les valeurs relatives de K_d (M) sont compilées dans le tableau 5.1.

Tableau 5.1. Affinités relatives des dérivés [aza-1,2,3-triazole-3-alanine⁴]-GHRP-6 pour le récepteur CD36 mesurées par SPR.

Composé	Structure	K_d (μM)
8a	His-D-Trp-Ala-(Aza-1-phényl-2,3-triazole-3-alanine)-D-Phe-Lys-NH ₂	9,13
8b	His-D-Trp-Ala-(Aza-1- <i>p</i> -méthoxyphényl-2,3-triazole-3-alanine)-D-Phe-Lys-NH ₂	3,54
8c	His-D-Trp-Ala-(Aza-1- <i>m</i> -méthoxyphényl-2,3-triazole-3-alanine)-D-Phe-Lys-NH ₂	1,73
8d	His-D-Trp-Ala-(Aza-1- <i>p</i> -toluyl-2,3-triazole-3-alanine)-D-Phe-Lys-NH ₂	5,07
8e	His-D-Trp-Ala-(Aza-1- <i>p</i> -fluorophényl-2,3-triazole-3-alanine)-D-Phe-Lys-NH ₂	1,73
8f	His-D-Trp-Ala-(Aza-1- <i>m</i> -trifluorométhylphényl-2,3-triazole-3-alanine)-D-Phe-Lys-NH ₂	7,74
8g	His-D-Trp-Ala-(Aza-1-(1-naphthyl)-2,3-triazole-3-alanine)-D-Phe-Lys-NH ₂	2,42

Tous les analogues possédant des résidus aza-1-aryle,2,3-triazole-3-alanines à la position Trp⁴ de GHRP-6 ont des affinités de même ordre de magnitude (micromolaire) pour le récepteur CD36. De ce fait, la substitution du groupement aryle ne semble pas affecter significativement leur capacité de se lier au récepteur CD36; même un substituant volumineux comme le naphthyle à la position N1 du triazole (**8g**) semble être toléré.

Partie B - Fonctionnalisation d'une sous-unité aza-propargylglycine par une réaction de couplage A³

La réaction de couplage entre un alcyne, un aldéhyde et une amine secondaire catalysée par un métal de transition, communément appelée « couplage A³ »,¹⁷⁶ est une réaction qui permet d'accéder à des amines propargyliques (Figure 5.8).

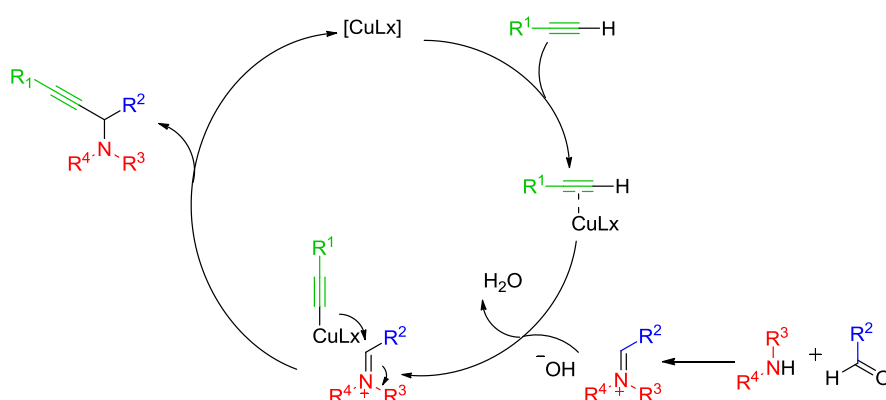


Figure 5.8. Mécanisme proposé pour la réaction de couplage A³ catalysée par le cuivre.

Dans le cadre de notre recherche axée sur le développement de nouveaux mimes peptidiques, la possibilité d'effectuer cette réaction en utilisant un résidu aza-propargylglycine comme composante alcyne permettrait de fournir des analogues d'azalysine. Ces dérivés de lysine fixeraient la chaîne latérale en conformation étendue grâce à la liaison triple et permettraient l'introduction de substituants sur l'amine ϵ , tout en imposant les contraintes conformationnelles habituellement observées dans les acides aminés « aza » (Figure 5.9).

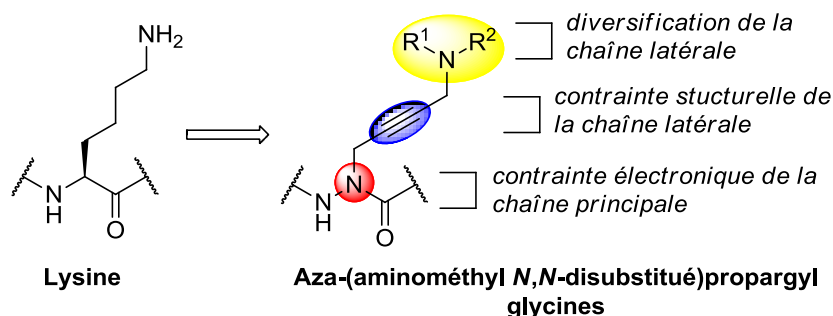


Figure 5.9. Utilisation de aza-(aminométhyl *N,N*-disubstitué)propargyl glycines comme mimes de lysine.

En appliquant cette chimie vers la synthèse d'analogues avec résidus aza-(aminométhyl *N,N*-disubstitué)propargyl glycines à la position Trp⁴ du GHRP-6 comme preuve de concept, nous pourrions explorer davantage les propriétés structurales et électroniques des ligands de type [azaXaa⁴]-GHRP-6 favorisant leur liaison au récepteur CD36. Il serait également intéressant d'explorer la synthèse de peptidomimétiques avec résidus azaLys à la position Ala³ de GHRP-6, étant donné la présence d'un résidu D-Lys à cette position dans le ligand du récepteur CD36 EP80317 (Haic-D-2-Me-Trp-D-Lys-Trp-D-Phe-Lys-NH₂, Figure 5.10).¹⁷⁷ Tel que mentionné dans le chapitre 2, comparativement à GHRP-6, EP80317 possède une affinité 1000 fois inférieure pour le récepteur de la ghréline (GHSR-1a) tout en maintenant son affinité pour le récepteur CD36 dans l'ordre du micromolaire (Figure 5.10).

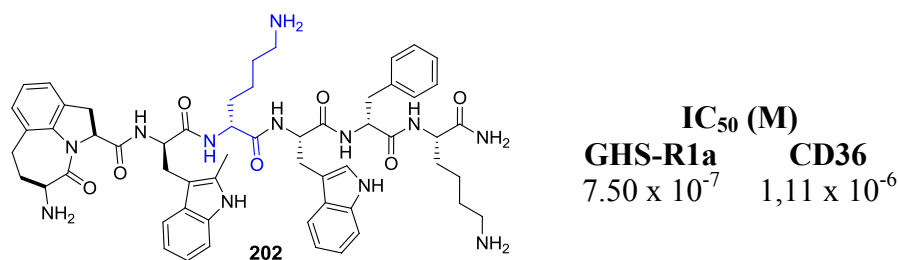


Figure 5.10. Structure et affinités du composé EP8031 pour les récepteurs GHSR-1a et CD36.

Il y a néanmoins place à l'amélioration tant au niveau de l'affinité que de la sélectivité pour le récepteur CD36 versus le récepteur GHS-R1a.

5.5 Les lysines N(ϵ)-substituées

La lysine se distingue des autres acides aminés protéinogènes par la présence d'une chaîne latérale avec une amine primaire nucléophile, un site propice à la ϵ -N-méthylation et ϵ -N-acylation lors de modifications postranslationnelles.¹⁷⁸ L'acétylation et l'alkylation de l'amine ϵ des lysines des histones régulent, entre autres, la transcription des gènes en causant le relâchement de l'hétérochromatine et le recrutement de facteurs de transcription.¹⁷⁹ Le groupement Lys- ϵ -NH₂ de la lysine peut être mono-, di- ou tri-méthylé, ce qui affecte sa taille et son hydrophobie. En terme d'acylation, mise à part l'acétylation, la chaîne latérale de la lysine peut subir plusieurs transformations dynamiques (ex : formylation, propionylation, butyrylation, crotonylation, malonylation, succinylation, myristoylation et ubiquitylation) en plus d'offrir la capacité d'agir comme point d'attache pour plusieurs co-facteurs (pyridoxale phosphate (PLP),¹⁸⁰ biotine,¹⁸¹ lipote,¹⁸² rétinol¹⁸³) via la formation d'une aldimine ou d'une liaison amide.

Plusieurs stratégies visant à incorporer des analogues et mimes de lysines N-substituées dans des peptides et protéines ont été développées dans le but de concevoir des inhibiteurs de Lys déméthylase¹⁸⁴ et d'étudier (1) l'impact de la modification d'une seule lysine,¹⁸⁵ (2) le mécanisme du régulateur de l'information silencieuse 2 (sir2) désacétylase,¹⁸⁶ et (3) l'effet d'interactions amide- π versus cation- π .¹⁸⁷

5.6 Mimes de lysines à conformation restreinte

D'autre part, de nombreuses approches synthétiques ont été développées pour la conception de mimes de lysine avec rigidification tant au niveau de la chaîne latérale que de la chaîne principale. Par exemple, des voies de synthèses ont été élaborées pour fournir des dérivés rigides de lysines basés sur le squelette de la *p*-amino-phénylalanine (Aph, **203**)¹⁸⁸ et de la *p*-aminométhyl-phénylalanine (Amp, **204**),¹⁸⁹ de la proline (**205**, **206**),¹⁹⁰ de l'acide pyroglutamique (**207**),¹⁹¹ de l'octahydroanthracène (**208**, **209**),¹⁹² du 7-azabicycloheptane (**210**),¹⁹³ d'un sucre (**211**),¹⁹⁴ de l'acide pipécolique (**212**, **213**)¹⁹⁵ et de la pyrrolidine (**214**, **215**)¹⁹⁶ (Figure 5.11). Au meilleur de nos connaissances, à l'exception de

la 4-(aminométhyl)-Phe, aucun de ces substrats n'a encore été incorporé dans une séquence peptidique biologiquement active dans le but d'effectuer des études SAR.

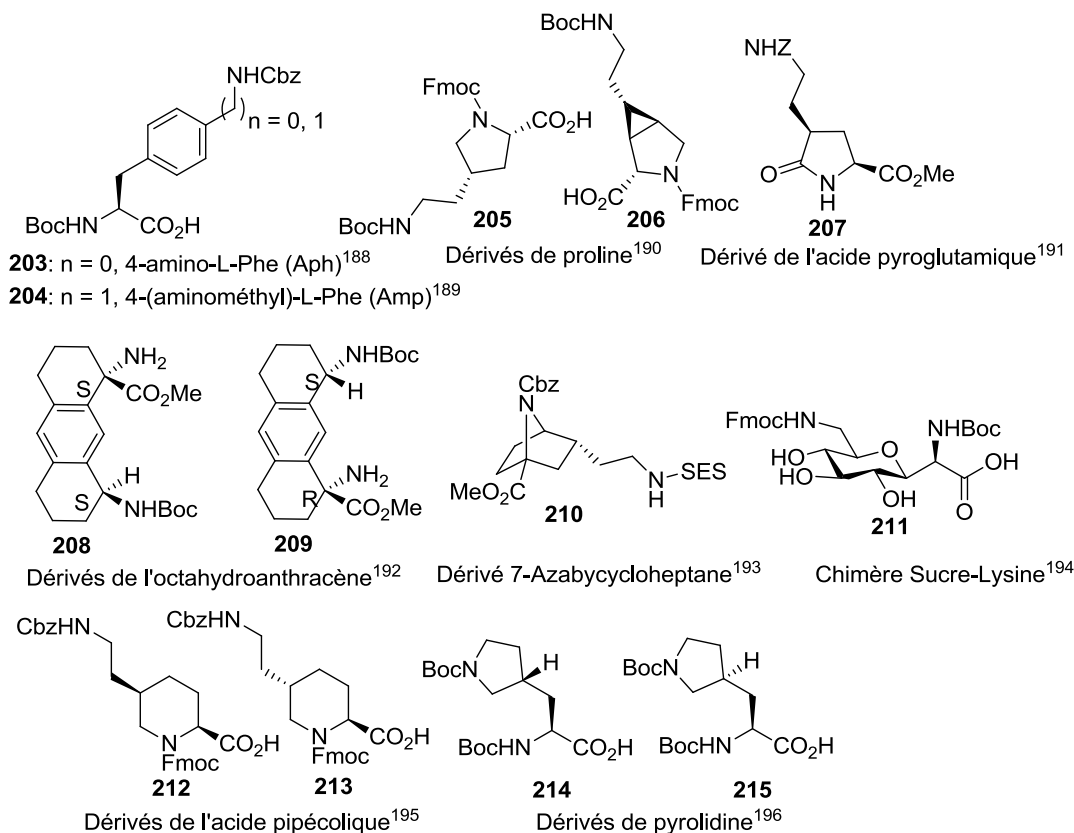


Figure 5.11. Exemples de mimes de lysine à conformation restreinte.

5.6.1 Utilisation de la *p*-(aminométhyl)-Phe en chimie médicinale

En chimie médicinale, la *p*-(aminométhyl)-phénylalanine (Amp) et la *p*-(*N*-isopropyl)-aminométhylphénylalanine (IAmp) ont été utilisées pour mimer la lysine avec contrainte conformationnelle au niveau de la chaîne latérale.¹⁹⁷ Leur modélisation moléculaire suggère une distance $C\alpha-N\epsilon$ similaire pour les résidus Amp (6.40 Å) en comparaison avec la lysine (7.50 Å). De plus, la basicité des azotes distaux est présumée équivalente, se traduisant en contributions électrostatiques similaires lors de la liaison à un récepteur.¹⁹⁷ En remplaçant Lys⁹ avec Amp⁹ afin de fournir des-AA^{1,2,5}-[D-Trp⁸, Amp⁹]-

Somatostatin (SRIF) (c[H-Cys-Lys-Phe-Phe-D-Trp-Amp-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH]), un agoniste des récepteurs de la Somatostatine, une baisse de puissance d'un facteur de 70 a été observée en comparaison avec SRIF-28. Par contre, la substitution de Lys⁹ par un résidu 4-(*N*-isopropyl)-aminométhylphénylalanine (IAmp) a été mieux tolérée, avec une baisse de puissance moins significative (facteur de 7), et accompagnée d'une nouvelle *sélectivité* pour le récepteur de la Somatostatine de type 1 (sst1) (**216**, Figure 5.12).¹⁹⁷

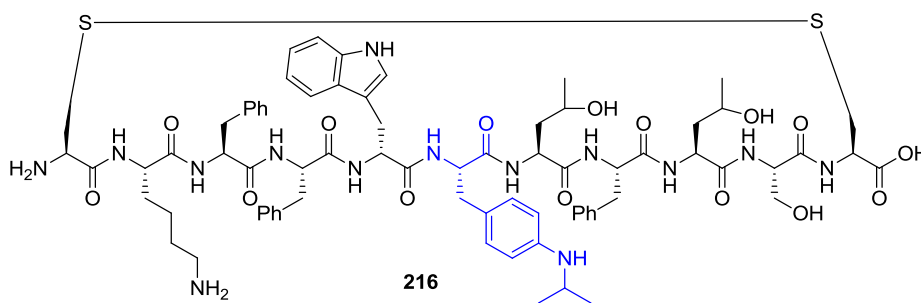


Figure 5.12. Structure de l'analogue des-AA^{1,2,5}-[D-Trp⁸, IAmp⁹]-Somatostatin.

Pour ce qui est du dérivé possédant un résidu *p*-(*N,N*-diisobutyl)-aminométhylphénylalanine (Amp(*i*Bu)₂), des baisses de puissance et de sélectivité ont été observées.¹⁹⁷

Les résidus aza-(aminométhyl *N,N*-disubstitué)propargylglycines proposés pourraient donc être utilisés de façon similaire en chimie médicinale, où la chaîne latérale serait rigidifiée par la liaison triple et où l'azote distal pourrait être diversifié pour conférer une sélectivité nouvelle à un récepteur.

5.7 La réaction de couplage A³ sur support solide

La réaction de couplage A³ a fait ses débuts sur support solide en 1998, où une pipérazine liée sur support solide a réagit avec un alcyne et un aldéhyde en présence d'une quantité en excès de cuivre afin d'effectuer une réaction de type Mannich (Schéma 5.7a).¹⁹⁸ La même réaction a également été décrite où cette fois une propargyl amine était fixée sur support solide et réagit avec du paraformaldéhyde et une série de pipérazines *N*-substituées

(Schéma 5.7b).¹⁹⁹ Une stratégie similaire, liant cette fois un alcyne aromatique sur résine, a ensuite démontré la faisabilité de la réaction en utilisant une quantité catalytique de cuivre (Schéma 5.7c).²⁰⁰

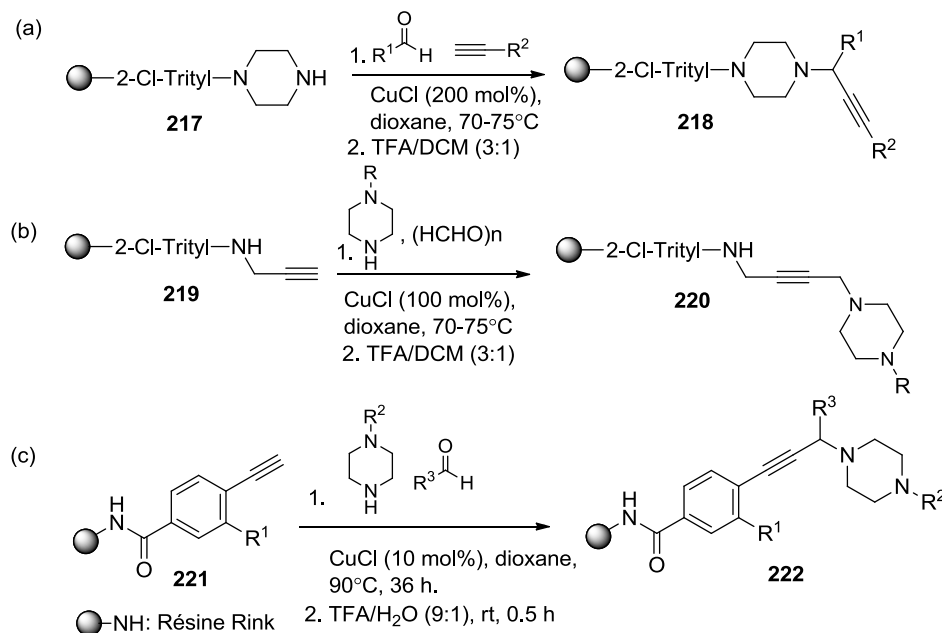


Schéma 5.7. Couplage A³ sur support solide.

Bien que ces résultats suggèrent que cette réaction peut être effectuée avec succès sur support solide, dans tous les cas mentionnés les amines propargyliques obtenues ont été clivées du support solide sans diversification additionnelle.

5.8 Résultats

5.8.1 Efforts vers la réaction de couplage A³ sur support solide

En se basant sur ces résultats, nous avons tenté d'effectuer une réaction de couplage A³ sur notre sous-unité aza-propargylglycine protégée par une semicarbazone liée sur support solide (Tableau 5.2). Ainsi, le substrat **223** a été soumis aux conditions réactionnelles de couplage A³, soit 3.0 équivalents d'amine secondaire, 3.0 équivalents de paraformaldéhyde, 10% d'iodure de cuivre dans le dioxane en chauffant à 80°C avec

sonication pendant 1h. Après clivage d'une petite portion de résine avec TFA et analyse par LCMS, le produit avec la masse désirée a pu être détecté avec des conversions de 14-54% (Tableau 5.2). Malgré la présence de deux sous-produits non identifiées, la disparition complète du matériel de départ nous a mené à poursuivre l'élongation du peptide GHRP-6.

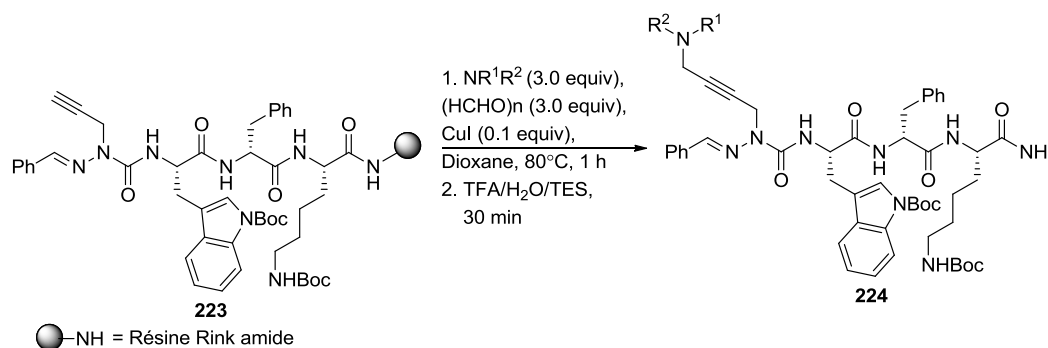


Tableau 5.2. Résultats (conversion) de la réaction de couplage A³ sur support solide.

amine	conversion à 214nm (%) ^a	TR (min) dans le MeOH ^a	MS [M+1] ⁺ obsd(calcd)
pipéridine	30	10.13	760.2(760.4)
pyrrolidine	40	10.01	746.2(746.4)
diéthylamine	44	10.02	748.2(747.4)
dibenzylamine	54	12.20	872.2(872.4)
dicyclohexylamine	36	10.07	856.2(856.5)
<i>N</i> -benzylméthyl amine	14	11.57	796.2(796.4)

a-Analyses HPLC analytiques effectuées avec colonne GEMINI de Phenomenex (4.6 mm x 150 mm, 5 μM, C18) avec débit de 0.5 ml/min et gradient de 5-80%, où solvant A = H₂O (0.1% FA) et solvant B = MeOH (0.1% FA).

En considérant qu'il fallait parvenir à enlever l'excès de paraformaldéhyde utilisé et l'iodure de cuivre, une série de lavages ont été effectués. Dans un premier temps, nous nous sommes servis de conditions préalablement établies pour l'élimination de cuivre, notamment des lavages avec 3 :1 DMF : 0.1 N HCl¹⁷⁴ et avec un mélange 6 :5 DMF : pyridine, acide ascorbique 0.02 g/mL.²⁰¹ Nous avons également essayé les lavages proposés antérieurement,^{199b} où la résine était d'abord lavée avec une solution de 10% pipéridine dans le DMF, et ensuite avec un mélange 1 :1 H₂O : DMF. Il était également supposé qu'il

y aurait élimination du paraformaldéhyde résiduel durant l'étape de déprotection de la semicarbazone avec 1.5 M $\text{NH}_2\text{-OH}\cdot\text{HCl}$ dans la pyridine. Cependant, nous avons observé la formation d'une multitude de sous-produits indésirables et/ou une décomposition suite à l'étape de déprotection, rendant l'élongation et l'isolation subséquentes du peptidomimétique impossibles (Schéma 5.8).

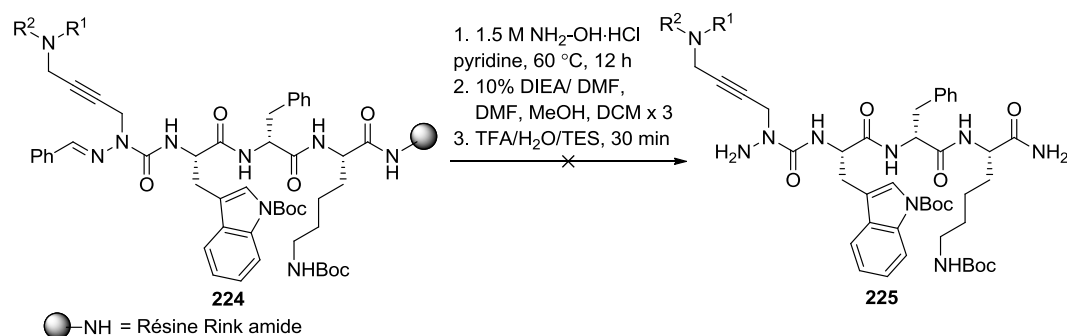


Schéma 5.8. Étape de déprotection de l'hydrazone suite à la réaction de couplage A^3 .

Nous avons alors tenté d'effectuer la réaction de couplage A^3 dans une Macrokan IRORITM, avec l'hypothèse que le paraformaldéhyde et l'iodure de cuivre résiduels pourraient physiquement être séparés de la résine en passant à travers les mailles de polypropylène de la kanTM. Cependant, aucune amélioration n'a pu être détectée suite à l'étape de déprotection de l'hydrazone. L'utilisation du benzaldéhyde plutôt que du paraformaldéhyde pour effectuer la réaction de couplage A^3 a nécessité une quantité en excès de cuivre et prolongé le temps réactionnel sans jamais mener à la conversion complète du matériel de départ.

En partant de l'hypothèse que la présence de paraformaldéhyde ou d'iodure de cuivre sur résine pourrait gêner les réactions subséquentes, nous avons essayé d'effectuer cette transformation de façon tardive, c'est-à-dire après avoir terminé la séquence [aza-propargylglycine³]-GHRP-6 mais avant son clivage final de la résine (Schéma 6.6). La réaction a donc été essayée en utilisant comme substrat le peptidomimétique ancré sur

support solide avec l'extrémité *N*-terminale (1) libre (**227**) et (2) avec un groupement protecteur Boc (**228**), puisque les amines secondaires utilisées dans la réaction n'étaient pas compatibles avec le groupement protecteur Fmoc (Schéma 5.9). Conceptuellement, cette diversification tardive du résidu aza-propargylglycine permettrait une synthèse beaucoup plus efficace de « bibliothèques de bibliothèques » de mimes peptidiques. Malheureusement, ces essais se sont avérés infructueux. Ceci pourrait être dû à leur capacité d'adopter une conformation en repliement β , rendant l'alcyne potentiellement inaccessible.

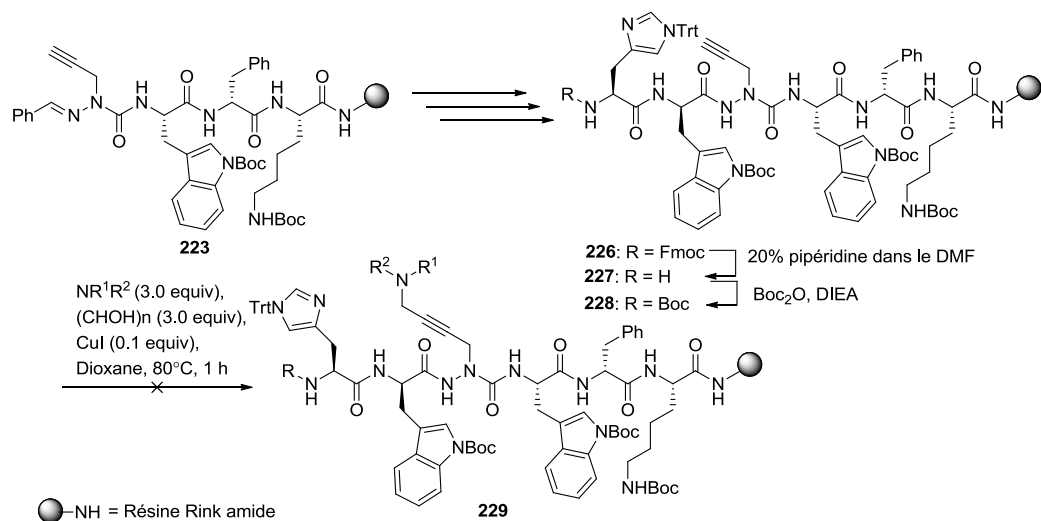


Schéma 5.9. Essais vers une réaction tardive de couplage A³ sur résine.

Ces difficultés nous ont mené vers la synthèse et diversification d'une sous-unité aza-dipeptide en solution.

5.8.2 Efforts vers la réaction de couplage A³ en solution

En parallèle avec le développement de notre approche pour synthèse d'azapeptides sur support solide, nous avons préalablement validé l'utilisation de semicarbazone pour la synthèse et l'incorporation de sous-unités « aza » en solution. Carine Bourguet et Dr David Sabatino avaient d'abord démontré l'avantage d'utiliser une semicarbazone pour la synthèse de sous-unités aza-glycine.²⁰² Nous avons ensuite augmenté l'étendue de cette méthodologie en solution par le biais d'une alkylation chimiosélective de la semicarbazone, de façon similaire à notre approche sur support solide.²⁰³

Au cours de ces travaux antérieurs, nous sommes arrivés à quelques conclusions significatives : (1) l'aza-dipeptide doit préférentiellement être protégé par un ester de *tert*-butyle et (2) une semicarbazone dérivée du benzophénone, plutôt que du benzaldéhyde, doit être utilisée car ces produits sont généralement plus stables en solution. La protection en *C*-terminale par un ester de *tert*-butyle permet d'éviter la formation d'hydantoïne et d'azadécetopipérazine comme sous-produits durant les étapes d'alkylation et de déprotection de l'hydrazone lorsqu'un ester de méthyle est utilisé. L'utilisation de 4 équivalents de chlorhydrate d'hydroxylamine dans la pyridine, des conditions semblables à celles employées dans notre méthodologie sur support solide pour la déprotection de l'hydrazone, se sont également avérés orthogonal à l'ester de *tert*-butyle de choix, permettant la déprotection et l'élongation en *N*- ou *C*-terminale, sans que l'autre extrémité ne soit affectée.

5.8.2.1 Synthèse de l'aza-dipeptide en solution et réaction de couplage A³.

Nous avons en main l'aza-dipeptide **233** et son équivalent racémique, qui ont été obtenus dans un rendement de 76% via l'alkylation chimiosélective de l'ester de *tert*-butyle de l'aza-glycine phénylalanine **232** avec bromure de propargyle (Schéma 5.10). Nous avons choisi d'utiliser ces substrats afin d'étudier la réaction de couplage A³ en solution, ce qui mènerait à la synthèse d'analogues [azaLys⁴]-GHRP-6.

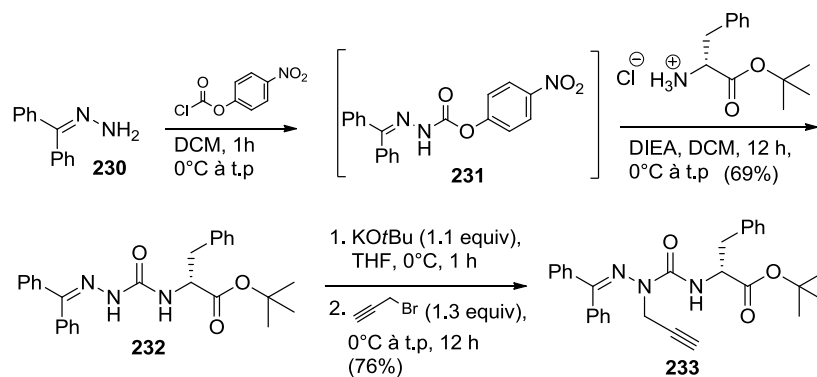


Schéma 5.10. Synthèse d'aza-dipeptide en solution.

Les tests préliminaires ont été effectués sur le dipeptide racémique par Anna Tomberg, une stagiaire d'été sous ma direction. Une série d'amines secondaires ont été explorées dans la réaction de couplage A³. Ses résultats ont identifié la diéthylamine, la dicyclohexylamine, la *N*-benzylméthylamine, la morpholine, la diisopropylamine, la diallylamine et la pipéridine comme réactifs prometteurs, donnant le produit désiré avec disparition complète du matériel de départ après un temps de réaction de 40 minutes. La pyrrolidine et la dibenzylamine, quant à elles, ont donné le produit désiré dans des rendements inférieurs à 10%. Les sept meilleures amines secondaires ont ensuite été utilisées pour la réaction de couplage A³ sur le dipeptide **233** énantiopure, générant les amines propargyliques attendues dans des rendements quantitatifs (Schéma 5.11, Figure 5.13).

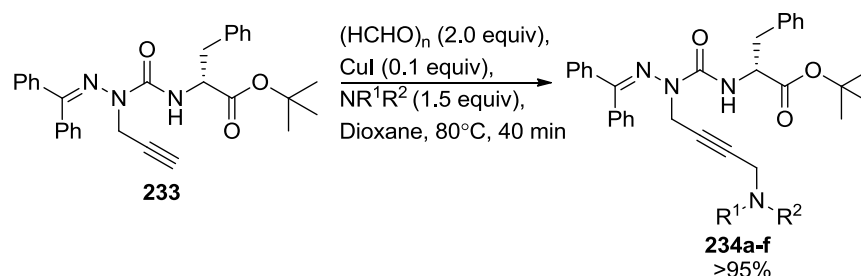


Schéma 5.11. Réaction de couplage A³ en solution.

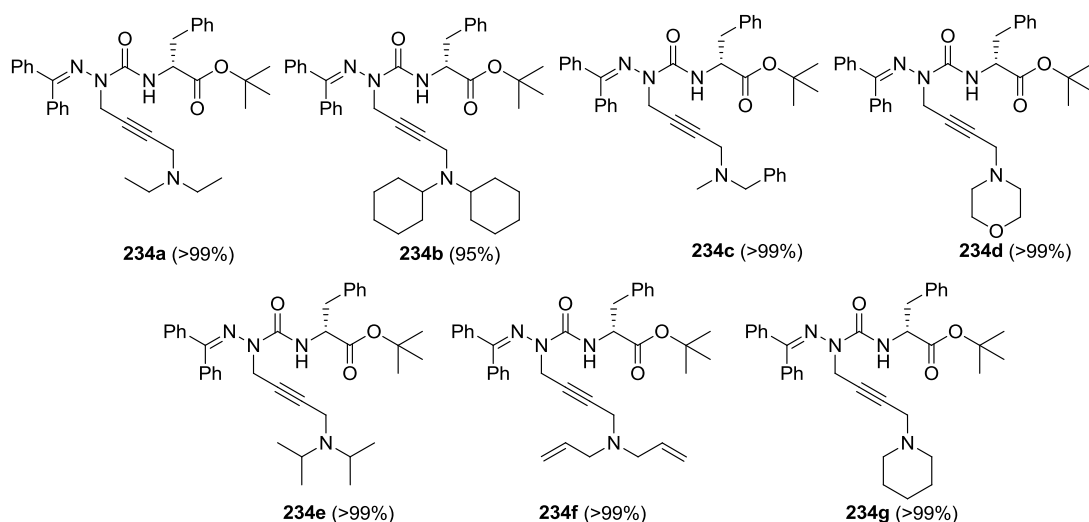


Figure 5.13. Dérivés azaLys synthétisés.

5.8.2.2 Incorporation des synthons aza-Lys-D-Phe sur support solide

Ayant ces aza-dipeptides en main, nous avons procédé à la déprotection chimiosélective de l'ester de *tert*-butyle en présence d'un mélange 1 : 1 TFA : DCM. Les azadipeptides acides résultants **236a-f** ont ensuite été activés avec HBTU/DIEA et couplés avec un résidu Lys(Boc) ancré sur résine amide Rink (Schéma 5.12).

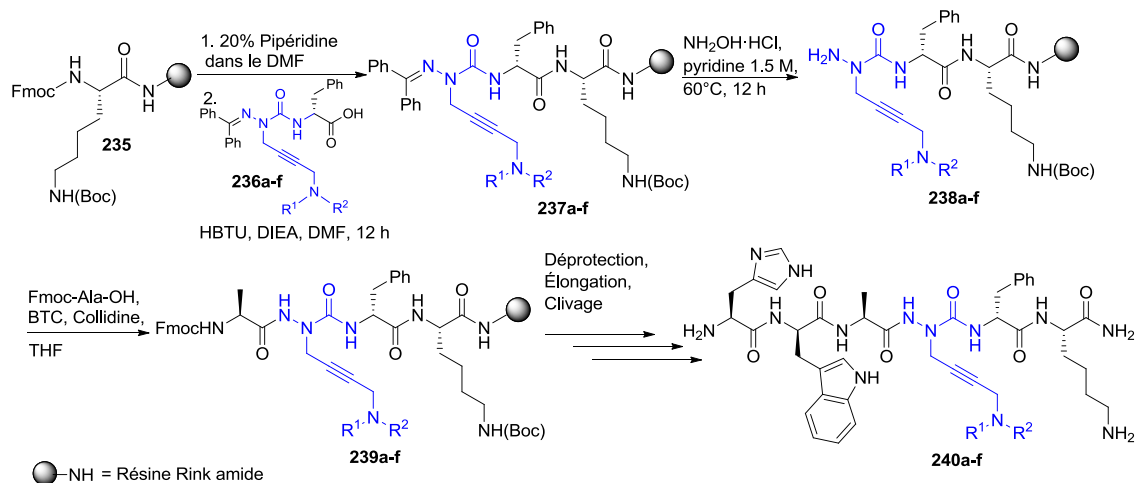


Schéma 5.12. Synthèse sur support solide des peptidomimétiques [azaLys⁴]-GHRP-6 **240a-f**.

La déprotection chimiosélective des semicarbazones **237a-f** a été accomplie en utilisant une solution de 1.5 M chlorhydrate d'hydroxylamine dans la pyridine pour donner les semicarbazides **238a-f**. Une acylation subséquente avec Fmoc-Ala-OH, BTC et collidine dans le THF a donné les térapeptides **239a-f**. La déprotection du groupement Fmoc et l'élévation du peptide ont été accomplies en utilisant des conditions standards de synthèse peptidique sur support solide.¹⁰⁸ Après clivage de la résine, précipitation dans l'éther et lyophilisation, les analogues [azaLys⁴]-GHRP-6 **240a-f** ont été obtenus avec puretés brutes de 64-70%. Ils ont ensuite été purifiés par HPLC préparative afin de fournir les peptidomimétiques **240a-f** avec pureté de >99% dans des rendements isolés de 4-11% (Tableau 5.3).

Tableau 5.3. Rendements et caractérisation des peptidomimétiques **240a-f**.

peptide	pureté brute ^a (%)	tr (min) dans le MeCN ^b	tr (min) dans le MeOH	pureté HPLC à 214 nm ^d (%)	rendement ^e (%)	HRMS [M+23] ⁺ m/z obsd(cald)
240a	70	9.56	9.90	>99	6.1	890.4766 (890.476)
240b	72	8.39 ^c	9.43 ^c	>99	11	998.5701 (998.5699)
240c	69	7.79 ^c	8.19 ^c	>99	8.0	938.4768 (938.476)
240d	67	7.63	7.99	>99	10	904.4555 (904.4553)
240e	64	8.13	8.87	>99	7.9	918.5079 (918.5073)
240f	69	8.32	9.41	>99	3.8	914.4770 (914.476)

a-Pureté brut du peptidomimétique déterminée par analyse HPLC analytique à 214 nm avec colonne GEMINI de Phenomenex (4.6 mm x 150 mm, 5 μ M, C18), débit de 0.5 ml/min et gradient de 5-40% ou 5-80% (35 minutes), où solvant A = H₂O (0.1% FA) et solvant B = MeOH (0.1% FA) (méthode 1) ou solvant B = MeCN (0.1% FA) (méthode B). b- Analyses effectuées avec HPLC analytique utilisant les mêmes conditions qu'en (a) (méthode 2) avec gradient de 5-40% (20 minutes). c- Analyses effectuées avec HPLC analytique utilisant les mêmes conditions qu'en (a) (méthode 1), avec gradient de 5-80% (20 minutes). d-Pureté du peptidomimétique isolé déterminée par analyse HPLC analytique avec les mêmes conditions qu'en (a), avec gradient de 5-40% ou 5-80% (20 minutes). e- Rendements après purification par HPLC préparative basés sur le chargement initial de la résine.

5.8.2.3 Analyses conformationnelles des azapeptides 240a-f par dichroïsme circulaire

La conformation des mimes peptidiques [azaLys⁴]-GHRP-6 **240a-f** a ensuite été évaluée par spectroscopie de dichroïsme circulaire dans l'eau (Figure 5.14). Comme auparavant, tous les analogues ont démontré des courbes de dichroïsme circulaire caractéristiques d'une conformation en repliement β , avec des minimums vers 230 and 190 nm et un maximum vers 215 nm.²⁰⁴ Ces résultats démontrent une fois de plus que la nature de la chaîne latérale du résidu « aza » affecte peu la conformation des azapeptides dans l'eau.

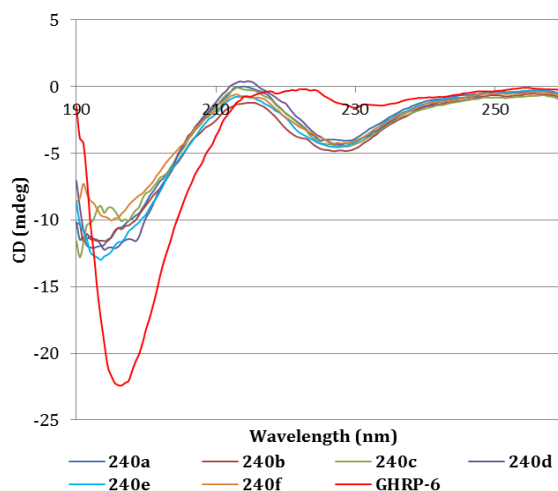


Figure 5.14. Dichroïsme circulaire des azapeptides **240a-f** et du peptide parent GHRP-6 (rouge).

5.8.2.4 Affinité des azapeptides **240a-f** pour le récepteur CD36

L'affinité relative des mimes peptidiques **240a-f** pour le récepteur CD36 a été testée par SPR dans le laboratoire de notre collaborateur Dr Jean-François Masson (Tableau 5.4).

Tableau 5.4. Valeurs de K_d (μM) relatives des azapeptides **240a-f** déterminées par SPR.

peptide	SPR K_d (μM)
GHRP-6 His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	3.45
DBG178 His-D-Trp-Ala-AzaTyr-D-Phe-Lys-NH ₂	1.53
240a His-D-Trp-Ala-Aza[(<i>N,N</i> -diéthylaminométhyl)propargylglyciny]-D-Phe-Lys-NH ₂	2.38
240b His-D-Trp-Ala-Aza[(<i>N,N</i> -dicyclohexylaminométhyl)propargylglyciny]-D-Phe-Lys-NH ₂	0.964
240c His-D-Trp-Ala-Aza[(<i>N</i> -methyl, <i>N</i> -benzylaminométhyl)propargylglyciny]-D-Phe-Lys-NH ₂	1.95
240d His-D-Trp-Ala-Aza[(<i>N</i> -morpholinométhyl)propargylglyciny]-D-Phe-Lys-NH ₂	0.549
240e His-D-Trp-Ala-Aza[(<i>N,N</i> -diisopropylaminométhyl)propargylglyciny]-D-Phe-Lys-NH ₂	0.513
240f His-D-Trp-Ala-Aza[(<i>N,N</i> -diallylaminométhyl)propargylglyciny]-D-Phe-Lys-NH ₂	0.792

Tous les analogues [azaLys⁴]-GHRP-6 ont démontré une hausse relative d'affinité d'un facteur de 1.5-7 pour le récepteur CD36 comparativement à GHRP-6. En comparaison avec [azaTyr⁴]-GHRP-6, un des meilleurs analogues dont nous avons discutés dans le chapitre 2, les petidomimétiques **240d-f** ont démontré une hausse d'affinité pour le récepteur CD36 d'un facteur de 2-3, alors que les azapeptides **240a-b** ont démontré une baisse d'un facteur de 1-2. En général, ce ne sont pas des variations de K_d très significatives; cependant, il semblerait qu'une chaîne latérale aromatique ne soit pas essentielle à la position Trp⁴ du peptide GHRP-6 pour maintenir une affinité pour le récepteur CD36. Les analogues [Lys⁴]-GHRP-6 et [D-Lys⁴]-GHRP-6 seront synthétisés sous peu.

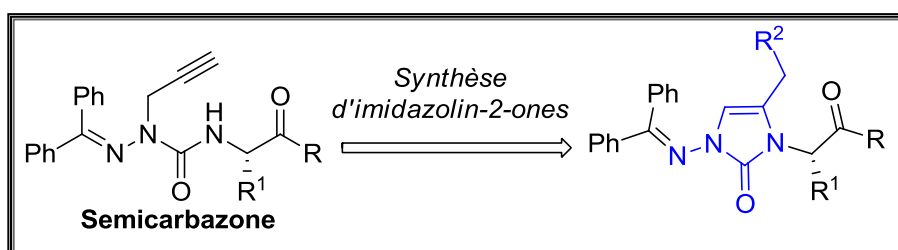
5.9 Conclusion et perspective

Ce chapitre a décrit la diversification d'une sous-unité aza-propargylglycine, via une réaction de cycloaddition alcyne-azoture et un couplage A³, fournissant des mimes de tryptophane et de lysine. La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire a été effectuée directement sur support solide à la position Trp⁴ du GHRP-6 afin de donner sept composés [aza-1-aryl, 2, 3-triazole-3-alanine⁴]-GHRP-6. Ces analogues ont démontré une hausse d'affinité pour le récepteur CD36 d'un facteur de 3-15 en comparaison avec le GHRP-6. Aussi, la fonctionnalisation de la chaîne latérale propargyle d'un aza-dipeptide en solution via un couplage A³, suivie par la déprotection de l'ester en C-terminale et l'incorporation de la sous-unité sur support solide, a fourni six analogues [aza-(aminométhyl *N,N*-disubstitué)propargylglycine⁴]-GHRP-6. Ces derniers ont démontré une hausse d'affinité d'un facteur de 1.5-7 pour le récepteur CD36, comparativement au GHRP-6. Certains de ces dérivés nous ont permis d'identifier des ligands avec une meilleure affinité pour le récepteur CD36 que [azaTyr⁴]-GHRP-6.

Puisque certains analogues ont également démontré une légère hausse d'affinité pour le récepteur CD36 comparativement au peptide [azaTyr⁴]-GHRP-6, il serait intéressant de réduire la triple liaison en un alcène *cis* et *trans* substitué et en l'alkane correspondant afin d'étudier l'effet de l'alcyne sur l'affinité de liaison ligand-récepteur.

Idéalement, il faudrait aussi synthétiser l'analogue azaLys sans substitution sur l'azote ϵ , ainsi que les dérivés [Lys⁴]-GHRP-6 et [D-Lys⁴]-GHRP-6. D'un point de vue biologique, il serait également intéressant d'étudier le comportement des meilleurs dérivés dans un essai cellulaire en collaboration avec Dr Huy Ong.

Chapitre 6: Synthèse de *N*-amino-imidazolin-2-ones en tant que mimes peptidiques



Mise en contexte de l'article 4 :

Le présent chapitre vise à diversifier l'alcyne d'un résidu aza-propargylglycine via une réaction de cyclisation *5-exo-dig* comme étape clé afin d'accéder à un nouveau type de mimes peptidiques, les *N*-amino imidazolin-2-ones (Figure 6.1). Conceptuellement, ceux-ci pourraient agir en tant qu'hybride de lactames de Freidinger (Figure 6.2) et d'azapeptides, où la chaîne principale serait rigidifiée à la fois par la présence du cycle et par la répulsion électronique des deux atomes d'azote adjacents. Une réaction de couplage Sonogashira avant la réaction de cyclisation permettrait d'obtenir des dérivés *N*-amino imidazolin-2-ones substitués par un groupement aryle à la position 4 de l'hétérocycle, qui pourraient alors agir comme mimes rigidifiés d'acides aminés avec chaînes latérales aromatiques (Phe, Tyr, Trp, His).

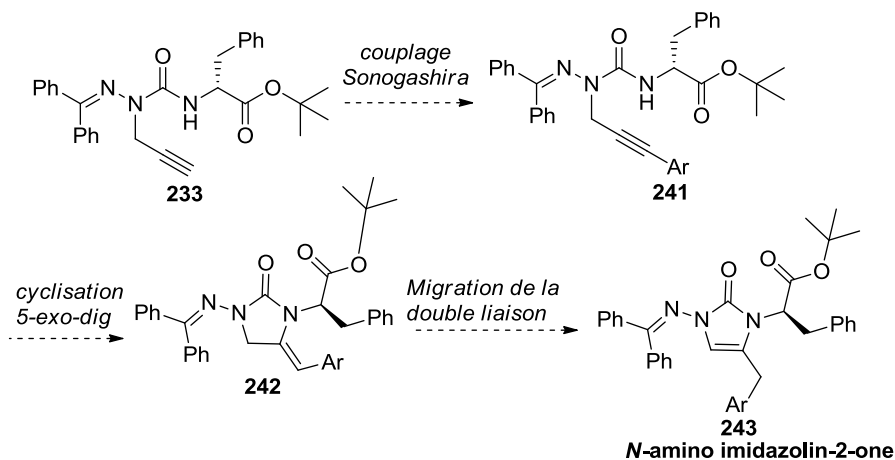


Figure 6.1. Stratégie envisagée pour la synthèse de *N*-amino imidazolin-2-ones.

6.1 GHRP-6 et les α -amino- et β -amino γ -lactames

Les α -amino γ -lactames (Agl), communément appelés « lactames de Freidinger»,²⁰⁵ ont été conçus pour rigidifier la chaîne principale d'un dipeptide en une conformation en repliement β de type II'. Cette rigidification est une conséquence des contraintes structurelles imposés par le cycle sur les angles dièdres ω (trans) et ψ ($-125 \pm 10^\circ$), et de la

stéréochimie des C α H (Figure 6.2, à gauche).²⁰⁶ Leur utilité a initialement été démontrée par la synthèse de l'analogue de LHRH *p*-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-(*S*)-Agl-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂, qui a causé une hausse de puissance *in vitro* d'un facteur de 8.9 en comparaison avec le peptide parent.²⁰⁵ Les β -amino γ -lactames (Bgl), qui sont moins fréquemment étudiés, ont tout de même généré des analogues peptidiques intéressants (Figure 6.2, à droite). Par exemple, l'incorporation d'un résidu (*S*)Bgl à la position Asp⁴ d'un analogue térapeptide de la Cholecystokinine (CCK) (Boc-Trp-Lys(Tac)-Asp-*N*(Me)-Phe-NH₂, Tac = *o*-tolylaminocarbonyl), a fourni un peptidomimétique avec activité agoniste et sélectivité élevées pour le récepteur CCK-A (pancréatique).²⁰⁷

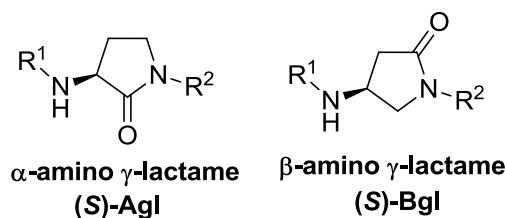


Figure 6.2. Structures d' α -amino γ -lactames et de β -amino γ -lactames.

Mes collègues de laboratoire Dr Andrew Jamieson et Dr Nicolas Boutard ont effectué un balayage du peptide GHRP-6 avec des α -amino γ -lactames (Agl) et β -amino γ -lactames (Bgl),²⁰⁸ en parallèle avec notre balayage d'acides aminés « aza » (Chapitre 2). Les résultats des études SAR ont révélé His-D-Trp-(*S*)Agl-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ comme seul analogue avec affinité pour le récepteur CD36 dans l'ordre du micromolaire (par expériences de compétition, laboratoire de Dr Huy Ong). En effet, en comparaison avec l'analogue [azaPhe⁴]-GHRP-6, qui avait démontré une affinité avec IC₅₀ de 1.34 x 10⁻⁶ M pour le récepteur CD36, les analogues [(*S*)Agl⁴ et (*S*)Bgl⁴]-GHRP-6 ont tous deux provoqué une baisse d'affinité pour le récepteur CD36 d'un facteur supérieur à 10. Outre les considérations conformationnelles, la perte du caractère aromatique de la chaîne latérale du résidu Trp⁴ à cette position pourrait se traduire en une perte d'enthalpie de liaison ligand-récepteur et contribuer à la baisse d'affinité observée.

Pour s'adresser à cette lacune, nous avons cherché à synthétiser des peptidomimétiques comprenant une sous-unité 4-benzyl *N*-amino-imidazolin-2-one à la position Trp⁴ du peptide GHRP-6. Idéalement, ces derniers combindraient les propriétés avantageuses des azapeptides (contrainte électronique, préservation d'une chaîne latérale) et des lactames de Freidinger (contrainte structurale) pour donner un analogue avec affinité supérieure pour le récepteur CD36 (Figure 6.3).

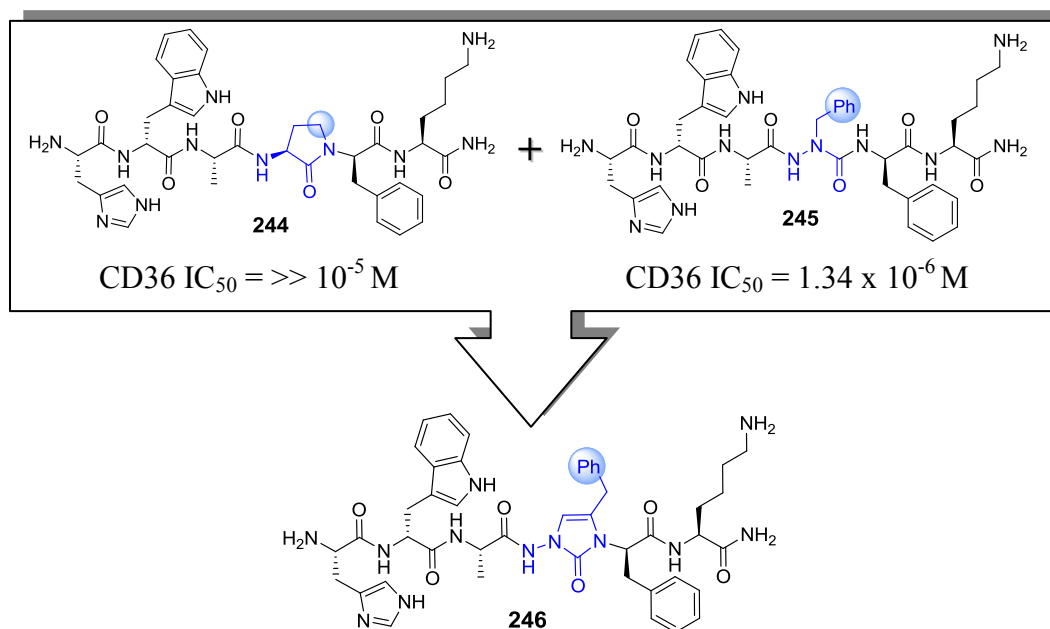


Figure 6.3. Conception du mime peptidique [4-benzyl *N*-amino-imidazolin-2-one⁴]-GHRP-6 en tant qu'hybride d'azapeptide et de lactame de Freidinger.

Afin d'y parvenir, nous avons opté pour une stratégie faisant appel à la diversification en solution d'un résidu aza-propargylglycine *tert*-butyl ester par (1) un couplage Sonogashira, suivi par (2) une cyclisation *5-exo-dig*. La réaction de couplage Sonogashira étant bien établie, nous nous sommes d'abord attardés à la réaction de cyclisation de la propargylurée.

6.2. Cyclisation 5-*exo dig* de propargylurées et *O*-propargylcarbamates

Il existe quelques exemples de cyclisations 5-*exo-dig* qui utilisent des propargylurées et des *O*-propargylcarbamates relativement peu substitués comme substrats de départ (Figure 6.4).^{209,210,211,212,213,214} La plupart des exemples font appel à un métal, tel que l'argent,²⁰⁹ le palladium,²¹⁰ l'or,²¹¹ ou le cuivre,²¹³ pour la complexation- π de l'alcyne afin d'augmenter l'électrophilicité de la liaison triple. Lorsque le palladium est utilisé, l'aminopalladation, résultant d'une attaque *trans* de la tosylé amine sur l'alcyne activée, peut être suivie d'une insertion d'alcène avant l'étape de protonolyse du lien carbone-palladium (Figure 6.4, **249**).²¹⁰

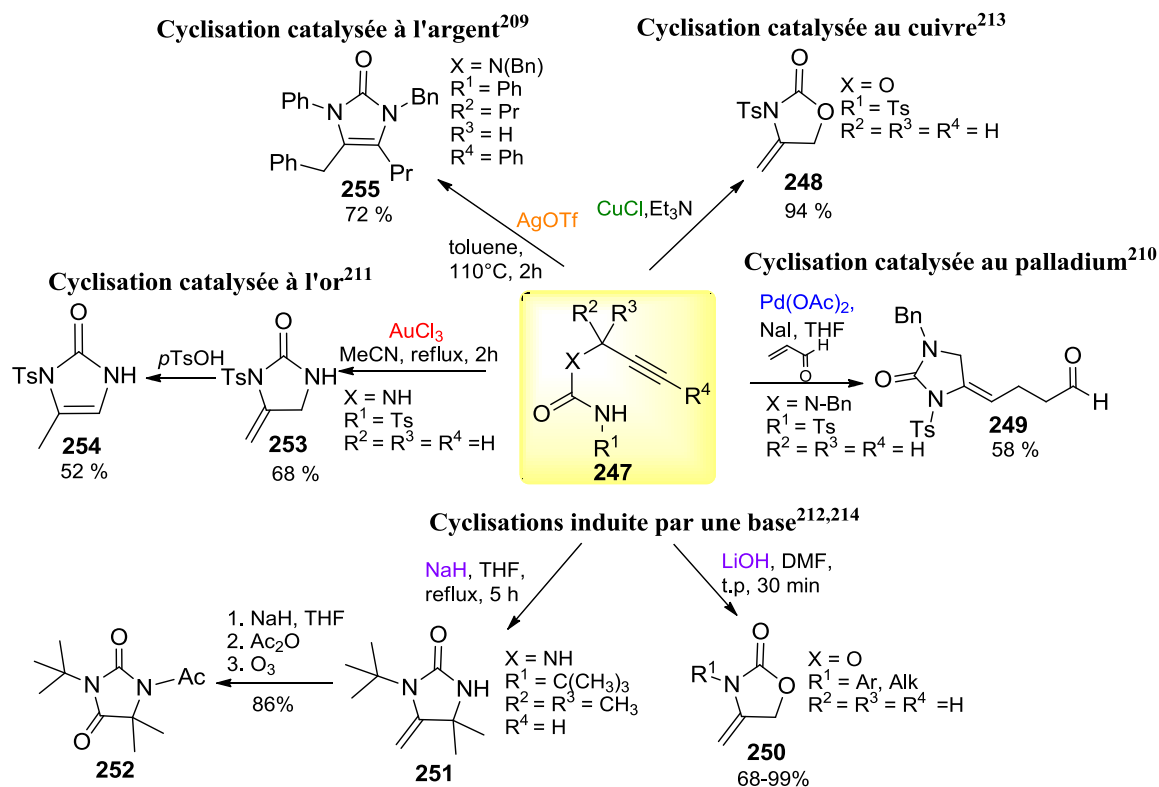


Figure 6.4. Stratégies pour la cyclisation 5-*exo dig* de propargylurées ou *O*-propargyl carbamates.

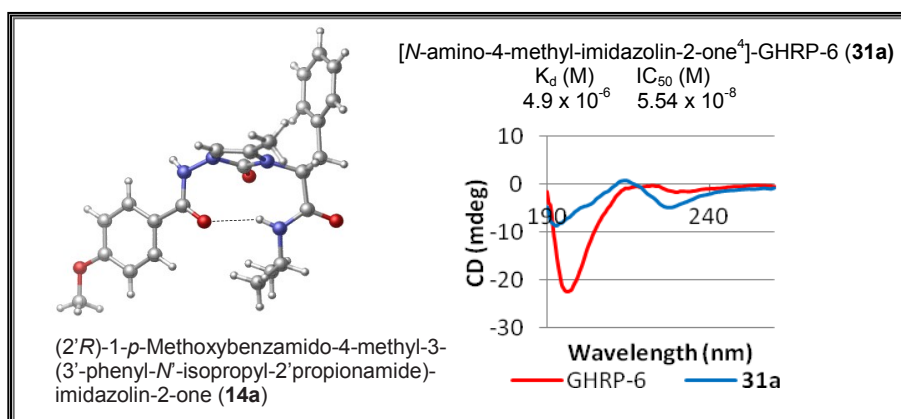
D'autres stratégies font simplement appel à une base, en quantité catalytique ou stoechiométrique, pour induire la cyclisation de la propargylurée ou de l'*O*-propargylcarbamate.^{212,214} Dans le cas de la cyclisation pour donner **250**, où $R^1 = \text{Ph}$, il a été démontré que la réaction procédait jusqu'à complétude lorsque la base employée était soit l'hydroxyde de potassium, l'hydroxyde de lithium, ou le *tert*-butoxide de potassium. D'autre part, en utilisant une base organique telle que la 4-diméthylaminopyridine (DMAP), la pyridine ou la triéthylamine, aucune réaction n'a été observée.²¹⁴

Dans la plupart des cas la réaction de cyclisation *5-exo-dig* a lieu sur un alcyne terminal, à l'exception de la cyclisation catalysée à l'argent qui a pu fournir des imidazolin-2-ones tétrasubstituées en utilisant les alcynes disubstitués correspondants comme matériel de départ (Figure 6.4, **255**). Certains cas rapportent une migration rapide de la double liaison exocyclique à une double liaison endocyclique thermodynamiquement favorable (isolée), alors que d'autres décrivent l'ajout d'acide para-toluènesulfonique (*p*TsOH) pour promouvoir la migration de la liaison exocyclique à l'intérieur du cycle.

Prenant en considération que notre substrat, une sous-unité aza-propargylglycine-D-Phe-*Ot*Bu protégée par une hydrazone dérivée du benzophénone en *N*-terminale (Figure 6.1, **233**), serait éventuellement soumis à des conditions acides pour la déprotection de l'ester de *tert*-butyle, la migration de la double liaison exocyclique pourrait avoir lieu à cette étape si celle-ci n'était pas complète après la cyclisation. Le plus grand défi était donc de déterminer quelles conditions parviendraient à promouvoir la cyclisation *5-exo-dig* de notre semicarbazone afin d'obtenir l'imidazolin-2-one. Une fois obtenus, il resterait à valider l'utilisation de tels hétérocycles en tant que peptidomimétiques. Les résultats de cette recherche sont décrits dans l'article 4.

Article 4:

Proulx, C.; Lambert-Lanteigne, P.; Pruneau, M.; Masson, J.-F.; Ong, H.; Lubell, W. D. *N*-Amino imidazolin-2-one Peptide Mimics: Diversity-Oriented Synthesis, Conformational Analysis and Bioactivity. Prêt à être soumis.



***N*-Amino imidazolin-2-one Peptide Mimics: Diversity-Oriented Synthesis,
Conformational Analysis and Bioactivity**

*Caroline Proulx,[†] Patrick Lambert-Lanteigne,[§] Michael Pruneau,[†] Jean-François
Masson,[†] Huy Ong,[§] and William D. Lubell^{*†}*

[†]Département de Chimie and [§]Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, C.P. 6128,
Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7.

Abstract

4-Substituted *N*-amino-imidazolin-2-one peptide mimics were synthesized by base-promoted 5-*exo-dig* cyclization of aza-propargylglycines. X-ray crystallography of *N*-amino-imidazolin-2-one model peptide **14** revealed a preferred type II' β turn conformation. Introduction of aromatic substituents by a Sonogashira coupling/cyclization sequence afforded diverse 4-position analogs, including constrained Phe and Trp mimics. Studying Growth Hormone Releasing Peptide-6 (GHRP-6), Trp⁴ was replaced by 4-methyl- and 4-benzyl-*N*-amino-imidazolin-2-ones. [*N*-amino-4-methylimidazolin-2-one⁴]-GHRP-6 **32a** exhibited a circular dichroism spectrum consistent with a β -turn conformation, affinity for the CD36 receptor, and inhibitory activity on MAP kinase JNK phosphorylation, all demonstrative of a bioactive conformer for modulating scavenger receptor activity. *N*-Amino-imidazolin-2-ones represent a new class of effective turn mimic, which can be functionalized and installed into biologically relevant peptides for exploring conformation-activity relationships.

Keywords

N-Amino-imidazolin-2-one, peptide mimicry, β turn, azapeptide, α -amino- γ -lactam, 5-*exo-dig* cyclization, aza-propargylglycine, semicarbazone, GHRP-6, CD36 receptor.

Introduction

Precise three-dimensional folding of proteins and peptides is essential for function. Identification of such biologically active conformations is critical for developing therapeutics based on peptide structures. Geometrically restricted analogs are thus valuable tools, because they reduce energetic costs for folding into binding conformations, and may thereby improve potency, receptor selectivity and metabolic stability.

Heterocyclic and benzoic acid hydrazide templates have been particularly valuable for studying peptide sequences, because they may stabilize turn, sheet and helical conformations (Figure 1),¹ due to their capacity to (1) template hydrogen bond acceptor-donor pairing, (2) control dihedral angle geometry and (3) improve binding pocket occupancy. For example, α -amino- γ -lactams, so-called Freidinger-Weber lactams,² have been commonly introduced into peptide sequences to induce turn conformations by covalent constraint of the peptide backbone.

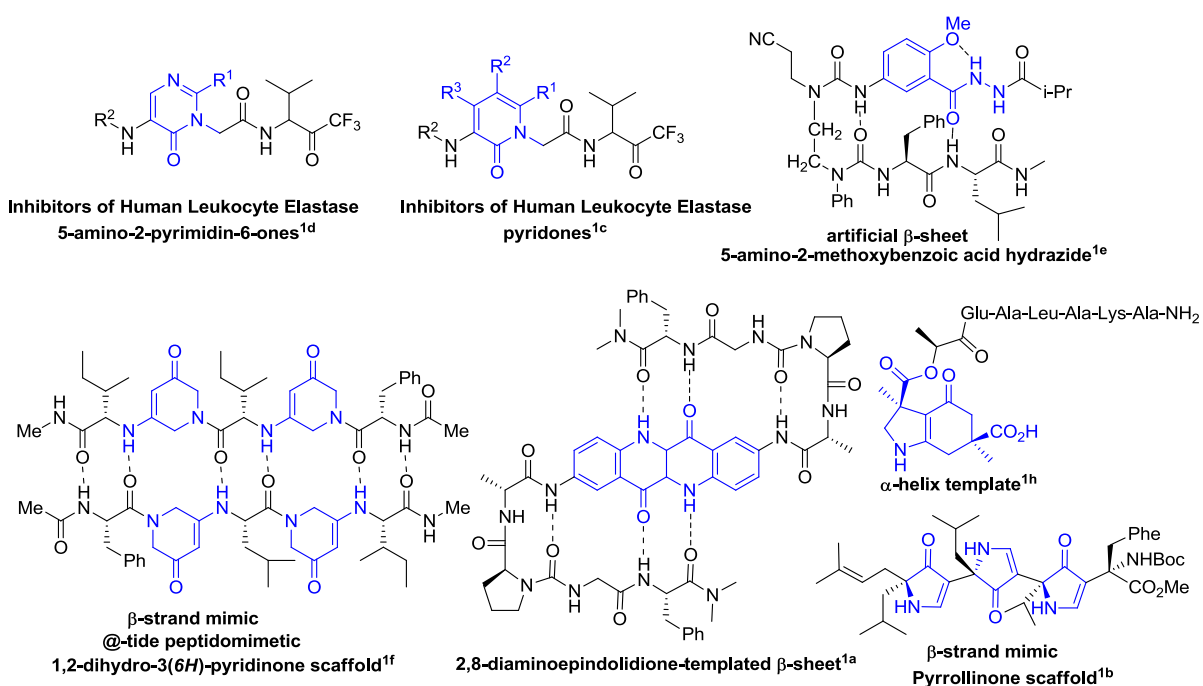


Figure 1. Use of benzoic acid hydrazide- and heterocycle-peptide hybrids as rigid frameworks for controlling folding.

Typically, α -amino- γ -lactams lack, however, side-chain functions, which may translate into a loss of binding and activity. On the other hand, aza analogs of amino acids in which the CH_α has been substituted by a nitrogen atom,³ maintain side chain diversity and owe their increased rigidity to the lone pair-lone pair electronic repulsion of the adjacent nitrogen atoms and the planar geometry of the urea, which restrict the ϕ and ψ dihedral angles, respectively. Combining the covalent constraints of α -amino- γ -lactams with the electronic restrictions and side-chain diversity of aza amino acids, a strategy has now been devised to synthesize substituted *N*-amino-imidazolin-2-ones as novel heterocyclic templates, which may induce turn geometry (Figure 2).

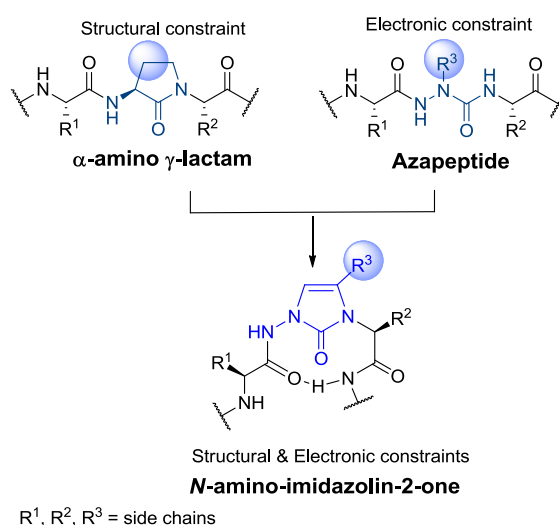


Figure 2. Conception of *N*-amino-imidazolin-2-one turn mimics.

Imidazolin-2-ones have demonstrated wide utility as antitumor agents,⁴ antibacterial MurB inhibitors,⁵ human dopamine D_4 receptor antagonists,⁶ CGRP receptor antagonists,⁷ antioxidants,⁸ and as unnatural base pairs for expanding the genetic code.⁹ Furthermore, combinatorial approaches for imidazolinone library synthesis have been developed to further exploit the potential of this privileged pharmacologically active heterocycle.¹⁰ To the best of our knowledge, however, the synthesis and biological evaluation of *N*-amino-imidazolin-2-one peptidomimetics has not been explored.

Focused on developing diversity-oriented strategies for the synthesis of constrained peptide analogs to study conformation-activity relationships, ideally by solid-phase chemistry, we introduced recently a submonomer combinatorial approach for azapeptide library synthesis, which surmounted issues of hydrazine chemistry.¹¹ Notably, submonomer azapeptide synthesis has given access to side-chains inaccessible by traditional methodology,¹¹ including propargyl, allyl and (hetero)aryl moieties.¹² Examining the reactivity of the propargyl side-chain, a library of peptide mimics possessing aza-1,2,3-triazole-3-alanine residues was previously synthesized by a copper-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition approach.¹³ Considering the potential for a *5-exo-dig* cyclization of the urea nitrogen onto the aza-propargylglycine side chain, we now report methodology to access *N*-amino imidazolin-2-ones as constrained alanine mimics. Moreover, by employing the propargyl side chain in Sonogashira cross-coupling reactions prior to cyclization, substituted *N*-amino-imidazolin-2-ones were produced with potential to serve as constrained phenylalanine and tryptophan mimics. The ability for the *N*-amino-imidazolin-2-one moiety to serve as a constrained turn mimic was subsequently evaluated in the solid state by X-ray crystallographic analysis of a tetrapeptide model, as well as in solution by circular dichroism (CD) spectroscopy of analogs of growth hormone releasing peptide-6 (GHRP-6), which were further examined in biological assays.

In sum, the combination of versatile synthetic methodology, detailed conformational analysis and examination in a biologically relevant peptide has demonstrated *N*-amino-imidazolin-2-ones to be powerful tools for examining conformation-activity relationships and preparing therapeutic peptide analogs.

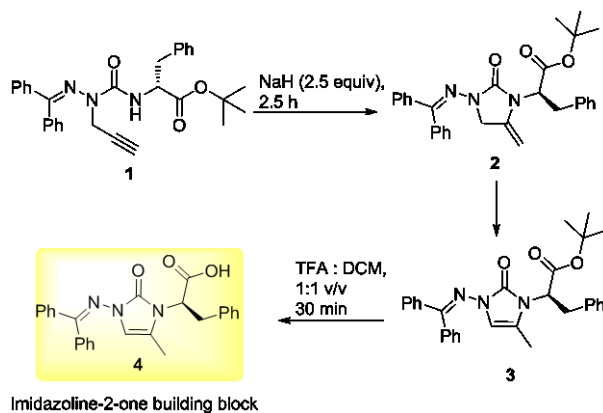
Results and Discussion

Although simple imidazolin- and imidazolidin-2-one heterocycles have respectively been prepared by base-promoted *5-exo-dig* cyclizations of propargylic and allylic ureas,¹⁴ annulation typically necessitated activation of the π -system using transition metal salts (i.e. silver,¹⁵ palladium,¹⁶ and gold complexes¹⁷), as well as toluenesulfonyl protection of the

nucleophilic urea-nitrogen. For example, cyclic amino acids, such as dehydroprolines had been prepared respectively by palladium- and silver-catalyzed *5-endo dig* cyclization of *N*-Ts- and Boc-protected propargylglycine analogs.^{18,19} Although these precedents were encouraging, the influences of the hydrazine- and chiral alkyl-substituted residues on the cyclization of the urea nitrogen of aza-propargylglycine analogs proved to be challenges in the construction of *N*-amino-imidazolin-2-one peptide mimics (Table 1).

As a model for exploring cyclization conditions, aza-propargylglycine dipeptide **1** was prepared by a route featuring chemoselective alkylation of benzhydrylidene azaglycyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester **7** with propargyl bromide.²⁰ In the alkylation, the number of equivalents of potassium *tert*-butoxide was limited to circumvent racemization. Specifically, when using high quality potassium *tert*-butoxide (99.2% purity), 110 mol% of base led to 32% racemisation, whereas the use of 95 mol% reduced racemization significantly (12%, see supporting information).

Initial attempts to effect the *5-exo-dig* cyclization of azadipeptide **1** using homogeneous gold catalysis [*(t*-Bu)₂(*o*-biphenyl)PAuCl (5 mol %) and AgOTf (5 mol%)] failed, likely because the urea nitrogen was insufficiently nucleophilic. *N*-Amino-imidazolin-2-one **2** was however obtained in 81% yield, by adding 2.5 equivalents of NaH to the mixture containing **1** and the cationic gold complex formed *in situ* in acetonitrile for 2 h (Table 1, entry 3). The impact of gold catalysis was deemed negligible, because **2** was produced in 73% yield on reaction of **1** with 2.5 equivalents of NaH in acetonitrile without catalyst (Table 1, entry 1). In the *5-exo-dig* cyclization, an exocyclic double bond was first produced and migration of the double bond inside the ring furnished the thermodynamically more stable *N*-amino-imidazolin-2-one **3**. Acetonitrile proved best as solvent, and excess base was necessary for higher reaction yields.

Table 1. Synthesis of *N*-amino imidazolin-2-one building block **4**.

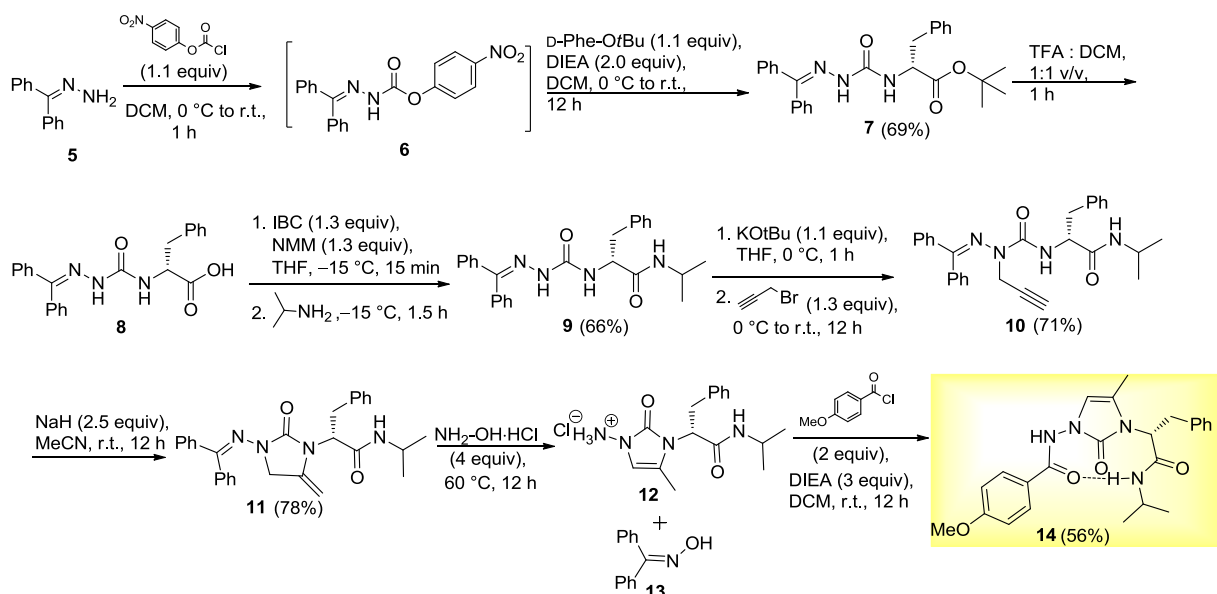
entry	solvent	temperature	yield of 2+3 ^b (%)	starting material (%)
1	MeCN	rt	73	10
2	MeCN	60 °C	75	0
3 ^a	MeCN	rt	81	0
4	THF	rt	55	33
5	Dioxane	rt	16	89
6	DMF	rt	33	0
7	Toluene	rt	0	100

^aReaction performed with (*t*-Bu)₂(*o*-biphenyl)PAuCl (5 mol %) and AgOTf (5 mol%).

^bNMR Yield using 1,3,4 trimethoxybenzene as internal standard.

With these cyclization conditions in hand, *N*-acyl amino imidazolin-2-one amide **14** was synthesized to study the conformation of this model system in the solid state and in solution, using X-ray crystallography and NMR spectroscopy, respectively (Scheme 1). Benzhydrylidene aza-glyciny-D-phenylalanine isopropyl amide **9** was prepared from benzhydrylidene aza-glyciny-D-phenylalanine *tert*-butyl ester **7** by *tert*-butyl ester cleavage in a 1:1 v/v mixture of TFA: DCM, followed by coupling to *iso*-propylamine using a mixed anhydride approach.²⁰ Use of amide **9** in the alkylation and cyclization steps minimized racemization, likely due to preferential amide nitrogen deprotonation inhibiting removal of the α -hydrogen. Indeed, in comparison to the alkylation of aza-glyciny-D-phenylalanine *tert*-butyl ester **7**, the chemoselective alkylation of semicarbazone **9** gave aza-propargyl

glycinamide **10** in 71% yield without detectable racemization (see supporting information). Subsequent NaH-promoted *5-exo-dig* cyclization gave imidazolin-2-one **11**, possessing an exocyclic double bond, in a 78% yield. Olefin migration occurred upon hydrazone removal, using hydroxylamine hydrochloride in pyridine,¹¹ to afford *N*-amino imidazalone **12**, which without further purification was treated with 4-methoxybenzoyl chloride to provide *N*-acyl dipeptide amide **14** in 56% yield.



Scheme 1. Synthesis of *N*-acyl amino imidazolin-2-one *iso*-propyl amide **14**.

Crystals of **14** were grown by slow diffusion of hexanes into an ethyl acetate/chloroform mixture. X-ray diffraction revealed two preferred turn conformations in the solid state (Figure 3). One structure, **14a** exhibited ϕ and ψ dihedral angles characteristic of a type II' β -turn, with an intramolecular ten-member hydrogen bond between residues i and $i + 3$ and a distance of 3.01 Å. The second structure, **14b** deviated from that of **14a** primarily by rotation of the ψ_{i+2} dihedral angle, which positioned the *iso*-propylamide in an orientation to favor dihedral angle geometry and a seven-membered hydrogen bond characteristic of an inverse γ turn. The X-ray data for **14** has been compared with ideal turn geometry as well as with crystal structures of azapeptide and α -amino- γ -

lactams, which also adopt turn conformations (Table 2).^{21,22,23} In contrast to amino lactams, the planar geometry of the *N*-amino-imidazalone causes the ψ_{i+1} dihedral angle to deviate by 33-46° from that of an ideal type II' β -turn (120°).

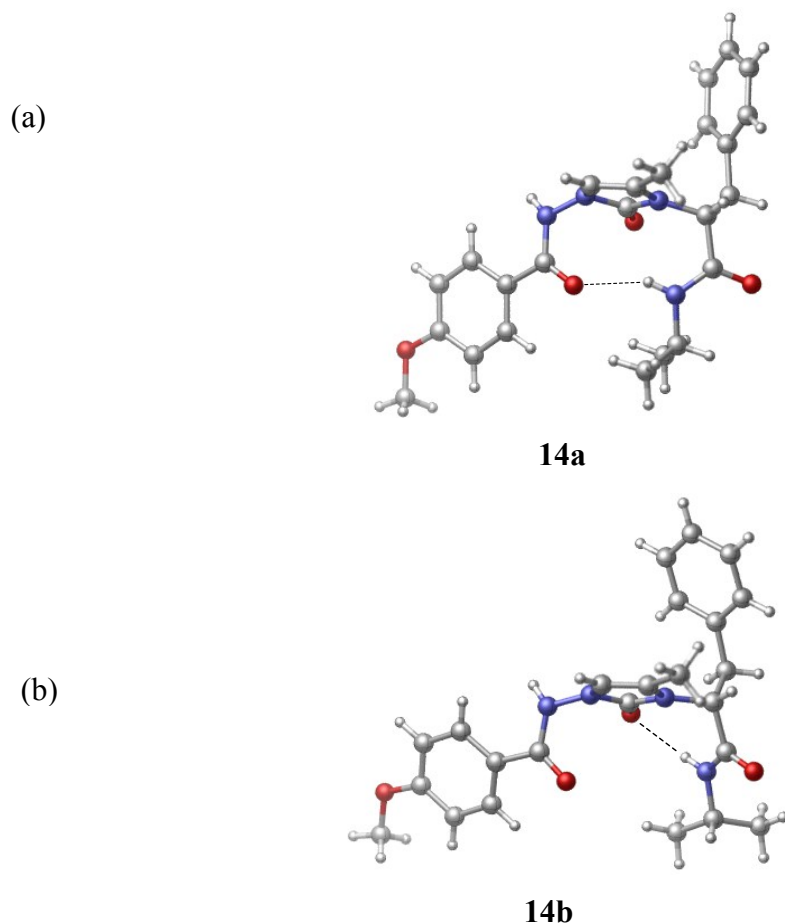


Figure 3. X-ray structures of *N*-acyl amino imidazolin-2-one *iso*-propyl amide **14**. (a) Broken line represents an inferred hydrogen bond between the C(O) of the *p*-methoxy benzoyl carbonyl and the NH of the isopropyl amide. (b) Broken line represents an inferred hydrogen bond between the carbonyl of the imidazolin-2-one and the NH of the isopropyl amide.

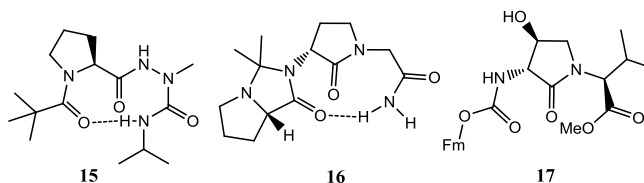


Table 2. ϕ and ψ dihedral angles (in degrees) for ideal β -II, β -II', and γ -turns compared with those from crystal structures of **14-17**.

Type of turn	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}
β -II	-60	120	80	0
β -II'	60	-120	-80	0
γ	n/a	n/a	70	-60
Inverse γ	n/a	n/a	-70	60
14a	58.9	-153.3	-69.1	-4.6
14b	62.1	-166.1	-71.7	65.7
15	-55.4	120.9	89.3	17.8
16	-42	133	89	-6.9
17	-40	116	96	-97

In azapeptides, the α -nitrogen may adopt planar or pyramidal geometry depending on sequence, with preferences for type I, II, and VIa β -turns, in which the aza residue often neighbors a turn-inducing proline residue. Similarly, the *N*-amino imidazolinone residue may assume type II or II' geometry contingent on the stereochemistry of the *C*-terminal residue. In contrast, α -amino- γ -lactam-containing peptides (i.e., **16** and **17**) adopt type II or II' β -turns contingent on the α -carbon stereochemistry of both the amino lactam and the *C*-terminal residue.²³

The conformation of *N*-amino imidazolin-2-one **14** was also studied in solution using NMR spectroscopy. Initially, variations in the amide proton chemical shifts of **14** were monitored as a function of concentration in CDCl₃ between 1 mM and 20 mM, which indicated the invariability of the isopropylamide NH signal, suggesting that no aggregation occurred at the studied concentrations (see supporting information). By measuring the amide chemical shift values as a function of DMSO-*d*₆ % in CDCl₃, the isopropylamide NH signal demonstrated very little variation (0.45 ppm) going from 1 to 100% DMSO-*d*₆,

whereas the benzamide chemical shift varied by 1.21 ppm (Figure 4). These results are consistent with solvent-shielded (hydrogen-bonded) and solvent-exposed hydrogens,²⁴ as well as with the X-ray crystal structures of **14**.

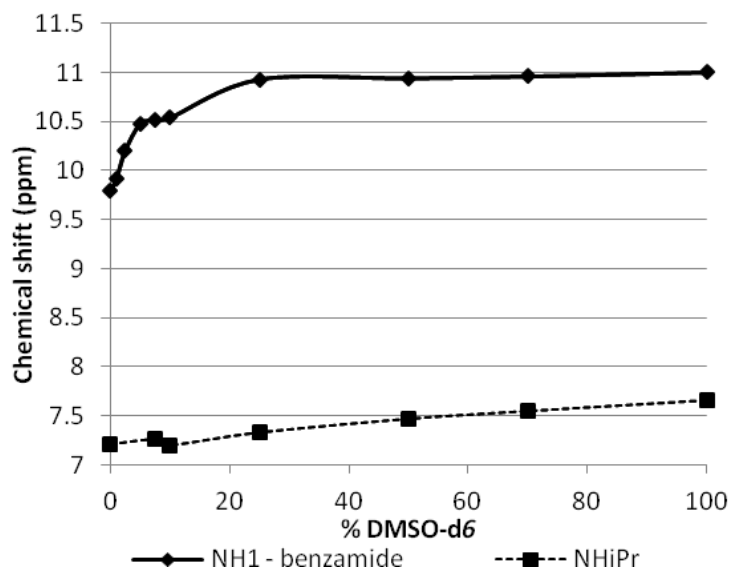


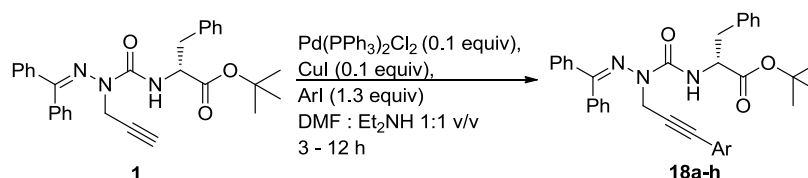
Figure 4. NH chemical shift variation versus DMSO-*d*₆ percentage in CDCl₃/DMSO-*d*₆ mixtures for **14**.

Furthermore, although the absence of the C α H in the aza residue of **14** handicapped two-dimensional NOESY experiments designed to ascertain transfer of magnetization between proximal protons in a folded conformation, the relative strength of the hydrogen bond involving the isopropyl amide NH compared with the benzamide NH was indicated by its slow rate of exchange with solvent in 10% wet DMSO-*d*₆ in CDCl₃.

In order to prepare *N*-amino indolizidinones possessing side-chains, attention was turned towards the modification of the aza-propargylglycine residue, with the inherent goal to access constrained Phe, Tyr, Trp and His peptidomimetics. Sonogashira couplings were performed on dipeptide **1**, using the appropriate aryl iodides, Pd(PPh₃)₂Cl₂, and CuI in a 1:1 DMF:Et₂NH mixture (Table 3). Electron rich and electron poor aryl iodides as well as *N*-

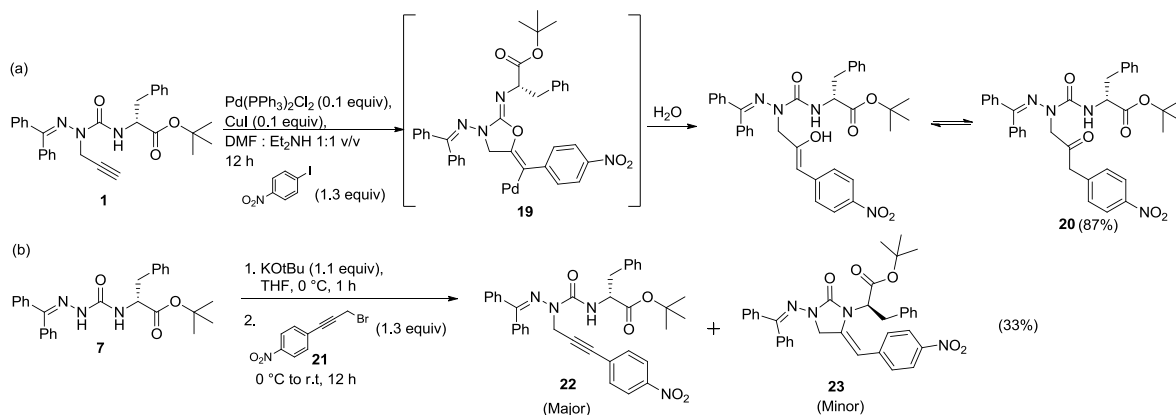
protected indole and imidazole iodides, all reacted in the coupling reaction to furnish the desired products in 50-93% yields.

Table 3. Sonogashira coupling of aryl iodides and aza-propargylglycine dipeptide **1**.



entry	product	aryl iodide	yield (%)
1	18a		87
2	18b		85
3	18c		60
4	18d		90
5	18e		93
6	18f		80
7	18g		65
8	18h		50

Alternatively, under the same reaction conditions, 4-iodonitrobenzene failed to give the desired Sonogashira adduct; instead, ketone **20** was obtained in 87% yield after purification by silica gel chromatography (Scheme 2). In the Sonogashira reaction, the electrophilic 4-nitrophenyl-substituted alkyne may have undergone an oxapalladation reaction to afford intermediate **19**, which may be hydrolyzed to ultimately give ketone **20**. Consequently, alkyne **22** was prepared from aza-glycynyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester **7** by alkylation with 1-(3-bromoprop-1-ynyl)-4-nitrobenzene (**21**) using potassium *tert*-butoxide.¹¹

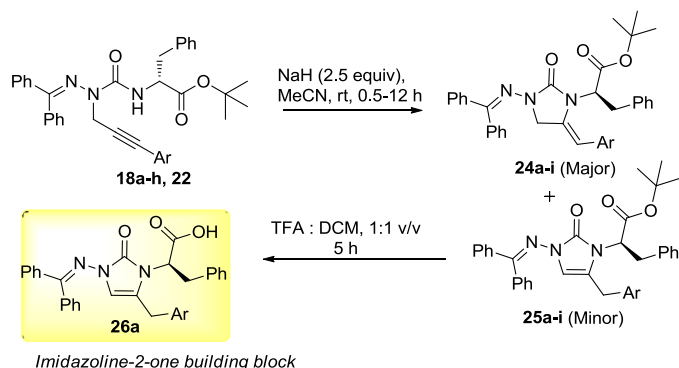



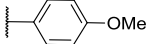
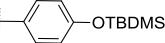
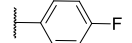
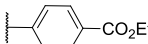

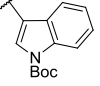
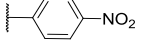
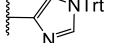
Scheme 2. (a) Synthesis of ketone **20** using Sonogashira coupling conditions. (b) Synthesis of alkyne **22** via the alkylation route.

With nine aza-propargylglycines **18** in hand, the synthesis of substituted *N*-aminoimidazolin-2-ones was pursued employing our base-promoted *5-exo-dig* cyclization strategy. Product mixtures possessing endocyclic and exocyclic double bonds were obtained from the cyclization of aryl-substituted alkynes **18**. For example, imidazolin-2-ones **24a** and **25a** were isolated as isomeric mixtures in 69% yield. Although either *Z* or *E* geometry were possible for **24**, a through-space interaction between the vinyl proton and the methylene of imidazolidinone **24d** in a two-dimensional NOESY experiment revealed exclusive exocyclic *Z* double bond geometry. Finally, the acidic conditions for cleavage of the *tert*-butyl ester promoted double bond migration inside the five member ring to furnish **26a** (Table 4). Partial racemization (e.r. 74:26) of the phenylalanine *tert*-butyl ester was observed, likely due to the alkaline cyclization conditions (see supporting information). The extent of racemization was consistent with that previously observed (e.r. 88:12 – 85:15) after NaH-promoted cyclizations of phenylalanine-containing methionine-sulfonium dipeptides, to provide α -amino- γ -lactams.²⁵ Attempts at a one-pot aminopalladation/cross-coupling reaction sequence failed to synthesize *N*-amino imidazolin-2-one **24a** using Pd(PPh₃)₄, iodobenzene, and a variety of bases; instead, Sonogashira adduct **18a** was isolated.

Employing the various aryl substituted acetylenes in the cyclization chemistry, a fluorine *p*-substituent was found to be well tolerated and gave the desired product in a similar yield (64%, Table 4, entry 4). Substrates with electron withdrawing substituents (i.e., trifluoromethyl and nitro) reacted rapidly giving complete consumption of starting material, albeit with lower yields due to decomposition. In the case of the nitro substituent, partial cyclization was observed under the alkylation conditions (Scheme 2b). On the other hand, electron rich substituents exhibited poor reactivity. For example, *aza-p*-methoxyphenylpropargylglycine **18b** afforded the desired *N*-amino imidazolin-2-one in only 10% yield with recovery of starting material (Table 4, entry 2). Silyloxyphenyl alkyne **18c** underwent a base-promoted deprotection of the silyl group, without cyclization. Imidazolyl alkyne **18i** failed to react under the reaction conditions returning starting material exclusively. In contrast, *N*-Boc-3-indolyl alkyne **18g** underwent base-promoted cyclization to afford constrained tryptophan mimic imidazolin-2-one **24g** in 40% yield with recovery of starting material.

Table 4. Synthesis of substituted *N*-amino imidazolin-2-one building blocks.



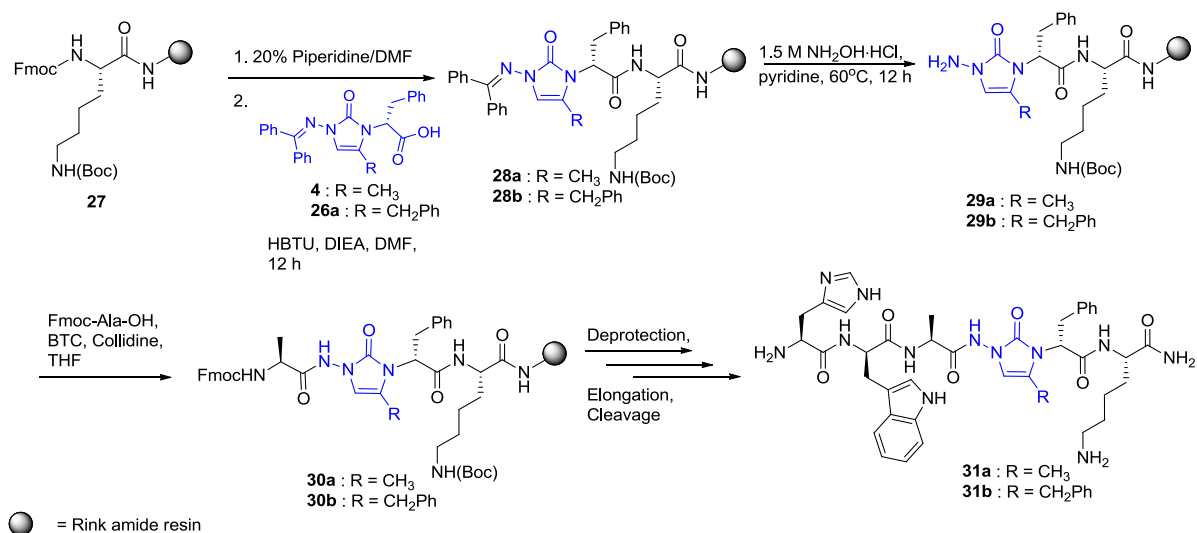
entry	product	aryl	yield of 24 + 25 (%)
1	24a + 25a		69
2	24b + 25b		10
3	24c + 25c		0 ^a
4	24d + 24d		64
5	24e + 25e		42
6	24f + 25f		34
7	24g + 25g		40
8	24h + 25h		41
9	24i + 25i		0 ^b

^aThe only product observed resulted from deprotection of the TBDMS group. ^bStarting material was recovered.

The influences of the *N*-amino imidazolin-2-one mimics on peptide conformation and biology were examined by replacing the Trp⁴-D-Phe⁵ residues of GHRP-6 with imidazolin-2-one dipeptide building blocks **4** and **26a**. The synthetic hexapeptide GHRP-6 has been shown to exhibit affinity for two distinct receptors: the Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a (GHS-R1a)²⁶ and the Cluster of Differentiation 36 (CD36) scavenger receptor.²⁷ Towards the development of GHRP-6 analogs with improved stability and receptor selectivity for the CD36 receptor as potential treatments of age-related macular degeneration, [azaPhe⁴]-GHRP-6 was previously demonstrated to exhibit preferential CD36 receptor selectivity attributed to a β -turn conformation about the aza-residue, as demonstrated by CD spectroscopy in water.^{11a} In contrast, α - and β -amino- γ -lactam (Agl and Bgl) scans of the GHRP-6 peptide sequence produced [(*S*)-Agl⁴]- and [(*S*)-Bgl⁴]-GHRP-6 analogs with decreased affinity for both the GHS-R1a and CD36 receptors.^{2d,e} Loss of side-chain functionality from insertion of the Agl and Bgl residues

may be responsible for the observed drop in binding affinity. Similarly, the benzyl side chain in [azaPhe⁴]-GHRP-6 was crucial for maintaining high affinity for the CD36 receptor.^{11a} *N*-Amino imidazolin-2-ones **4** and **26a** were thus employed to furnish GHRP-6 analogs with restricted backbone and side chain geometry to achieve affinity for the CD36 receptor (Scheme 3).

Hydrazone-protected *N*-amino imidazolin-2-ones **4** and **26a** were respectively coupled to ϵ -(Boc)lysine linked to Rink amide resin using standard conditions (HBTU, DIEA). The hydrazone was removed using $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ in pyridine,¹¹ and the resulting semicarbazides were acylated with Fmoc-Ala activated using triphosgene to give the corresponding tetrapeptide resins **30a** and **30b**. Removal of the Fmoc group, peptide elongation and cleavage from the resin afforded *N*-amino imidazolin-2-one GHRP-6 analogs **31a** and **31b** with 71% and 68% crude purities, respectively.



Scheme 3. Solid-phase incorporation of *N*-amino imidazolin-2-ones **4** and **26a** at the Trp⁴-D-Phe⁵ position of GHRP-6.

Material of >99% purity was subsequently isolated using reverse-phase HPLC to afford peptides **31a** and **31b** in 10% and 5% overall yields, respectively (Table 5).

Table 5. Yields and purities of GHRP-6 analogs **31a** and **31b**.

peptide	crude purity ^a (%)	purity ^b (%)		yield ^c (%)	HRMS [M + 1] ⁺ or [M + 2] ⁺ ions	
		MeOH	MeCN		m/z (calcd)	m/z (obsd)
31a His-D-Trp-Ala-(4-Me- imidazolin-2-one)-D-Phe-Lys- NH ₂	71	>99	>99	10	392.2061	392.2075
31b His-D-Trp-Ala-(4-Bn- imidazolin-2-one)-D-Phe-Lys- NH ₂	68	>99	>99	5	859.4362	859.4364

^aRP-HPLC purity at 214 nm of the crude peptide in MeOH/H₂O containing 0.1% formic acid. ^b RP-HPLC purity at 214 nm of the purified peptide in MeOH/H₂O and MeCN/H₂O containing 0.1% formic acid. ^cYields after purification by RP-HPLC are based on resin loading.

Circular dichroism spectroscopy was used to assess the effect of the *N*-amino imidazolin-2-one moieties on peptide conformation in water (Figure 5). The CD signature of GHRP-6 was characteristic of a random coil, exhibiting a negative maximum around 190 nm. Introduction of *N*-amino-imidazolin-2-ones residues at the Trp⁴ position of the GHRP-6 peptide gave analogs with CD spectra indicative of turn conformation contingent on the side-chain functionality. Specifically, peptide mimic **31a**, which possesses a methyl substituent at the 4-position of the imidazolin-2-one ring, exhibited a curve shape indicative of a turn conformation similar to that of [azaPhe⁴]-GHRP-6^{11a} and [azaTyr⁴]-GHRP-6, with distinctive negative maxima at 230 and 190 nm and a positive maximum at 215 nm.²⁸ The CD curve of [*N*-amino 4-benzyl-imidazolin-2-one⁴]-GHRP-6 **31b** exhibited similar negative and positive maxima with lower ellipticity. The nature of the side chain on the imidazolinone may thus affect the overall peptide conformation.

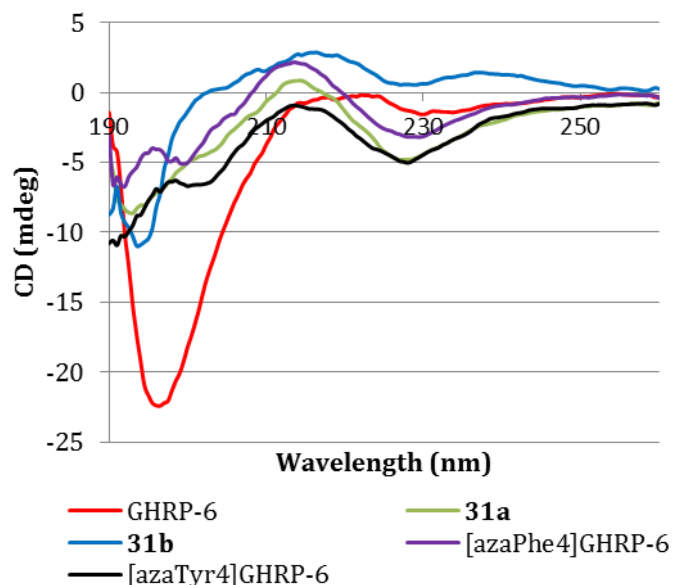


Figure 5. Circular dichroism spectra in water of **31a** and **31b** compared with GHRP-6, [azaPhe⁴]- and [azaTyr⁴]-GHRP-6.

N-Amino-imidazolinone peptide mimics **31a** and **31b** were subsequently tested for binding affinity towards the CD36 receptor using a surface plasmon resonance (SPR) assay,²⁹ as well as for inhibitory activity on MAP kinase JNK phosphorylation induced by the mildly oxidized low-density lipoprotein (oxLDL)-derived phospholipid, 1-palmitoyl-2(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (POVPC) in a cellular assay using RAW 264.7 murine macrophage cells (Table 6).³⁰ In these studies, [azaTyr⁴]-GHRP-6, a GHRP-6 azapeptide derivative which was previously shown to bind to the CD36 receptor in the SPR assay, was used as a positive control.²⁸ In the binding and cellular assays, [*N*-amino-4-methyl-imidazolin-2-one⁴]-GHRP-6 **31a** exhibited respectively similar affinity for the CD36 receptor and increased inhibitory activity on MAP kinase JNK phosphorylation relative to [azaTyr⁴]-GHRP-6. On the other hand, [*N*-amino-4-benzyl-imidazolin-2-one⁴]-GHRP-6 **31b** exhibited comparable affinity to that of [azaTyr⁴]-GHRP-6, yet poor inhibitory activity in the kinase assay.

Table 6. Binding values for GHRP-6 analogs **31a** and **31b**.

peptide sequence	SPR K_d (M) ^a	JNK-kinase cellular assay IC ₅₀ (M)
[azaTyr ⁴]-GHRP-6 His-D-Trp-Ala-AzaTyr-D-Phe-Lys-NH ₂	5.0 x 10 ⁻⁶	2.14 x 10 ⁻⁷
31a His-D-Trp-Ala-(4-Me-imidazolin-2-one)-D-Phe-Lys-NH ₂	4.9 x 10 ⁻⁶	5.54 x 10 ⁻⁸
31b His-D-Trp-Ala-(4-Bn-imidazolin-2-one)-D-Phe-Lys-NH ₂	1.1 x 10 ⁻⁵	>>1 x 10 ⁻⁵

^a K_d = dissociation constant.

The observed conformational differences exhibited in their circular dichroism spectra correlated with the CD36 binding affinity ascertained by the SPR assay and inhibitory activity in the JNK kinase assay. Interestingly, contrary to the decreased affinity induced by the [(*S*)-Agl⁴]- and [(*S*)-Bgl⁴]-GHRP-6 analogs,^{2d,e} the restriction of the backbone conformation caused by the imidazolin-2-one moiety appears to favor binding to the CD36 receptor, in spite of the loss of the aromatic side-chain.

Conclusion

4-Substituted *N*-amino-imidazolin-2-ones were designed to combine the covalent and electronic constraints of α -amino- γ -lactams and aza-amino acids, and to provide opportunity for adding side-chain functionality. Their diversity oriented synthesis was developed using a combination of Sonogashira arylation and base-promoted *5-exo-dig* cyclization of aza-propargylglycines to afford eight new 4-substituted *N*-amino-imidazolin-2-one building blocks. The propensity of the *N*-amino-imidazolin-2-one subunit to induce β -turn conformations was confirmed using (1) X-ray crystallography and NMR spectroscopy of model system *N*-acyl amino imidazolin-2-one amide **14**, and (2) circular dichroism spectroscopy of *N*-amino imidazolin-2-one-containing peptides **31a** and **31b**. In addition, [*N*-amino-imidazolinone⁴]-GHRP-6 analogs **31a** and **31b** were synthesized and

tested for binding affinity towards the CD36 receptor and for inhibitory activity using a JNK kinase cellular assay. The CD spectrum, affinity for CD36 and inhibitory activity exhibited by [*N*-amino-4-methylimidazolinone⁴]-GHRP-6 (**31a**) provides evidence for the active conformer and furnished a novel lead for further development of a receptor modulator with therapeutic potential. Although [*N*-amino-4-benzylimidazolinone⁴]-GHRP-6 (**31b**) exhibited receptor affinity, the aromatic side-chain functionality perturbed the turn conformation and decreased inhibitory activity on MAP kinase JNK phosphorylation. In sum, *N*-amino-imidazolinones represent a novel class of peptide mimics which offer the advantages of their diversity-oriented synthesis and potential for effective introduction into peptide structures for structure-activity studies.

Experimental Section

General. Unless specified, all non-aqueous reactions were run under an inert atmosphere (argon). All glassware was stored in the oven or flame-dried and let cool under an inert atmosphere prior to use. Anhydrous solvents were obtained either by filtration through drying columns (THF, Et₂O, CH₂Cl₂, DMF, CH₃CN, toluene) on a GlassContour system (Irvine, CA), by distillation over potassium hydroxide (diisopropylamine, *N,N*-diisopropylethyl amine), or by distillation over sodium/benzophenone (dioxane). Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on glass-backed silica gel plates (Merck 60 F254). Visualization of the developed chromatogram was performed by UV absorbance or staining with Ceric Ammonium Molybdate. Silica gel chromatography was performed using 230-400 mesh silica (Silicycle). Melting points were obtained on a Buchi melting point apparatus and are uncorrected. Infrared spectra were taken on a Perkin Elmer Spectrum One FTIR instrument and are reported in reciprocal centimetres (cm⁻¹). Nuclear magnetic resonance spectra (¹H, ¹³C, COSY) were recorded either on a Bruker AV 300, AMX 300, AV 400, AMX 400, or DMX 700 spectrometer. Optical rotations were determined with a Perkin-Elmer 341 polarimeter at 589 or 546 nm. Data are reported as follows: [α]_{λtemp}, concentration (*c* in g/100 mL), and solvent. High resolution mass

spectra were performed by the Centre régional de spectrométrie de masse de l'Université de Montréal. Analytical SFC were performed at the Laboratoire d'analyse et de séparation chirale par SFC de l'Université de Montréal and data are reported as follows: column type, eluent, flow rate, temperature, backpressure, wavelength and retention times (*tr*).

Reagents. Propargyl bromide was purchased from Aldrich and filtered on a silica plug prior to use. All aryl iodides used in the Sonogashira reactions were commercially available from Aldrich and filtered on a silica plug prior to use, except 4-(OTBDMS)-iodobenzene, *N*-Boc-3-iodoindole,³¹ and Trt-4-iodoimidazole,³² which were prepared according to literature procedures. Copper iodide was purchased from Aldrich and purified by dissolving in a boiling saturated solution of aqueous NaI, followed by dilution with water, filtering and washing.³³ Benzophenone hydrazone, *p*-nitrophenylchloroformate, potassium *tert*-butoxide, sodium hydride, *N*-methylmorpholine, isobutyl chloroformate, hydroxylamine hydrochloride, pyridine, Pd(PPh₃)₂Cl₂, all were purchased from Aldrich, Alfa Aesar, or Strem Chemicals and used without further purification. The amino acids, Fmoc-His(Trt), Fmoc-D-Trp(Boc), Fmoc-Ala, Fmoc-D-Phe, Fmoc-Lys(Boc), and H-D-Phe-OtBu, and coupling reagents such as HBTU, all were purchased from GL Biochem™ and used as received.

Fmoc-based Solid-Phase Peptide Synthesis. Polystyrene Rink Amide resin (0.64 mmol/g, 75-100 mesh) was purchased from Advanced Chemtech™. Loading of the resin was determined by elemental analysis and standard Fmoc loading test.³⁴ Solid-phase chemistry was performed in filtration tubes equipped with caps and stopcocks purchased from SUPELCO. Analytical LCMS and HPLC analyses were performed on a 5 μM, 150 or 50 mm x 4.6 mm C18 Phenomenex Gemini column™ with a flow rate of 0.5 mL/min using respectively a 0-80% or 0-40% gradient from pure water [0.1% formic acid (FA)] to mixtures with CH₃CN (0.1% FA) or MeOH (0.1% FA). Peptides were purified on a semi-preparative column (5 μM, 250 mm x 21.2 mm, C18 Gemini column™) using respectively

a 2-40% or 2-80% gradient from pure water (0.1% FA) to mixtures with MeOH (0.1% FA) at a flow rate of 10.6 mL/min.

Fmoc deprotection and HBTU couplings. Peptide syntheses were performed under standard conditions³⁵ on an automated shaker using polystyrene Rink amide resin (0.64 mmol/g, 75-100 mesh). Couplings of amino acids (3 equiv) were performed in DMF using HBTU (3 equiv) as coupling reagent and DIEA (6 equiv). Fmoc deprotections were performed by treating the resin twice with 20% piperidine in DMF for 30 min. Resin was washed after each coupling and deprotection step sequentially with DMF (3 x 10 mL), MeOH (3 x 10 mL), and DCM (3 x 10 mL). The purity of peptide fragments was ascertained by LCMS analysis after cleavage and deprotection of a small aliquot of resin.

Representative protocol for deprotection of semicarbazone on solid support. Resin-bound semicarbazone **29a** (200 mg, 0.128 mmoles) was treated with a solution of 1.5 M $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ in pyridine (5 mL) and heated with sonication at 60°C for 12 h. The resin was filtered and washed using aspirator suction with 10% DIEA in DMF (3 x 10 mL), DMF (3 x 10 mL), MeOH (3 x 10 mL), THF (3 x 10 mL), and DCM (3 x 10 mL). The extent of reaction conversion was monitored on an aliquot (3 mg) of resin which was subjected to 1 mL of TFA/TES/ H_2O (95:2.5:2.5, v/v/v) for resin cleavage, filtered, evaporated to a residue and analyzed by LCMS. The procedure was repeated, when LCMS analysis revealed incomplete deprotection.

CD Spectroscopy. All CD spectra were recorded on a Chirascan CD Spectrometer (Applied Photophysics, Leatherhead, United Kingdom) using a 1.0 cm path-length quartz cell containing 20 μM of peptide dissolved in Milli-Q water. The experimental settings were: 1 nm, bandwidth; 0.5 nm, step size; 3 sec, sampling time.

SPR Spectroscopy. The affinity of the small peptide ligand binding to a recombinant soluble His-tagged CD36 functionalized surface was screened by SPR sensing as previously described.²⁹ Briefly, the SPR sensors were prepared by immobilizing the His-tagged CD36 to 3-mercaptopropionyl-leuciny-histidinyl-aspartyl-leuciny-histidinyl-aspartic acid (3-Mpa-LHDLHD) with $N\alpha,N\alpha$ -bis(carboxymethyl)-L-lysine at the C-terminus, a modified peptide monolayer competent to bind His-tagged biomolecules. A calibration curve of the SPR response for ligand concentrations ranging from 100 nM to 30 μ M was fitted to the Langmuir isotherm (Equation 1) to determine K ($K = 1/K_d$) for the CD36-ligand system.

$$\Delta\lambda_{\text{SPR}} = (K [\text{ligand}]) \Delta\lambda_{\text{SPRmax}} (1 + K [\text{ligand}])^{-1} \quad (1)$$

JNK assay. RAW264.7 murine macrophage cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA) pre-treated with *N*-amino-imidazolin-2-one peptide for 2 h at concentration varying from 10^{-9} to 10^{-6} M were stimulated with 10 μ g/mL POVPC (Cayman chemical, Ann Arbor, MI) for 30 min at 37°C. Cells were lysed on ice and centrifuged at 12,000 x g. Aliquots of the resulting supernatant (30 μ g of protein) were analyzed on SDS-PAGE and electrotransferred on nitrocellulose membrane. The revelation was performed by incubating the membrane with primary antibody against phospho-JNK or total-JNK (Cell signalling, Pickering, Canada) (1:500) overnight and with secondary HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., West Grove, PA) (1:10,000) for 1 h. Membrane was visualized by chemiluminescence and intensity of bands was measured with Image Quant software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). The ratio of phospho-JNK/total-JNK was used to determine the phosphorylation state of JNK modulated by the tested peptide.

Synthetic Experimental Procedures and Characterization Data:**Benzhydrylidene aza-glyciny-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (7)**

A solution of *p*-nitrophenylchloroformate (4 g, 22.4 mmol) in 150 mL of dry dichloromethane at 0 °C was treated dropwise with a cooled 0 °C solution of benzophenone hydrazone (4 g, 20.4 mmol) in 150 mL of dry dichloromethane. The ice bath was removed. The mixture was allowed to warm to room temperature. After one hour, the solution was cooled to 0 °C, treated with a solution of D-phenylalanine *tert*-butyl ester hydrochloride (5.8g, 22.4 mmol) and DIEA (7.1 mL, 40.8 mmol) in dry dichloromethane (50 mL), stirred overnight, and concentrated under vacuum to a residue, which was purified by chromatography using 30% Et₂O in petroleum ether as eluent. Evaporation of the collected fractions gave a yellow oil (5.86 g, 65%): *R_f* 0.31 (8:2 Et₂O : petroleum ether); $[\alpha]_D^{20}$ -17.1 (*c* 1.04, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (9H, s), 3.17-3.30 (2H, m), 4.77-4.82 (1H, m), 6.80-6.91 (1H, m), 7.24-7.67 (15H, m), 8.08 (1H, d, *J* = 9.2 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170.5, 162.9, 154.7, 148.4, 136.4, 135.8, 131.2, 129.5, 129.4, 129.2, 128.2, 128.0, 127.0, 126.9, 126.7, 125.7, 115.2, 81.9, 53.6, 38.3, 27.6. HRMS *m/z* 444.2292, (M+H)⁺ calcd for [C₂₇H₃₀N₃O₃]⁺: 444.2282. IR (neat) 1675, 1590, 1513, 1445, 1367, 1335, 1288, 1151, 1110, 847, 752, 694.

Benzhydrylidene Aza-propargylglyciny-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (1)

Benzhydrylidene aza-Gly-Phe-*Ot*Bu (7, 4.05g, 9.14 mmol) was dissolved in 40 ml of anhydrous THF, cooled to 0°C, treated with 0.95 eq. of *t*BuOK (99.2% pure, 974 mg, 8.68 mmol), stirred for 1 h, and treated dropwise with 1.2 eq. of propargyl bromide (1.2 mL, 10.97 mmol). The ice bath was removed. The reaction was allowed to warm to room temperature and stirred overnight. After evaporation of the volatiles under reduced pressure, the residue was purified by chromatography on silica gel using 15% EtOAc in hexanes as eluent. Evaporation of the collected fractions gave the propargyl semicarbazone **1** as a yellow oil (3.35 g, 76%): *R_f* 0.62 (1:1 EtOAc : hexanes); $[\alpha]_D^{20}$ 2.1 (*c* 0.93, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.44 (9H, s), 2.08-2.10 (1H, m), 3.20 (2H, d, *J* = 5.9 Hz),

3.92 (1H, dd, $J = 2.2, 17.8$ Hz), 4.21 (1H, dd, $J = 2.2, 18.0$ Hz), 4.75-4.80 (1H, m), 7.10 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.26-7.48 (15H, m). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 170.4, 157.6, 157.4, 138.1, 136.1, 135.1, 129.7, 129.3, 128.8, 128.3, 128.2, 128.0, 127.7, 126.4, 81.5, 78.3, 71.5, 54.6, 38.1, 34.7, 27.6. HRMS m/z 482.2449, $(\text{M}+\text{H})^+$ calcd for $[\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_3]^+$: 482.2438. IR (neat) 1733, 1671, 1501, 1444, 1361, 1150, 1095, 928, 843, 767, 738, 693. The degree of racemization (enantiomeric excess, 67%) was determined by SFC analysis on a chiral stationary phase [Chiralcel AD-H 25 cm, 15% *i*-PrOH, 3mL/min, 35°C, 150 bar, t_r (minor) 3.27 min, t_r (major) 5.12 min].

Representative procedure for the NaH-promoted cyclization:

(2'*R/S*)-1-((Diphenylmethylene)amino)-3-(*tert*-butyl-3'-phenyl-2'-propanoate)-4-methylene-imidazolidin-2-one (2)

A solution of benzhydrylidene aza-propargylglyciny-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (**1**, 50 mg, 0.104 mmol) in 1 mL of anhydrous acetonitrile was treated with a suspension of NaH (60% in oil, 10.4 mg, 0.260 mmol). After 2 h, a small volume of water was added to the mixture, which was stirred for 15 min. The volume was concentrated, and partitioned between EtOAc and brine. The aqueous layer was separated and extracted three times with EtOAc. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and evaporated to a residue, which was purified by silica gel chromatography using 30% Et_2O in petroleum ether to give **2** as a bright yellow oil (42.2 mg, 84%): R_f 0.47 (6:4 petroleum ether : Et_2O); $[\alpha]_D^{20}$ 4.3 (c 0.83, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.47 (9H, s), 3.28-3.42 (2H, m), 3.46-3.56 (2H, m), 3.89-3.91 (1H, m), 4.04-4.06 (1H, m), 4.96 (1H, q, $J = 5.7, 10.3$ Hz), 7.21-7.56 (15H, m). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 168.8, 158.9, 157.4, 138.5, 138.4, 137.7, 136.2, 130.3, 129.8, 129.5, 129.0, 128.4, 127.0, 82.8, 82.7, 77.7, 56.6, 51.4, 33.6, 28.3. Conversion into **3** occurred by double bond migration inside the ring on letting **2** stand over night.

(2'R)-1-((Diphenylmethylene)amino)-3-(tert-butyl-3'-phenylpropanoate)-4-methylimidazolin-2-one (3)

Yellow oil (42.2 mg, 84%): R_f 0.35 (6:4 petroleum ether : Et₂O); $[\alpha]_D^{20}$ 0 (*c* 0.85, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (9H, s), 1.55 (3H, s), 3.36-3.42 (2H, m), 4.67-4.70 (1H, q, *J* = 5.1, 10.4 Hz), 5.43 (1H, s), 7.09 (2H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.21-7.46 (11H, m), 7.64 (2H, d, *J* = 7.8 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.1, 163.7, 150.8, 138.2, 135.7, 130.9, 129.9, 129.6, 129.5, 129.3, 129.0, 128.8, 128.4, 127.0, 119.0, 106.2, 82.7, 77.7, 57.6, 35.9, 28.4, 11.1. HRMS *m/z* 482.2440, (M+H)⁺ calcd for [C₃₀H₃₂N₃O₃]⁺ : 482.2438. IR (neat) 1694, 1445, 1392, 1276, 1152, 747, 693.

Benzhydrylidene Aza-glycinyl-D-phenylalanine isopropyl amide (9)

tert-Butyl ester **7** (2.80 g, 6.32 mmol) was dissolved in 12 mL of a 1:1 DCM:TFA mixture, stirred for 2 h, and evaporated under reduced pressure. The resulting salt was dissolved in 70 mL of THF, cooled to -15 °C, treated sequentially with isobutyl chloroformate (0.96 mL, 7.35 mmol) and *N*-methyl morpholine (0.81 mL, 7.35 mmol), stirred for 15 min, treated with isopropylamine (0.73 mL, 8.48 mmol), stirred at -15 °C for 1.5 h, and rotary evaporated under reduced pressure to a residue, which was dissolved in EtOAc and washed with 5% NaHCO₃ (3 x 100 mL) and 5% citric acid (3 x 100 mL). The organic phase was dried over MgSO₄, filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography on silica gel using a 30-60% gradient of ethyl acetate in hexanes. Evaporation of the collected fractions afforded 1.6 g (66 % yield) of amide **9** as a white solid: R_f 0.21 (1:1 EtOAc:hexanes); $[\alpha]_D^{20}$ -22.5 (*c* 0.49, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.00 (3H, d, *J* = 6.6 Hz), 1.08 (3H, d, *J* = 6.6 Hz), 3.09 (1H, q, *J* = 7.8, 13.5 Hz), 3.36 (1H, q, *J* = 5.7, 13.6 Hz), 3.99-4.07 (1H, m), 4.56-4.61 (1H, m), 5.81 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 6.92 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.24-7.57 (15H, m), 7.76 (1H, s). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.7, 154.8, 148.6, 136.5, 136.3, 131.3, 129.5, 129.4, 129.2, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 126.9, 126.6, 54.7, 41.1, 38.4, 22.2, 22.0. HRMS *m/z* 429.2295, (M+H)⁺ calcd for [C₂₆H₂₉N₄O₂]⁺ : 429.2285. IR (neat) 1649, 1509, 1444, 1115, 771, 746, 694.

Benzhydrylidene Aza-propargylglyciny-D-phenylalanine isopropyl amide (10)

Benzhydrylidene aza-Gly-Phe-NH*i*Pr (**9**, 1.25 g, 2.92 mmol) was dissolved in 15 mL of anhydrous THF, cooled to 0°C, treated with 1.1 eq. of *t*BuOK (360 mg, 3.21 mmol), stirred for 1 h, and treated dropwise with 1.3 eq. of propargyl bromide (0.42 mL, 3.79 mmol). The cooling bath was removed. The reaction was allowed to warm to room temperature and stirred overnight. The volatiles were evaporated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel using 15% EtOAc in hexanes as solvent system. Evaporation of the collected fractions gave propargyl semicarbazone **10** as a yellow oil (970 mg, 71%): R_f 0.31 (1:1 EtOAc:hexanes); $[\alpha]_D^{20}$ -8.8 (*c* 0.86, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.04 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 1.10 (3H, d, *J* = 6.6 Hz), 2.07-2.08 (1H, m), 3.13 (1H, dd, *J* = 7.4, 13.6 Hz), 3.24 (1H, dd, *J* = 6.5, 13.7 Hz), 3.97-4.09 (3H, m), 4.56 (1H, q, *J* = 7.5, 14.4 Hz), 5.80 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.07 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.22-7.51 (15H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.8, 159.0, 157.9, 137.9, 136.7, 134.9, 129.9, 129.4, 129.1, 128.7, 128.3, 128.2, 127.8, 126.4, 78.0, 71.6, 55.8, 41.0, 38.1, 35.0, 22.2, 22.1. HRMS *m/z* 467.2447, (M+H)⁺ calcd for [C₂₉H₃₁N₄O₂]⁺: 467.2441. IR (neat) 1667, 1649, 1554, 1508, 1492, 768, 694, 663. The enantiomeric ratio (>99:1) was determined by SFC analysis on chiral stationary phase [Chiralcel AD-H 25 cm, 15% *i*-PrOH, 3mL/min, 35°C, 150bar, *t*_r (minor) 5.5 min, *t*_r (major) 12.9 min].

(2'*R*)-1-((Diphenylmethylene)amino)-3-(3'-phenyl-*N*'-isopropyl-2'-propionamide)-4-methylene-imidazolidin-2-one (11)

A solution of benzhydrylidene aza-propargylglyciny-D-phenylalanine isopropyl amide (**10**, 50 mg, 0.108 mmol) in 1 mL of anhydrous acetonitrile was treated with a suspension of NaH (60% in oil, 13 mg, 0.322 mmol), stirred for 2 h, treated with a small volume of water, stirred for 15 min, and evaporated to a residue, which was dissolved in EtOAc and washed with brine. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 15 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to a residue, which was purified by silica gel chromatography using 30% Et₂O in petroleum

ether to give amide **11** as a pale yellow oil (39 mg, 78%): R_f 0.80 (EtOAc); $[\alpha]_D^{20}$ 19.8 (c 0.88, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.05 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 1.09 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 3.23-3.45 (4H, m), 3.90-3.95 (1H, m), 3.97-4.10 (1H, m), 4.25-4.30 (1H, m), 4.90 (1H, q, $J = 5.9, 10.3$ Hz), 6.38 (1H, t, $J = 7.7$ Hz), 7.09-7.48 (15H, m). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 167.7, 158.8, 158.7, 157.4, 137.6, 137.1, 136.8, 135.2, 130.0, 129.5, 129.1, 128.9, 128.7, 128.5, 128.3, 128.2, 127.9, 126.5, 84.7, 77.3, 57.3, 50.1, 41.7, 32.1, 22.4, 22.3. HRMS m/z 467.2454, $(\text{M}+\text{H})^+$ calcd for $[\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_2]^+$: 467.2441 IR (neat) 1736, 1666, 1542, 1390, 1361, 1226, 1171, 925, 750, 696, 662.

(2'R)-1-p-Methoxybenzamido-4-methyl-3-(3'-phenyl-N'-isopropyl-2'-propionamide)-imidazolin-2-one (14)

Benzhydrylidene **11** (260 mg, 0.56 mmol) was dissolved in 20 mL of pyridine, treated with hydroxylamine hydrochloride (154 mg, 2.23 mmol), heated to 60°C, and stirred for 12 h. The volatiles were evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in DCM and evaporated to remove residual pyridine. The residue was digested with EtOAc (2 x 20 mL) to remove insoluble hydroxylamine hydrochloride. Evaporation of the volatiles under reduced pressure afforded 280 mg of semicarbazide contaminated with oxime by-product. The crude semicarbazide (167 mg, 0.31 mmol) was dissolved in 3 mL of DCM, treated with 4-methoxybenzoyl chloride (106 mg, 0.62 mmol) and DIEA (0.16 mL, 0.93 mmol), stirred for 12 h, and washed with 5% citric acid (3 x 10 mL). The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel using a gradient from 25% to 70% ethyl acetate in hexanes. Evaporation of the collected fractions afforded benzamide **14** as a light yellow foam (76 mg, 56 % yield), which crystallized from a EtOAc/ CHCl_3 mixture after slow diffusion of vapors from a hexanes: mp 73-76°C; R_f 0.38 (EtOAc); $[\alpha]_D^{20}$ 11.0 (c 0.88, CHCl_3). The variation in the amide proton chemical shift as a function of concentration (1 to 20 mM) in CDCl_3 was examined to assess for aggregation (see supplementary Figure 1) and the variation in the amide proton chemical shift with solvent composition ($\text{DMSO}-d_6$

titration) was measured to distinguish hydrogen-bonded from hydrogen exposed NHs. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.14-1.16 (3H, m), 1.22 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 1.76 (3H, s), 3.52 (1H, dd, $J = 4.0, 13.9$ Hz), 3.72 (1H, t, $J = 12.6$ Hz), 3.81 (3H, s), 4.05-4.18 (1H, m), 4.54 (1H, dd, $J = 3.9, 11.2$ Hz), 6.04 (1H, s), 6.70 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.06-7.26 (5H, m), 7.80 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 11.09 (1H, d, $J = 4.8$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 168.7, 166.4, 163.1, 154.6, 138.0, 130.1, 129.3, 129.0, 127.3, 123.2, 119.6, 113.9, 111.2, 61.6, 55.7, 42.3, 35.3, 22.9, 22.7, 10.7. HRMS m/z 437.2187, $(\text{M}+\text{H})^+$ calcd for $[\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_4]^+$: 437.2183. IR (neat) 1661, 1599, 1533, 1502, 1253, 1174, 750, 666.

Representative procedure for the Sonogashira coupling:

Benzhydrylidene Aza-phenylpropargylglycinyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (**18a**)

A solution of benzhydrylidene aza-propargylglycinyl-D-phenylalaninyl *tert*-butyl ester (**1**, 500 mg, 1.04 mmol) in 10 mL of a 1:1 (v/v) DMF: Et_2NH mixture was treated with $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (73 mg, 0.104 mmol), CuI (40 mg, 0.208 mmol), and iodobenzene (0.15 mL, 1.35 mmol) under inert atmosphere. The solution was stirred for 12 h, diluted with 40 mL of EtOAc, and washed with saturated NaHCO_3 (3 x 50 mL). After drying over Na_2SO_4 , the solution was filtered, and concentrated under reduced pressure to a residue, which was purified by silica gel chromatography using 30% Et_2O in petroleum ether to give azadipeptide **18a** as orange foam (504 mg, 87%): R_f 0.41 (6:4 petroleum ether : Et_2O); $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -24.1 (c 1.06, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.47 (9H, s), 3.30-3.21 (2H, m), 4.20 (1H, d, $J = 18.0$ Hz), 4.54 (1H, d, $J = 17.9$), 4.88-4.82 (1H, m), 7.59-7.20 (20H, m). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 171.3, 158.2, 157.7, 139.3, 137.0, 136.2, 132.0, 130.4, 130.2, 130.1, 129.8, 129.1, 129.0, 128.8, 128.7, 128.6, 127.3, 123.4, 84.8, 84.5, 82.3, 55.5, 38.9, 36.4, 28.5. HRMS m/z 558.2769, $(\text{M}+\text{H})^+$ calcd for $[\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_3]^+$: 558.2751. IR (neat) 1731, 1679, 1488, 1366, 1150, 756, 691.

Benzhydrylidene Aza-*p*-methoxyphenylpropargylglycinyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (18b)

Using the representative procedure, ester **1** (500 mg, 1.04 mmol) was reacted with 4-iodoanisole (316 mg, 1.35 mmol), and the product was purified with silica gel chromatography using 30% Et₂O in petroleum ether to give aza-dipeptide **18b** as orange foam (522 mg, 85%): *R_f* 0.30 (6:4 petroleum ether:Et₂O); [α]_D²⁰ -32.0 (*c* 1.02, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (9H, s), 3.32-3.23 (2H, m), 3.77 (3H, s), 4.21 (1H, d, *J* = 17.93 Hz), 4.54 (1H, d, *J* = 17.89 Hz), 4.89-4.84 (1H, m), 6.82-6.80 (2H, m), 7.51-7.22 (19H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170.5, 159.2, 157.5, 156.8, 138.5, 136.2, 135.4, 132.7, 129.9, 129.6, 129.4, 129.3, 129.0, 128.3, 128.2, 128.0, 127.1, 126.5, 114.7, 113.5, 83.6, 82.5, 81.5, 77.1, 54.9, 54.8, 38.1, 35.7, 27.7. HRMS *m/z* 588.2861, (M+H)⁺ calcd for [C₃₇H₃₈N₃O₄]⁺: 588.2857. IR (neat) 1678, 1487, 1443, 1366, 1246, 1149, 831, 695.

Benzhydrylidene Aza-*p*-dimethyl-*tert*-butylsilyloxyphenylpropargylglycinyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (18c)

Using the representative procedure, ester **1** (500 mg, 1.04 mmol) was reacted with 4-(OTBDMS)-iodobenzene (425 mg, 1.35 mmol) and the product was purified by silica gel chromatography using a gradient from 20-100% Et₂O in petroleum ether to give aza-dipeptide **18c** as a brown oil (427 mg, 60 %): *R_f* 0.52 (6:4 petroleum ether:Et₂O); [α]_D²⁰ -37.5 (*c* 0.88, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.20 (6H, s), 0.98 (9H,s), 1.43 (9H,s), 3.25-3.16 (2H, m), 4.11 (1H, d, *J* = 17.93 Hz), 4.46 (1H, d, *J* = 17.93 Hz), 4.81-4.76 (1H, m), 6.74-6.71 (2H, m), 7.49-7.39 (8H, m), 7.35-7.31 (2H, m), 7.26-7.23 (5H, m), 7.19-7.13 (3H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170.5, 157.5, 156.8, 155.4, 138.5, 136.2, 135.4, 132.6, 129.5, 129.4, 129.2, 128.9, 128.3, 128.1, 128.0, 127.8, 126.4, 119.7, 115.4, 83.5, 82.6, 81.5, 76.9, 54.7, 38.1, 35.7, 27.6, 25.3, 17.8, -4.8. HRMS *m/z* 688.3566, (M+H)⁺ calcd for [C₄₂H₅₀N₃O₄Si]⁺: 688.3565. IR (neat) 1682, 1491, 1252, 1151, 907, 838, 695.

Benzhydrylidene Aza-*p*-fluorophenylpropargylglycinyl-D-phenylalanine tert-butyl ester (18d)

Using the representative procedure, ester **1** (500 mg, 1.04 mmol) was reacted with 4-fluoriodobenzene (0.16 mL, 1.35 mmol), and the product was purified by silica gel chromatography using 20% Et₂O in petroleum ether to give aza-dipeptide **18d** as a light orange foam (536 mg, 90 %): R_f 0.46 (6:4 petroleum ether:Et₂O); [α]_D²⁰ -24.6 (*c* 0.85, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.47 (9H, s), 3.31-3.22 (2H, m), 4.21 (1H, d, *J* = 17.93 Hz), 4.52 (1H, d, *J* = 17.97 Hz), 4.89-4.83 (1H, m), 6.98-6.94 (2H, m), 7.51-7.21 (17H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 171.3, 164.1, 161.6, 158.3, 157.8, 139.2, 137.0, 136.1, 134.0, 133.9, 130.5, 130.2, 129.7, 129.0, 128.8, 128.6, 127.3, 119.4, 116.0, 115.9, 84.6, 83.4, 82.2, 77.9, 55.5, 38.9, 36.4, 28.5 HRMS *m/z* 576.2662, (M+H)⁺ calcd for [C₃₆H₃₅FN₃O₃]⁺: 576.2657. IR (neat) 1678, 1490, 1365, 1219, 1150, 835, 694.

Benzhydrylidene Aza-*p*-ethoxycarbonylphenylpropargylglycinyl-D-phenylalanine tert-butyl ester (18e)

Using the representative procedure, ester **1** (100 mg, 0.208 mmol) was reacted with ethyl 4-iodobenzoate (45 μL, 0.27 mmol), and the product was purified by silica gel chromatography using a gradient from 30% Et₂O in petroleum ether to 100% Et₂O to give aza-dipeptide **18e** as a dark brown oil (122 mg, 93 %): R_f 0.27 (6:4 petroleum ether : Et₂O); [α]_D²⁰ -29.2 (*c* 0.90, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.40 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.44 (9H, s), 3.17-3.27 (2H, m), 4.19 (1H, d, *J* = 18.0 Hz), 4.38 (2H, q, *J* = 7.0, 14.3 Hz), 4.50 (1H, d, *J* = 18.0 Hz), 4.78-4.83 (1H, m), 7.15 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.23-7.28 (5H, m), 7.33-7.49 (12H, m), 7.96 (2H, d, *J* = 8.2 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 171.2, 166.4, 158.2, 158.0, 139.1, 136.9, 136.0, 131.8, 130.5, 130.2, 130.2, 130.1, 129.8, 129.7, 129.0, 128.8, 128.6, 127.9, 127.2, 87.9, 83.7, 82.3, 77.7, 61.5, 55.4, 38.9, 36.4, 28.4, 14.7. HRMS *m/z* 630.2972, (M+H)⁺ calcd for [C₃₉H₄₀N₃O₅]⁺ : 630.2962. IR (neat) 2919, 2774, 2361, 1718, 1684, 1494, 1392, 1273, 1154, 1105, 768, 698.

Benzhydrylidene Aza-*m*-trifluoromethylphenylpropargylglycinyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (18f)

Using the representative procedure, ester **1** (500 mg, 1.04 mmol) was reacted with 1-iodo-3-trifluoromethylbenzene (0.19 mL, 1.35 mmol), and the product was purified by silica gel chromatography using 30% Et₂O in petroleum ether to give aza-dipeptide **18f** as a brown oil (520 mg, 80 %): R_f 0.61 (6:4 petroleum ether : Et₂O); [α]_D²⁰ -20.4 (*c* 0.81, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.46 (9H, s), 3.29-3.19 (2H, m), 4.20 (1H, d, *J* = 18.05), 4.49 (1H, d, *J* = 18.05), 4.85-4.80 (1H, m), 7.58-7.15 (20H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170.5, 157.5, 157.4, 138.2, 136.1, 135.2, 134.4, 134.2, 130.6, 130.3, 129.8, 129.7, 129.4, 129.3, 128.9, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 127.8, 127.6, 127.5, 126.5, 124.7, 124.4, 124.3, 123.5, 122.0, 85.8, 82.1, 81.5, 76.9, 54.7, 38.1, 35.7, 27.6. HRMS *m/z* 626.2630, (M+H)⁺ calcd for [C₃₇H₃₅F₃N₃O₃]⁺ : 626.2625. IR (neat) 1680, 1486, 1330, 1152, 1125, 1093, 1072, 693.

Benzhydrylidene Aza-*N*-Boc-3-indolylpropargylglycinyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (18g)

Using the representative procedure, ester **1** (500 mg, 1.04 mmol) was reacted with *N*-Boc-3-iodoindole (464 mg, 1.35 mmol), and the product was purified by silica gel chromatography using 25% Et₂O in petroleum ether to give aza-dipeptide **18g** as an orange foam (473 mg, 65%): R_f 0.43 (6:4 petroleum ether : Et₂O); [α]_D²⁰ -19.9 (*c* 0.89, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.47 (9H, s), 1.69 (9H, s), 3.32-3.24 (2H, m), 4.26 (1H, d, *J* = 17.93 Hz), 4.61 (1H, d, *J* = 17.77 Hz), 4.91-4.83 (1H, m), 7.68-7.20 (20H, m), 8.21-8.13 (1H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 171.2, 158.3, 157.8, 149.5, 139.0, 136.9, 136.1, 134.9, 131.0, 130.4, 130.1, 129.8, 129.1, 129.0, 128.8, 128.6, 127.3, 125.5, 123.5, 120.5, 115.6, 103.5, 88.2, 84.7, 82.2, 77.8, 76.4, 55.5, 38.9, 36.6, 28.6, 28.4. HRMS *m/z* 697.3387, (M+H)⁺ calcd for [C₄₃H₄₅N₄O₅]⁺ : 697.3384. IR (neat) 1733, 1681, 1491, 1451, 1366, 1231, 1150, 1098, 745, 695.

Benzhydrylidene Aza-*N*-trityl-4-imidazolylpropargylglycinyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (18h)

Using the representative procedure, ester **1** (500 mg, 1.04 mmol) was reacted with *N*-trityl-4-iodoimidazole (588 mg, 1.35 mmol), and the product was purified by silica gel chromatography using a gradient of 50-70% Et₂O in petroleum ether to give aza-dipeptide **18h** as orange foam (378 mg, 46%): *R_f* 0.33 (3:7 petroleum ether:Et₂O); [α]_D²⁰ -22.0 (*c* 0.98, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.41 (9H, s), 3.18 (2H, d, *J* = 5.88 Hz), 4.10 (1H, d, *J* = 17.97 Hz), 4.40 (1H, d, *J* = 17.97 Hz), 4.78-4.73 (1H, m), 6.90 (1H, d, *J* = 1.16 Hz), 7.45-7.05 (32H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 171.7, 158.6, 158.5, 142.8, 139.6, 139.5, 137.4, 136.4, 130.6, 130.5, 130.4, 130.1, 129.5, 129.4, 129.1, 129.0, 128.9, 128.8, 127.6, 126.6, 123.9, 85.2, 82.6, 78.6, 78.1, 76.5, 55.8, 39.3, 36.9, 28.8. HRMS *m/z* 790.3723, (M+H)⁺ calcd for [C₅₂H₄₈N₅O₃]⁺ : 790.3752. IR (neat) 1682, 1489, 1444, 1151, 744, 695.

Benzhydrylidene Aza-3-*p*-nitrophenyl-2-oxopropylglycinyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (20)

Using the representative procedure, ester **1** (500 mg, 1.04 mmol) was reacted with 1-iodo-4-nitrobenzene (337 mg, 1.35 mmol), and the product was purified by silica gel chromatography using a gradient from 30% Et₂O in petroleum ether to 100% Et₂O to give ketone **20** as orange foam (400 mg, 64%): *R_f* 0.09 (6:4 petroleum ether : Et₂O); [α]_D²⁰ 6.4 (*c* 0.83, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.45 (9H, s), 3.19 (2H, d, *J* = 5.9 Hz), 3.44 (2H, q, *J* = 16.9, 30.6 Hz), 4.12 (1H, d, *J* = 18.1 Hz), 4.36 (1H, d, *J* = 18.1 Hz), 4.74-4.79 (1H, m), 7.15 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.20-7.54 (17H, m), 8.14 (2H, d, *J* = 8.7 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 200.7, 171.2, 158.0, 154.7, 147.4, 141.3, 138.8, 136.8, 135.9, 131.0, 130.4, 130.0, 129.6, 128.9, 128.7, 127.4, 124.0, 82.4, 77.7, 56.4, 55.4, 45.7, 38.9, 28.4. HRMS *m/z* 621.2709, (M+H)⁺ calcd for [C₃₆H₃₇N₄O₆]⁺ : 621.2708. IR (neat) 1730, 1677, 1490, 1344, 1149, 696.

Benzhydrylidene Aza-*p*-nitromethylphenylpropargylglycinyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (22) and (2'*R*)-1-((Diphenylmethylene)amino)-3-(*tert*-butyl-3'-phenyl-2'-propanoate)-4-*p*-nitrobenzylimidazolin-2-one (23)

Ester **1** (500 mg, 1.13 mmol) was dissolved in 6 mL of anhydrous THF, cooled to 0°C, treated with 1.1 eq. of *t*-BuOK (139 mg, 1.24 mmol), stirred for 1 h, and treated dropwise with 1.3 eq. of 1-(3-bromoprop-1-yn-1-yl)-4-nitrobenzene (350 mg, 1.47 mmol). The ice bath was removed and the reaction was allowed to warm to room temperature with stirring overnight. The volatiles were removed by evaporation under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel using 30% Et₂O in petroleum ether as solvent system to give propargylglycine **22** (major) and imidazolin-2-one **23** (minor) as an inseparable 3: 1 mixture: yellow oil (226 mg, 33 %); *R_f* 0.51 (6:4 petroleum ether : Et₂O); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) distinct signal for **22** δ 1.44 (9H, s), 3.22-3.19 (2H, m), 4.22 (1H, d, *J* = 18.17 Hz), 4.47 (1H, d, *J* = 18.21), 4.81-4.76 (1H, m), 7.63-7.09 (17H, m), 8.15-8.13 (2H, m); distinct signals for **23** δ 1.48 (9H, s), 3.39-3.32 (1H, m), 3.53-3.48 (1H, m), 3.82-3.92 (2H, m), 5.11-5.07 (1H, m), 5.51 (1H, brs), 6.75 (2H, d, *J* = 8.80 Hz), 7.63-7.09 (15H, m), 8.07-8.04 (2H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) signals for **22** and **23** δ 171.2, 158.4, 158.1, 147.4, 138.8, 136.9, 135.9, 132.7, 130.6, 130.3, 130.2, 130.1, 129.9, 129.6, 129.5, 129.1, 129.0, 128.8, 128.7, 128.6, 127.2, 127.1, 124.3, 123.9, 99.2, 90.6, 82.5, 82.3, 57.1, 55.4, 51.9, 38.9, 36.5, 34.2, 28.4, 28.3. HRMS *m/z* 603.2603, (M+H)⁺ calcd for [C₃₆H₃₅N₄O₅]⁺: 603.2602. IR (neat) 1732, 1681, 1515, 1490, 1367, 1338, 1151, 1107, 853, 749, 696.

NaH-promoted cyclization:

(2'*R*, 4*Z*)-1-((Diphenylmethylene)amino)-3-(*tert*-butyl-3'-phenyl-2'-propanoate)-4-benzylidene-imidazolidin-2-one (24a)

Using the representative procedure for the synthesis of imidazolidin-2-one **2**, aza-propargylglycine **18a** (50 mg, 0.09 mmol) was reacted with NaH (9 mg, 0.224 mmol) in 1 mL of anhydrous acetonitrile for 12 h, and the product was purified with silica gel

chromatography using 30% Et₂O in petroleum ether to give a yellow oil (34.3 mg, 69%): *R_f* 0.53 (6:4 petroleum ether:Et₂O); [α]_D²⁰ 90.7 (*c* 1.53, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.53 (9H, s), 3.13 (1H, dd, *J* = 4.7, 14.0 Hz), 3.40-3.48 (2H, m), 3.60 (1H, dd, *J* = 1.6, 13.5 Hz), 4.33 (1H, q, *J* = 4.8, 11.0 Hz), 4.99 (1H, s), 6.88-6.94 (2H, m), 6.98 (2H, d, *J* = 6.8 Hz), 7.19-7.51 (14H, m), 7.64-7.68 (2H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 167.8, 158.9, 157.2, 137.9, 137.4, 135.7, 134.6, 132.3, 129.6, 129.1, 128.9, 128.8, 128.7, 128.2, 128.1, 127.7, 127.6, 126.3, 126.1, 98.5, 81.5, 57.8, 52.9, 34.1, 27.7. HRMS *m/z* 558.2763, (M+H)⁺ calcd for [C₃₆H₆N₃O₃]⁺ : 558.2751. IR (neat) 1734, 1701, 1674, 1408, 1368, 1278, 1154, 751, 696. The enantiomeric ratio (73:27) was determined by SFC analysis on chiral stationary phase (Chiralcel OJ-H 25 cm, 5% *i*-PrOH, 3mL/min, 35°C, 150bar, *t_r* (minor) 9.2 min, *t_r* (major) 11.2 min.

(2'*R*, 4*Z*)-1-((Diphenylmethylene)amino)-3-(*tert*-butyl-3'-phenyl-2'-propanoate)-4-(*p*-methoxybenzylidene)imidazolidin-2-one (24b)

Using the representative procedure for the synthesis of imidazolidin-2-one **2**, azapropargylglycine **18b** (192 mg, 0.327 mmol) was reacted with NaH (39 mg, 0.98 mmol) in 2 mL of anhydrous acetonitrile for 12 h, and the product was purified with silica gel chromatography using 30% Et₂O in petroleum ether to give a yellow oil (19 mg, 10%): *R_f* 0.50 (6:4 petroleum ether : Et₂O); [α]_D²⁰ 127.2 (*c* 1.03, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.51 (9H, s), 3.12 (1H, dd, *J* = 4.8, 13.9 Hz), 3.37-3.43 (2H, m), 3.57 (1H, dd, *J* = 1.6, 13.4 Hz), 3.83 (3H, s), 4.34 (1H, dd, *J* = 4.9, 11.0 Hz), 4.92 (1H, s), 6.78 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.88 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.90-6.93 (2H, m), 7.22-7.23 (3H, m), 7.33-7.41 (5H, m), 7.47-7.48 (3H, m), 7.62-7.64 (2H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 168.6, 159.4, 158.7, 158.0, 138.7, 138.2, 136.5, 132.4, 130.6, 130.3, 129.9, 129.6, 129.0, 128.8, 128.5, 128.4, 127.5, 126.8, 113.9, 98.9, 82.2, 77.6, 58.3, 55.7, 53.6, 34.9, 28.4. HRMS *m/z* 588.2866, (M+H)⁺ calcd for [C₃₇H₃₈N₃O₄]⁺ : 588.2857. IR (neat) 1732, 1676, 1509, 1368, 1285, 1244, 1152, 750, 693.

(2'R, 4Z)-1-((Diphenylmethylene)amino)-3-(tert-butyl-3'-phenyl-2'-propanoate)-4-(p-fluorobenzylidene)imidazolidin-2-one (24d)

Using the representative procedure for the synthesis of imidazolidin-2-one **2**, azapropargylglycine **18d** (200 mg, 0.35 mmol) was reacted with NaH (34 mg, 0.87 mmol) in 3 mL of anhydrous acetonitrile for 12 h, and the product was purified with silica gel chromatography using 30% Et₂O in petroleum ether to give a yellow oil (128 mg, 64%): R_f 0.52 (6:4 petroleum ether : Et₂O); [α]_D²⁰ 108.3 (c 1.08, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.51 (9H, s), 3.12 (1H, dd, *J* = 4.6, 13.9 Hz), 3.39-3.47 (2H, m), 3.59 (1H, dd, *J* = 1.49, 13.5 Hz), 4.23 (1H, dd, *J* = 4.7, 11.0 Hz), 4.91 (1H, s), 6.88-6.96 (6H, m), 7.23-7.24 (3H, m), 7.34-7.42 (5H, m), 7.47-7.49 (3H, m), 7.63-7.65 (2H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 168.4, 163.1, 160.7, 160.1, 157.9, 138.6, 138.2, 136.4, 133.4, 131.3, 131.1, 130.4, 129.8, 129.7, 129.6, 129.0, 128.9, 128.5, 126.9, 115.5, 115.4, 98.0, 82.5, 77.7, 58.7, 53.6, 34.9, 28.4. HRMS *m/z* 576.2665, (M+H)⁺ calcd for [C₃₆H₃₅FN₃O₃]⁺ : 576.2657. IR (neat) 1731, 1675, 1367, 1226, 1151, 750, 692. The *cis* double bond geometry was ascertained by 2D NMR spectroscopy (NOESY).

(2'R, 4Z)-1-((Diphenylmethylene)amino)-3-(tert-butyl-3'-phenyl-2'-propanoate)-4-(p-ethoxycarbonylbenzylidene)imidazolidin-2-one (24e)

Using the representative procedure for the synthesis of imidazolidin-2-one **2**, azapropargylglycine **18e** (55.6 mg, 0.0884 mmol) was reacted with NaH (9 mg, 0.221 mmol) in 1 mL of anhydrous acetonitrile for 5 h, and the product was purified with silica gel chromatography using a gradient from 40-60 % Et₂O in petroleum ether to give a yellow oil (23.5 mg, 42%): R_f 0.17 (6:4 petroleum ether : Et₂O); [α]_D²⁰ 97.5 (c 1.23, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.43 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.46 (9H, s), 2.97 (2H, q, *J* = 16.6, 42 Hz), 3.34-3.46 (2H, m), 4.29 (1H, dd, *J* = 4.8, 10.3 Hz), 4.41 (2H, q, *J* = 7.3, 14.1 Hz), 5.10 (1H, s), 6.86 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.02-7.04 (2H, m), 7.11-7.16 (1H, m), 7.22-7.28 (4H, m), 7.33-7.44 (6H, m), 7.65-7.67 (2H, m), 7.85 (2H, d, *J* = 8.3 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 168.0, 166.3, 164.3, 150.0, 141.1, 138.1, 137.4, 135.0, 130.6, 129.6, 129.5, 129.1,

128.8, 128.6, 128.3, 128.1, 126.6, 121.0, 107.3, 82.3, 77.2, 60.9, 58.2, 35.1, 30.8, 27.9, 14.4. HRMS m/z 630.2958, (M+H)⁺ calcd for [C₃₉H₄₀N₃O₅]⁺ : 630.2963. IR (neat) 1705, 1445, 1405, 1273, 1153, 1102, 694.

(2'R, 4Z)-1-((Diphenylmethylene)amino)-3-(tert-butyl-3'-phenyl-2'-propanoate)-4-(m-trifluoromethylbenzylidene)-imidazolidin-2-one (24f) and (2'R)-1-((diphenylmethylene)amino)-3-(tert-butyl-3'-phenyl-2'-propanoate)-4-(m-trifluoromethylbenzyl)imidazolin-2-one (25f)

Using the representative procedure for the synthesis of imidazolidin-2-one **2**, azapropargylglycine **18f** (431 mg, 0.689 mmol) was reacted with NaH (69 mg, 1.72 mmol) in 6 mL of anhydrous acetonitrile for 12 h, and the product was purified with silica gel chromatography using a gradient from 10-40 % Et₂O in petroleum ether to give **24f** and **25f** as yellow oils. First to elute was **24f** (74.7 mg, 17%): R_f 0.85 (6:4 petroleum ether : Et₂O); [α]_D²⁰ 158.6 (*c* 0.86, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.51 (9H, s), 3.10 (1H, dd, *J* = 4.5, 13.9 Hz), 3.33-3.39 (1H, m), 3.47-3.65 (2H, m), 4.16 (1H, dd, *J* = 4.5, 11.0 Hz), 4.89 (1H, s), 6.78-6.89 (2H, m), 7.11 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 7.18-7.23 (4H, m), 7.33-7.50 (10H, m), 7.65 (2H, d, *J* = 7.2 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 168.1, 160.9, 157.6, 138.4, 138.1, 136.4, 136.3, 134.4, 132.9, 131.1, 130.8, 130.5, 129.7, 129.6, 129.1, 128.9, 128.8, 128.6, 128.5, 127.0, 126.2, 125.8, 123.7, 123.0, 97.2, 82.7, 77.7, 58.8, 53.6, 53.6, 35.0, 30.1, 28.3, 24.3. HRMS m/z 626.2627, (M+H)⁺ calcd for [C₃₇H₃₅F₃N₃O₃]⁺ : 626.2625. IR (neat) 1739, 1672, 1368, 1329, 1154, 1122, 1072, 749, 696. Next to elute was **25f** (71.3 mg, 17%): R_f 0.31 (6:4 petroleum ether : Et₂O); [α]_D²⁰ 1.7 (*c* 0.78, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.47 (9H, s), 2.95 (2H, s), 3.36-3.48 (2H, m), 4.32-4.35 (1H, m), 4.99 (1H, s), 6.97-7.08 (4H, m), 7.20-7.47 (13H, m), 7.65-7.67 (2H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 168.4, 164.4, 150.5, 138.5, 137.8, 137.1, 135.2, 132.5, 131.1, 129.9, 129.7, 129.5, 129.2, 129.1, 129.0, 128.9, 128.5, 127.1, 125.8, 124.1, 121.7, 107.6, 82.9, 77.7, 58.6, 35.6, 31.0, 30.1, 28.3. HRMS m/z 626.2638, (M+H)⁺ calcd for [C₃₇H₃₅F₃N₃O₃]⁺ : 626.2625. IR (neat) 1696, 1408, 1328, 1153, 1120, 1074, 750, 694.

(2'R, 4Z)-1-((Diphenylmethylene)amino)-3-(tert-butyl-3'-phenyl-2'-propanoate)-4-(N'-Boc-3'-indoylmethylene)imidazolidin-2-one (24g)

Using the representative procedure for the synthesis of imidazolidin-2-one **2**, azapropargylglycine **18g** (250 mg, 0.359 mmol) was reacted with NaH (36 mg, 0.89 mmol) in 3 mL of anhydrous acetonitrile for 12 h, and the product was purified with silica gel chromatography using 30% Et₂O in petroleum ether to give a yellow oil (101 mg, 40%): *R_f* 0.45 (6:4 petroleum ether : Et₂O); [α]_D²⁰ 52.78 (*c* 1.07, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.5 (9H, s), 1.71 (9H, s), 3.11 (1H, dd, *J* = 5.0, 13.9 Hz), 3.35-3.41 (1H, m), 3.54 (1H, dd, *J* = 2.0, 13.6 Hz), 3.69 (1H, dd, *J* = 1.3, 13.6 Hz), 4.61 (1H, dd, *J* = 5.0, 10.7 Hz), 4.78 (1H, s), 6.81 (2H, d, *J* = 7.0 Hz), 7.14-7.28 (6H, m), 7.35-7.44 (6H, m), 7.50-7.51 (3H, m), 7.66 (2H, d, *J* = 7.3 Hz), 8.14 (1H, d, *J* = 7.5 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 168.6, 159.6, 157.9, 149.9, 138.7, 138.1, 136.5, 135.6, 135.3, 130.8, 130.4, 129.8, 129.7, 129.0, 128.9, 128.6, 128.5, 126.7, 125.2, 124.6, 123.11, 120.6, 115.5, 114.7, 88.3, 84.3, 82.5, 77.7, 57.8, 53.6, 34.9, 28.6, 28.3. HRMS *m/z* 697.3386, (M+H)⁺ calcd for [C₄₃H₄₅N₄O₅]⁺ : 697.3385. IR (neat) 1726, 1685, 1450, 1367, 1150, 744, 694.

(2'R, 4Z)-1-((Diphenylmethylene)amino)-3-(tert-butyl-3'-phenyl-2'-propanoate)-4-(p-nitrobenzylidene)imidazolidin-2-one ester (24h)

Using the representative procedure for the synthesis of imidazolidin-2-one **2**, azapropargylglycine **22** (210 mg, 0.35 mmol) was reacted with NaH (21 mg, 0.52 mmol) in 3 mL of anhydrous THF for 40 min, and the product was purified with silica gel chromatography using a gradient of 30-50 % Et₂O in petroleum ether to give an orange foam (87 mg, 41%): *R_f* 0.20 (1: 1 petroleum ether : Et₂O); [α]_D²⁰ 15.2 (*c* 0.86, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.47 (9H, s), 2.98-3.08 (2H, m), 3.36 (1H, dd, *J* = 4.2, 14.1 Hz), 3.46 (1H, dd, *J* = 11.0, 14.1 Hz), 4.27 (1H, dd, *J* = 3.6, 11.0 Hz), 5.08 (1H, s), 6.92 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.01-7.04 (2H, m), 7.21-7.46 (11H, m), 7.65 (2H, d, *J* = 7.3 Hz), 8.02 (2H, d, *J* = 8.7 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 168.3, 165.1, 150.4, 147.2, 144.0, 138.4, 137.6, 135.4, 131.2, 129.9, 129.8, 129.6, 129.3, 129.0, 128.6, 127.1, 123.9, 120.8, 108.0, 83.0,

77.7, 58.7, 35.5, 31.0, 28.4. HRMS m/z 603.2605, (M+H)⁺ calcd for [C₃₆H₃₅N₄O₅]⁺ : 603.2602. IR (neat) 1697, 1518, 1407, 1344, 1277, 1152, 693.

(2'R)-1-((Diphenylmethylene)amino)-3-(3'-phenyl-2'-propanoate)-4-methylimidazolin-2-one (4)

tert-Butyl ester **3** (111 mg, 0.23 mmol) was dissolved in 4 ml of a 1:1 DCM:TFA and stirred for 5 h. The volatiles were removed by evaporation under reduced pressure and the residue was dissolved in DCM and concentrated to remove residual TFA to give a brown oil (91 mg, 93%): R_f 0.24 (1:9 MeOH : DCM); $[\alpha]_D^{20}$ 0 (*c* 0.77, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.50 (3H, s), 3.47 (2H, d, *J* = 7.6 Hz), 4.51 (1H, t, *J* = 7.6 Hz), 6.07 (1H, s), 7.13 (2H, d, *J* = 7.1 Hz), 7.19-7.32 (3H, m), 7.46-7.53 (4H, m), 7.61-7.68 (2H, m), 7.82-7.84 (4H, m), 10.72 (1H, brs). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 197.8, 172.4, 151.8, 137.9, 137.1, 133.0, 130.6, 129.6, 129.3, 129.1, 128.7, 127.6, 120.7, 108.7, 77.7, 58.7, 35.2, 9.9. HRMS m/z 426.1819, (M+H)⁺ calcd for [C₂₆H₂₄N₃O₃]⁺ : 426.1812. IR (neat) 2928, 1655, 1446, 1277, 1162, 919, 697.

(2'R)-1-((Diphenylmethylene)amino)-3-(*tert*-butyl-3'-phenyl-2'-propanoate)-4-benzylimidazolin-2-one (26a)

tert-Butyl ester **24a** (174 mg, 0.31 mmol) was treated under the same conditions to prepare acid **4** to provide acid **26a** as a yellow oil (164 mg, >99%): R_f 0.64 (8: 2 EtOAc : hexanes); $[\alpha]_D^{20}$ 36.8 (*c* 0.87, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.98 (2H, dd, *J* = 16.1, 57.6 Hz), 3.38-3.56 (2H, m), 4.40-4.56 (1H, m), 5.77 (1H, d, 25.5 Hz), 6.70-7.85 (20H, m), 10.53 (1H, brs). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 197.9, 172.3, 172.0, 157.4, 157.0, 151.9, 137.9, 137.3, 134.8, 133.1, 130.6, 129.9, 129.4, 129.3, 129.2, 129.0, 128.8, 127.7, 124.3, 117.2, 114.4, 109.9, 58.9, 35.4, 35.3, 30.8. HRMS m/z 502.2124, (M+H)⁺ calcd for [C₃₂H₂₈N₃O₃]⁺ : 502.2125. IR (neat) 3028, 1655, 1447, 1277, 1162, 919, 696.

[*N*-Amino-4-methylimidazolin-2-one⁴]-GHRP-6 (His-D-Trp-Ala-(*N*-amino-4-methylimidazolin-2-one)-D-Phe-Lys-NH₂, 31a). Yield: 10%. LCMS (5-80% MeOH, 20 min) R.T. = 7.09 min; (5-80% MeCN, 20 min) R.T. = 7.11 min; HRMS Calcd *m/z* for C₃₉H₅₂N₁₂O₆[M+2H]²⁺ 392.2061, found 392.2075. ¹H NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.20-1.25 (1H, m), 1.26-1.38 (3H, m), 1.46-1.63 (5H, m), 1.74-1.83 (3H, m), 2.12 (1H, s), 2.43-2.45 (1H, m), 2.63-2.65 (1H, m), 2.75-2.87 (3H, m), 2.98-3.10 (3H, m), 4.16-4.25 (2H, m), 4.35-4.45 (2H, m), 4.58-4.75 (4H, m), 6.09 (0.5H, brs), 6.11 (0.40H, brs), 6.78-6.82 (1H, m), 6.98-7.02 (1H, m), 7.06-7.11 (2H, m), 7.13-7.17 (1H, m), 7.17-7.27 (3H, m), 7.33-7.37 (1H, m), 7.42-7.44 (1H, m), 7.57-7.61 (1H, m), 7.86 (1H, d, *J* = 7.81 Hz), 8.10 (1H, d, *J* = 7.94 Hz), 8.22-8.26 (1H, m), 8.66 (1H, d, *J* = 7.72 Hz), 10.88 (1H, s).

[*N*-Amino-4-benzylimidazolin-2-one⁴]-GHRP-6 (His-D-Trp-Ala-(*N*-amino-4-benzylimidazolin-2-one)-D-Phe-Lys-NH₂, 31b). Yield: 5%. LCMS (5-80% MeOH, 20 min) R.T. = 8.80 min; (5-80% MeCN, 20 min) R.T. = 8.19 min; HRMS Calcd *m/z* for C₄₅H₅₅N₁₂O₆[M+H]⁺ 859.4362, found 859.4364.

Corresponding authors

William D. Lubell. Tel: 514-343-7339. Fax: 514-343-7586.

Acknowledgements

This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT). CP is grateful to NSERC and Boehringer Ingelheim for graduate student fellowships. The authors thank Dr. A. Fürtös, K. Venne, and M-C. Tang for assistance with mass spectrometry. We also thank F. Bélanger-Gariépy and CYLview (<http://www.cylview.org>) for X-ray analysis, G. Beaudry-Dubois and S. Bilodeau for NMR analysis, as well as C. Camy and V. N. G. Lindsay for SFC analysis.

Supporting Information Available. Experimental procedures, compound characterization data, and NMR spectra for new compounds. Crystallographic information files (CIF). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) (a) Kemp, D. S.; Bowen, B. R.; Muendel, C. C. Synthesis and Conformational Analysis of Epindolidione-Derived Peptide Models for β -Sheet Formation. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*(15), 4650-4657. (b) Smith, A. B. III.; Keenan, T. P.; Holcomb, R. C.; Sprengeler, P. A.; Guzman, M. C.; Wood, J. L.; Carroll, P. J.; Hirshmann, R. Design, synthesis, and crystal structure of a pyrrolinone-based peptidomimetic possessing the conformation of a β -strand: potential application to the design of novel inhibitors of proteolytic enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10672-10674. (c) Damewood, J. R. Jr.; Edwards, P. D.; Feeney, S.; Gomes, B. C.; Steelman, P. A. T.; Williams, J. C.; Warner, P.; Woolson, S. A.; Wolanin, D. J.; Veale, C. A. Nonpeptidic Inhibitors of Human Leukocyte Elastase. 2. Design, Synthesis, and *in Vitro* Activity of a Series of 3-Amino-6-arylopyridin-2-one Trifluoromethyl Ketones. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3303-3312. (d) Veale, C. A.; Bernstein, P. R.; Bryant, C.; Ceccarelli, C.; Damewood, J. R. Jr.; Earley, R.; Feeney, S. W.; Gomes, B.; Kosmider, B. J.; Steelman, G. B.; Thomas, R. M.; Vacek, E. P.; Williams, J. C.; Wolanin, D. J.; Woolson, S. Nonpeptidic Inhibitors of Human Leukocyte Elastase. 5. Design, Synthesis, and X-ray Crystallography of a Series of Orally Active 5-Aminopyrimidin-6-one-Containing Trifluoromethyl Ketones. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 98-108. (e) Nowick, J. S. Exploring β -Sheet Structure and Interactions with Chemical Model Systems. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1319-1330. (f) Phillips, S. T.; Rezac, M.; Abel, U.; Kossenjans, M.; Bartlett, P. A. “@-Tides”: The 1,2-Dihydro-3(6*H*)-pyridinone Unit as a β -Strand Mimic. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(1), 58-66. (g) Austin, R. E.; Maplestone, R. A.; Sefler, A. M.; Liu, K.; Hruzewicz, W. N.; Liu, C. W.; Cho, H. S.; Wemmer, D. E.; Bartlett, P. A. A Template for Stabilization of a Peptide α -Helix: Synthesis and Evaluation of Conformational Effects

by Circular Dichroism and NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6461-6472. (h) Kemp, D. S.; Allen, T. J.; Oslick, S. L.; Boyd, J. G. The Structure and Energetics of Helix Formation by Short Templated Peptides in Aqueous Solution. 2. Characterization of the Helical Structure of Ac-Hel₁-Ala₆-OH. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4240-4248.

(2) (a) Freidinger, R. M.; Veber, D. F.; Perlow, D. S.; Brooks, J. R.; Saperstein, R. Bioactive conformation of luteinizing hormone-releasing hormone: evidence from a conformationally constrained analog. *Science*. **1980**, *210*, 656. (b) Freidinger, R. M.; Perlow, D. S.; Veber, D. F. Protected Lactam-Bridged Dipeptides for Use as Conformational Constraints in Peptides. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 104. (c) Freidinger, R. M. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3631. (d) Jamieson, A. G.; Boutard, N.; Beauregard, K.; Bodas, M. S.; Ong, H.; Quiniou, C.; Chemtob, S.; Lubell, W. D. Positional Scanning for Peptide Secondary Structure by Systematic Solid-Phase Synthesis of Amino Lactam Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7917-7927. (e) Boutard, N.; Jamieson, A. G.; Ong, H.; Lubell, W. D. Structure-activity analysis of the growth hormone secretagogue GHRP-6 by alpha- and beta-amino gamma-lactam positional scanning. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2010**, *75*, 40-50.

(3) Proulx, C.; Sabatino, D.; Hopewell, R.; Spiegel, J.; García Ramos, Y.; Lubell, W. D. Azapeptides and their therapeutic potential. *Future Med. Chem.* **2011**, *3*(9), 1139-1164.

(4) (a) Congiu, C.; Cocco, M. T.; Onnis, V. Design, synthesis, and in vitro antitumor activity of new 1,4-diarylimidazole-2-ones and their 2-thione analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 989-993. (b) Xue, N.; Yang, X.; Wu, R.; Chen, J.; He, Q.; Yang, B.; Lu, X.; Hu, Y. Synthesis and biological evaluation of imidazol-2-one derivatives as potential antitumor agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2550-2557.

(5) Bronson, J. J.; DenBleyker, F. L.; Falk, P. J.; Mate, R. A.; Ho, H.-T. Pucci, M. J.; Snyder, L. B. Discovery of the First Antibacterial Small Molecule Inhibitors of MurB. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 873-875.

(6) Carling, R. W.; Moore, K. W.; Moyes, C. R.; Jones, E. A.; Bonner, K.; Emms, F.; Marwood, R.; Patel, S.; Patel, S.; Fletcher, A. E.; Beer, M.; Sohal, B.; Pike, A.; Leeson, P.

- D. 1-(3-Cyanobenzylpiperidin-4-yl)-5-methyl-4-phenyl-1,3-dihydroimidazol-2-one: A Selective High-Affinity Antagonist for the Human Dopamine D4 Receptor with Excellent Selectivity over Ion Channels. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2706-2715.
- (7) (a) Burgey, C. S.; Stump, C. A.; Nguyen, D. N.; Deng, J. Z.; Quigley, A. G.; Norton, B. R.; Bell, I. M.; Mosser, S. D.; Salvatore, C. A.; Rutledge, R. Z.; Kane, S. A.; Koblan, K. S.; Vacca, J. P.; Graham, S. L.; Williams, T. M. Benzodiazepine calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor antagonists: Optimization of the 4-substituted piperidine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5052-5056. (b) Shaw, A.; Paone, D. V.; Nguyen, D. N.; Stump, C. A.; Burgey, C. S.; Mosser, S. D.; Salvatore, C. A.; Rutledge, R. Z.; Kane, S. A.; Koblan, K. S.; Graham, S. L.; Vacca, J. P.; Williams, T. M. Caprolactams as potent CGRP receptor antagonists for the treatment of migraine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4795-4798.
- (8) (a) Smith, R. C.; Reeves, J. C. Antioxidant properties of 2-imidazolones and 2-imidazolthiones. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 1457. (b) Watanabe, K.; Morinaka, Y.; Hayashi, Y.; Shinoda, M.; Nishi, H.; Fukushima, N.; Watanabe, T.; Ishibashi, A.; Yuki, S.; Tanaka, M. 5-Aryl-imidazolin-2-ones as a scaffold for potent antioxidant and memory-improving activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1478-1483.
- (9) (a) Hirao, I.; Kimoto, M.; Harada, Y.; Fujiwara, T.; Sato, A., Yokoyama, S. An unnatural base pair between imidazolin-2-one and 2-amino-6-(2-thienyl)purine in replication and transcription. *Nucleic Acids Res. Suppl.* **2002**, *2*, 37-38. (b) Hirao, I.; Harada, Y.; Kimoto, M.; Mitsui, T.; Fujiwara, T.; Yokoyama, S. A Two-Unnatural-Base-Pair System toward the Expansion of the Genetic Code. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(41), 13298-13305.
- (10) (a) Durant, G. Guanidine derivatives acting at histaminergic receptors. *J. Chem. Soc. Rev.* **1985**, *84*, 375. (b) Cheng, Y. G.; Hu, Y. Z. Synthesis of Arylsubstituted Imidazolin-2-one Analogues. *Chinese Chem. Lett.* **2004**, *15*(11), 1281-1284. (c) Hafner, T.; Kunz, D. Synthesis of Symmetrically and Unsymmetrically Substituted *N,N'*-Diarylimidazolin-2-ones by Copper-Catalyzed Arylamidation under Microwave-Assisted and Conventional Conditions. *Synthesis* **2007**, *9*, 1403-1411.

- (11) (a) Sabatino, D.; Proulx, C.; Klocek, S.; Bourguet, C. B.; Boeglin, D.; Ong, H.; Lubell, W. D. Exploring Side-Chain Diversity by Submonomer Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3650. (b) Sabatino, D.; Proulx, C.; Pohankova, P.; Ong, H.; Lubell, W. D. Structure-Activity Relationships of GHRP-6 Azapeptide Ligands of the CD36 Scavenger Receptor by Solid-Phase Submonomer Azapeptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12493-12506.
- (12) Proulx, C.; Lubell, W. D. Copper-Catalyzed *N*-Arylation of Semicarbazones for the Synthesis of Aza-Arylglycine-Containing Aza-Peptides. *Org. Lett.* **2010**, *12*(13), 2916-2919.
- (13) Proulx, C.; Lubell, W. D. Aza-1,2,3-triazole-3-alanine Synthesis via Copper-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloaddition. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*(15), 5385-5387.
- (14) (a) Chiu, S.-K.; Keifer, L.; Timberlake, J. W. Synthesis of Imidazolidinediones and Oxazolidinediones from Cyclization of Propargylureas and Propargyl Carbamates. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*(6), 746-748. (b) Easton, N. R.; Cassady, D. R.; Dillard, R. D. Reactions of Acetylenic Amines. VIII. Cyclization of Acetylenic Ureas. *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 1851-1855.
- (15) Peshkov, V. A.; Pereshivko, O. P.; Sharma, S.; Meganathan, T.; Parmar, V. S.; Ermolat'ev, D. S.; Van der Eycken, E. V. Tetrasubstituted 2-Imidazolones via Ag(I)-Catalyzed Cycloisomerization of Propargylic Ureas. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5867-5872.
- (16) (a) Lei, A.; Lu, X. Palladium(II)-Catalyzed Tandem Intramolecular Aminopalladation of Alkynes and Conjugate Addition. Synthesis of Oxazolidinones, Imidazolidinones, and Lactams. *Org. Lett.* **2000**, *2*(17), 2699-2702. (b) Fritz, J. A.; Wolfe, J. P. Stereoselective synthesis of imidazolidin-2-ones via Pd-catalyzed alkene carboamination. Scope and limitations. *Tetrahedron* **2008**, *64*(29), 6838-6852.
- (17) (a) Zhang, G.; Luo, Y.; Wang, Y.; Zhang, L. Combining Gold(I)/Gold(III) Catalysis and C-H Functionalization: A Formal Intramolecular [3+2] Annulation towards Tricyclic Indolines and Mechanistic Studies. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1-6. (b) Verniest, G.;

- Padwa, A. Gold- and Silver-Mediated Cycloisomerizations of *N*-Propargylamides. *Org. Lett.* **2008**, *10*(19), 4379-4382.
- (18) Wolf, L. B.; Tjen, K. C. M. F.; ten Brick, H. T.; Blaauw, R. H.; Hiemstra, H.; Schoemaker, H. E.; Rutjes, F. P. J. T. Palladium-Catalyzed Cyclization Reactions of Acetylene-Containing Amino Acids. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 70-83.
- (19) Van Esseveldt, B. C. J.; Vervoort, P. W. H.; van Delft, F. L.; Rutjes, F. P. J. T. Novel Approach to 5-Substituted Proline Derivatives Using a Silver-Catalyzed Cyclization as the Key Step. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1791-1795.
- (20) Bourguet, C. B.; Proulx, C.; Klocek, S.; Sabatino, D.; Lubell, W. D. Solution-phase submonomer diversification of aza-dipeptide building blocks and their application in aza-peptide and aza-DKP synthesis. *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 284-296.
- (21) (a) André, F.; Boussard, G.; Bayeul, D.; Didierjean, C.; Aubry, A.; Marraud, M. Aza-peptides 11. X-Ray structures of aza-alanine and aza-asparagine-containing peptides. *J. Pept. Res.* **1997**, *49*(6), 556-562. (b) André, F.; Vicherat, A.; Boussard, G.; Aubry, A.; Marraud, M. Aza-peptides. III. Experimental structural analysis of aza-alanine and aza-asparagine-containing peptides. *J. Pept. Res.* **1997**, *50*(5), 372-381. (c) Lecoq, A.; Boussard, G.; Marraud, M.; Aubry, A. Crystal state conformation of three azapeptides containing the azaproline residue, a β -turn regulator. *Biopolymers* **1993**, *33*(7), 1051-1059. (d) Marraud, M.; Aubry, A. *Pept. Sci.* Crystal structures of peptides and modified peptides. **1996**, *40*(1), 45-83. (e) Benatalah, Z.; Aubry, A.; Boussard, G.; Marraud, M. Evidence for a β -turn in an azadipeptide sequence. Synthesis and crystal structure of ButCO-Pro-AzaAla-NHPrⁱ. *Int. J. Pept. Protein. Res.* **1991**, *38*(6), 603-605.
- (22) Baures, P. W.; Ojala, W. H.; Gleason, W. B.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. Design, Synthesis, X-ray Analysis, and Dopamine Receptor-Modulating Activity of Mimics of the "C5" Hydrogen-Bonded Conformation in the Peptidomimetic 2-Oxo-3(*R*-) [(2(5'-)p y rrolidinylcarbonyl)amino]-1-pyrrolidineacetamide. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*(22), 3677-3683.

- (23) St-Cyr, D. J.; Maris, T.; Lubell, W. D. Crystal-state Structural Analysis of β -hydroxy- γ -lactam Constrained Ser/Thr Peptidomimetics. *Heterocycles* **2010**, *82*(1), 729-737.
- (24) Lee, H.-J.; Ahn, I.-A.; Ro, S.; Choi, K.-H., Choi, Y.-S.; Lee, K.-B. Role of azaamino acid residue in β -turn formation and stability in designed peptide. *J. Pept. Res.* **2000**, *56*(1), 35–46
- (25) Freidinger, R. M.; Perlow, D. S.; Veber, D. F. Protected Lactam-Bridged Dipeptides for Use as Conformational Constraints in Peptides. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*(1), 104-109.
- (26) Momany, F. A.; Bowers, C. Y.; Reynolds, G. A.; Chang, D.; Hong, A.; Newlander, K. Conformational Energy Studies and *in Vitro* and *in Vivo* Activity Data on Growth Hormone-Releasing Peptides. *Endocrinol.* **1984**, *114*(5), 1531-1536.
- (27) Demers, A.; McNicoll, N.; Febbraio, M.; Serva, M.; Ong, H. Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem. J.* **2004**, *382*, 417-424.
- (28) Bush, C. A.; Sarkar, S. K.; Kopple, K. D. Circular dichroism of β turns in peptides and proteins. *Biochemistry* **1978**, *17*, 4951–4954.
- (29) Bolduc, O. R.; Lambert-Lanteigne, P.; Colin, D. Y.; Zhao, S. S.; Proulx, C.; Boeglin, D.; Lubell, W. D.; Pelletier, J. N.; Féthière, J.; Ong, H.; Masson, J.-F. Modified peptide monolayer binding His-tagged biomolecules for small ligand screening with SPR biosensors. *Analyst* **2011**, *136*, 3142-3148.
- (30) Lambert-Lanteigne, P.; Bolduc, O.; Proulx, C.; Lubell, W. D.; Féthière, J.; Masson, J.-F.; Ong, H. *Analytical Biochemistry* Submitted. Manuscript number: ABIO-12-399.
- (31) Wiltulski, B.; Buschmann, N.; Bergsträber, U. Hydroboration and Suzuki–Miyaura Coupling Reactions with the Electronically Modulated Variant of an Ynamine: The Synthesis of (*E*)- β -Arylenamides. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8473.
- (32) Cliff, M. D.; Pyne, S. G. Synthesis of 4,4'-Biimidazoles. *Synthesis* **1994**, 681.
- (33) Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D.; *Purification of Laboratory Chemicals*, Butterworth-Heinemann, 1996, p.381.

(34) Novabiochem catalog, 3: *Peptide synthesis protocols*, EMD Biosciences, 2006-2007, p.3.4

(35) Lubell, W. D.; Blankenship, J. W.; Fridkin, G.; Kaul, R. *Peptides. Science of Synthesis 21.11, Chemistry of Amides*; Thieme: Stuttgart, Germany, 2005; pp 713-809.

6.3 **Conclusion et perspectives**

Dans ce chapitre, nous avons décrit le développement d'une approche synthétique générant des *N*-amino imidazolin-2-ones substitués à la position 4 comme nouveau type de mimes peptidiques avec conformation en repliement β . Nous avons ensuite démontré que ces sous-unités pouvaient être incorporées dans une séquence peptidique (GHRP-6) et illustré l'importance du substituant à la position 4 de l'hétérocycle tant au niveau de l'affinité pour le récepteur CD36 que de son activité biologique et sa conformation. Par le fait même, nous avons démontré que la substitution du résidu Trp⁴ de GHRP-6 pour une sous-unité *N*-amino 4-méthyl imidazolin-2-one permettait de maintenir l'affinité pour le récepteur CD36 comparativement au peptide parent avec une hausse d'inhibition de la phosphorylation des protéines kinases JNK.

L'épimérisation observée suivant les étapes d'alkylation et de cyclisation *5-exo-dig*, toutes deux nécessitant une base, est le principal désavantage de cette approche. En collaboration avec Dr Yésica García Ramos, nous sommes présentement à la recherche de nouvelles conditions ou substrats qui permettraient de minimiser l'épimérisation durant ces deux étapes. L'utilisation, entre autres, d'une semicarbazone dérivée du fluorénone, plutôt que du benzophénone, est une stratégie envisagée. L'élaboration d'une approche pour la synthèse de *N*-amino imidazolin-2-ones substitués à la position 5 par des groupements méthyles, benzyles et aryles, constitue un deuxième objectif important. Le positionnement spatial de la chaîne latérale de ces peptidomimétiques se rapprocherait davantage de celui des acides aminés naturels.

Chapitre 7 : Conclusions générales

7.1 Conclusions générales

Les azapeptides sont des mimes peptidiques qui contiennent un ou plusieurs acides aminés « aza », où le carbone α est substitué par un atome d'azote. Cette modification confère aux peptidomimétiques une stabilité accrue, une résistance aux protéases et une tendance à adopter une conformation en repliement β . Par conséquent, les azapeptides sont des candidats idéaux pour le développement potentiel de ligands sélectifs à un récepteur. Une des limitations des azapeptides découle du fait que leur synthèse nécessite l'activation et le couplage d'hydrazides substituées préalablement synthétisées en solution, ce qui entrave leur utilisation lors d'études SAR élaborées. Les travaux de mon doctorat ont mené au développement d'une méthodologie pour la synthèse parallèle d'azapeptides, laquelle nous avons appliquée à fins d'études de structures-activité du peptide GHRP-6.

Avant d'entreprendre ma recherche de doctorat, nous avions une connaissance relativement limitée des facteurs structurels requis pour la liaison de dérivés aza-GHRP-6 au récepteur CD36 et de la réponse biologique qui s'en suivait. Un des meilleurs candidats, [azaTyr⁴]-GHRP-6, avait démontré une baisse d'affinité pour le récepteur GHS-R1a d'un facteur de 10^4 et une activité anti-angiogénique intéressante. Les travaux de mon doctorat ont permis d'élucider davantage le potentiel des dérivés aza-GHRP-6 en tant que modulateurs sélectifs du récepteur CD36. Nous avons notamment démontré que la substitution His¹ pour un résidu Ala¹ dans le peptide [azaPhe⁴]-GHRP-6 conférait une meilleure sélectivité pour le récepteur CD36 et une réponse biologique divergente (angiogénique vs anti-angiogénique), malgré les similitudes conformationnelles. Ceux-ci modulent l'activité angiogénique du récepteur CD36 via un site de liaison différent de la thrombospondine 1 (TSP-1). Nous avons à présent une meilleure compréhension du plein potentiel des analogues aza-GHRP-6 en tant que ligands du récepteur CD36. Au sein de notre collaboration avec les professeurs Huy Ong, Sylvain Chemtob et Jean-François Masson, la synthèse de ces bibliothèques d'azapeptides a mené au désir d'élaborer des méthodes de criblage à haut débit, soit par l'utilisation d'un essai cellulaire (laboratoire du Pr Ong) ou

d'une technique basée sur la résonance de plasmons de surface (laboratoire du Pr Masson). Nous sommes donc dans la bonne voie vers le développement de dérivés aza-GHRP-6 en tant qu'agents thérapeutiques, malgré notre recherche continue de ligands avec affinité supérieure au GHRP-6 pour le récepteur CD36 ($IC_{50} > 10^{-6}$ M).

Les efforts de mes travaux de doctorat se sont également penchés vers l'élaboration d'une nouvelle approche pour la synthèse parallèle d'azapeptides. Dans cette méthodologie, un groupement semicarbazone est utilisé afin de substituer l'azote α directement sur support solide, via la *N*-alkylation ou *N*-arylation régiosélective de la semicarbazone. Cette approche, qui n'a recourt à aucune étape de synthèse en solution, constitue une méthodologie beaucoup plus efficace pour la synthèse de larges banques d'azapeptides. Elle permet également le balayage d'acides aminés aza-arylglycines, qui n'avait jusqu'à présent jamais été effectué dans un peptide. De plus, elle permet l'incorporation de chaînes latérales sur l'acide aminé « aza » qui serait difficilement accessibles par d'autres voies synthétiques, telle qu'une substitution propargyle. Malgré les avancements auxquels nous avons contribué, le plein potentiel de cette méthodologie sera atteint une fois qu'elle sera adaptée à un processus de synthèse peptidique automatisé.

La versatilité synthétique des résidus aza-propargylglycine obtenus par cette méthode nous a permis de les fonctionnaliser davantage via une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire et un couplage A^3 , illustrant notre capacité de synthétiser des « bibliothèques de bibliothèques » d'azapeptides par cette approche. La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire a été effectuée directement sur support solide, où les azotures aromatiques ont été générés *in situ* à partir d'iodures d'aryles et d'iodure de cuivre. Dans les deux cas, la chimie développée a été appliquée vers la synthèse d'analogues avec acides aminés « aza » à la position Trp⁴ du GHRP-6, qui ont été testés par SPR dans le laboratoire du Pr Jean-François Masson. En plus d'avoir développé des conditions fournissant des azapeptides avec chaînes latérales nouvelles, certains des dérivés [azaLys⁴]-GHRP-6 ont démontré une affinité pour le récepteur CD36 légèrement supérieure à celle d'un de nos meilleurs ligands, [azaTyr⁴]-GHRP-6 ($K_d = 0.513 \times 10^{-6}$ M vs 1.53×10^{-6} M).

Enfin, un dipeptide avec résidu aza-propargylglycine a été converti en *N*-amino-4-méthyl- et *N*-amino-4-benzyl-imidazolin-2-ones via une séquence réactionnelle impliquant un couplage Sonogashira et une réaction de cyclisation *5-exo-dig*, afin de fournir un nouveau type de mime peptidique. Leur conformation en repliement β a été confirmée par cristallographie aux rayons X et par spectroscopie RMN d'un tetrapeptide modèle. De plus, malgré l'absence de chaîne latérale à caractère aromatique, le dérivé [4-méthyl *N*-amino-imidazolin-2-one⁴]-GHRP-6 a démontré une affinité pour le récepteur CD36 et une activité inhibitrice de la phosphorylation des protéines kinases JNK.

Somme toute, l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse constitue un pas important vers le développement d'analogues aza-GHRP-6 en tant que ligands du récepteur CD36 pour la modulation de l'angiogénèse. Ceci pourrait avoir des retombées importantes, notamment pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, de tumeurs et de la rétinopathie diabétique. D'autre part, la méthodologie décrite pour la synthèse parallèle d'azapeptides devrait contribuer à augmenter l'accessibilité des azapeptides en tant qu'agents thérapeutiques. L'étendue de cette approche permet également d'augmenter la diversité des chaînes latérales des azapeptides. L'utilisation de notre approche devrait donc permettre à la communauté scientifique de mener des études SAR plus élaborées à l'aide d'azapeptides, particulièrement dans les peptides où la conformation active est celle d'un repliement β .

Partie expérimentale

Partie expérimentale additionnelle pour les chapitres 3, 4, 5 et 6.

General. Unless specified, all non-aqueous reactions were run under an inert atmosphere (argon). All glassware was stored in the oven or flame-dried and let cool under an inert atmosphere prior to use. Anhydrous solvents were obtained either by filtration through drying columns (THF, Et₂O, CH₂Cl₂, DMF, CH₃CN, toluene) on a GlassContour system (Irvine, CA) or by distillation over sodium/benzophenone (dioxane). Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on glass-backed silica gel plates (Merck 60 F254). Visualization of the developed chromatogram was performed by UV absorbance or staining with Ceric Ammonium Molybdate. Silica gel chromatography was performed using 230-400 mesh silica (Silicycle). Melting points were obtained on a Buchi melting point apparatus and are uncorrected. Infrared spectra were taken on a Perkin Elmer Spectrum One FTIR instrument and are reported in reciprocal centimetres (cm⁻¹). Nuclear magnetic resonance spectra (¹H, ¹³C, COSY) were recorded either on a Bruker AV 300, AMX 300, AV 400, AMX 400, or DMX 700 spectrometer. Optical rotations were determined with a Perkin-Elmer 341 polarimeter at 589 or 546 nm. Data are reported as follows: [α]_{λtemp}, concentration (*c* in g/100 mL), and solvent. High resolution mass spectra were performed by the Centre régional de spectroscopie de masse de l'Université de Montréal. Polystyrene Rink Amide resin (0.64 or 0.5 mmol/g, 75-100 mesh) was purchased from Advanced Chemtech™. Loading of the resin was determined by elemental analysis and standard Fmoc loading test.¹ Solid phase chemistry was performed in filtration tubes equipped with caps and stopcocks purchased from SUPELCO. Analytical LCMS and HPLC analyses were performed on either a 5 μM, 150 or 50 mm x 4.6 mm C18 Phenomenex Gemini column™ with a flow rate of 0.5 mL/min using respectively a 0-80% or 0-40% gradient from pure water [0.1% formic acid (FA)] to mixtures with CH₃CN (0.1% FA) or MeOH (0.1% FA).

¹ Novabiochem catalog, 3 : *Peptide synthesis protocols*, EMD Biosciences, 2006-2007, p.3.4

Aza-peptides were purified on a semi-preparative column (5 μ M, 250 mm x 21.2 mm, C18 Gemini column™) using respectively a 2-40% or 2-80% gradient from pure water (0.1% FA) to mixtures with MeOH (0.1% FA) at a flow rate of 10.6 mL/min.

Fmoc-based SPPS: Fmoc deprotection and HBTU couplings.

Peptide syntheses were performed under standard conditions on an automated shaker using polystyrene Rink amide resin (0.64 mmol/g, 75-100 mesh). Couplings of amino acids (3 equiv) were performed in DMF using HBTU (3 equiv) as coupling reagent and DIEA (6 equiv). Fmoc deprotections were performed by treating the resin 2 x with 20% piperidine in DMF for 30 min. Resin was washed after each coupling and deprotection step sequentially with DMF (3 x 10 mL), MeOH (3 x 10 mL), and DCM (3 x 10 mL). The purity of peptide fragments was ascertained by LCMS analysis after cleavage and deprotection of a small aliquot of resin.

Deprotection and cleavage of azapeptides from the resin

The Rink resin-bound peptide was deprotected and cleaved from the support using a freshly made solution of TFA/H₂O/TES (95:2.5:2.5, v/v/v, 20 mL/g of peptide resin) at room temperature for 2 h. The resin was filtered and rinsed with TFA. The filtrate and rinses were concentrated until a crude oil persisted, from which a precipitate was obtained by addition of cold ether. After centrifugation, the supernatant was removed and the crude peptide was taken up in aqueous acetonitrile (10% v/v) and freeze-dried to a white solid prior to analysis.

CD Spectroscopy

All CD spectra were recorded on a Chirascan CD Spectrometer (Applied Photophysics, Leatherhead, United Kingdom) using a 1.0 cm path-length quartz cell containing 20 μ M of peptide dissolved in Milli-Q water. The experimental settings were: 1 nm, bandwidth; 0.5 nm, step size; 3 sec, sampling time.

SPR Spectroscopy. The affinity of the small peptide ligand binding to a recombinant soluble His-tagged CD36 functionalized surface was screened by SPR sensing as previously described.² Briefly, the SPR sensors were prepared by immobilizing the His-tagged CD36 to 3-mercaptopropionyl-leucinyl-histidinyl-aspartyl-leucinyl-histidinyl-aspartic acid (3-Mpa-LHDLHD) with N α ,N α -bis(carboxymethyl)-L-lysine at the C-terminus, a modified peptide monolayer competent to bind His-tagged biomolecules. A calibration curve of the SPR response for ligand concentrations ranging from 100 nM to 30 μ M was fitted to the Langmuir isotherm (Equation 1) to determine K ($K = 1/K_d$) for the CD36-ligand system.

$$\Delta\lambda_{\text{SPR}} = (K [\text{ligand}]) \Delta\lambda_{\text{SPRmax}} (1 + K [\text{ligand}])^{-1} \quad (1)$$

1. Chapitre 3

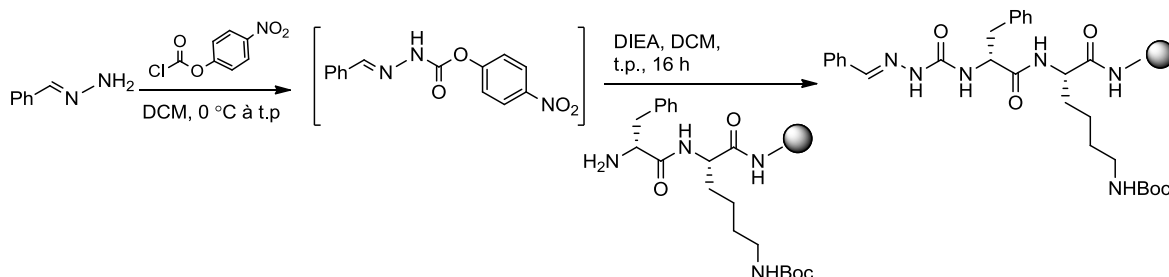
The following experimental procedures and characterization data of compounds was reproduced in part from Org. Lett. 2009, 11, 3650-3653. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ol901423c> (supporting information). Available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Reagents. Reagents such as benzophenone hydrazone, benzaldehyde, hydrazine hydrate, *p*-nitrophenyl chloroformate, potassium *tert*-butoxide, benzyl bromide, 4-methoxybenzyl chloride, 4-trifluoromethylbenzyl bromide, 2-(chloromethyl)pyridine hydrochloride, iodomethane, 2-iodopropane, 80% propargyl bromide in toluene, allyl bromide, 3-bromo-1-phenyl-1-propene, hydroxylamine hydrochloride, pyridine, triphosgene, formic acid (FA), *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) and 2,4,6-collidene, all were purchased from Aldrich and used without further purification. Commercially available Fmoc amino acids, Fmoc-

² Bolduc, O. R.; Lambert-Lanteigne, P.; Colin, D. Y.; Zhao, S. S.; Proulx, C.; Boeglin, D.; Lubell, W. D.; Pelletier, J. N.; Féthière, J.; Ong, H.; Masson, J.-F. Modified peptide monolayer binding

His(Trt), Fmoc-D-Trp(Boc), Fmoc-Ala, Fmoc-Trp(Boc), Fmoc-D-Phe, FmocLys(Boc) and coupling reagents such as HBTU and diisopropylcarbodiimide (DIC) were purchased from GL Biochem™ and used as received.

Representative protocol for azaGly-peptide synthesis, preparation of semicarbazone-protected azaGly-peptide resin:

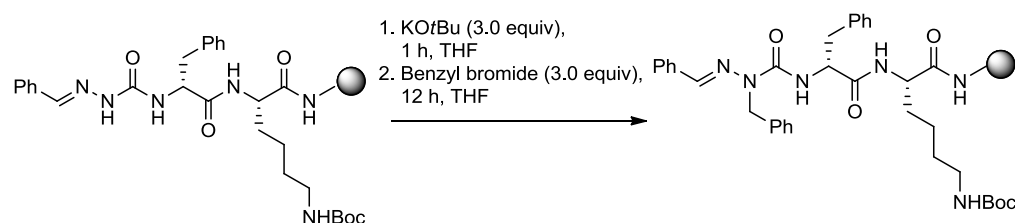


To a stirred solution of EtOH (1.5 mL) and hydrazine hydrate (60 μ L, 1.8 mmol) at 0°C, benzaldehyde (60 μ L, 0.6 mmol) was added dropwise. Complete formation of phenyl hydrazone was usually observed after 15 min by TLC, [(2:1 Hexanes: EtOAc), R_f (benzaldehyde): 0.7 and R_f (benzaldehyde hydrazone): 0.6]. The mixture was poured directly into H₂O (5 mL) and extracted with DCM (3 x 5 mL). The organic phase was separated, dried with MgSO₄ and concentrated in-vacuo to yield the benzaldehyde hydrazone as a yellow-tinged oil that was employed without further purification. Benzaldehyde hydrazone (70 mg, 0.6 mmol, 3 equiv.) in DCM (1 mL) was respectively added dropwise over 15 min to a solution of *p*-nitrophenyl chloroformate (125 mg, 0.61 mmol, 3.2 equiv.) in DCM (1 mL) at 0°C. The reaction mixture was stirred at room temperature under argon for an additional 1.5 h, when TLC [(2:1 Hexane: EtOAc), R_f (benzaldehyde hydrazone): 0.6] indicated complete consumption of the starting material. To this mixture was added dropwise DIEA (210 μ L, 1.2 mmol, 6 equiv.) over 20 min at

His-tagged biomolecules for small ligand screening with SPR biosensors. *Analyst* **2011**, *136*, 3142-3148.

0°C and the suspension was quickly transferred to the resin. The reaction was mixed on an automated shaker for 16 h at room temperature. The resin was filtered and washed under vacuum with DMF (3 x 10 mL), MeOH (3 x 10 mL), THF (3 x 10 mL), and DCM (3 x 10 mL). The extent of reaction conversion was monitored on an aliquot (3 mg) of resin which was subjected to 1 mL of TFA/TES/H₂O (95:2.5:2.5, v/v/v) for resin cleavage and the crude was analyzed by LCMS. **Benzaldehyde semicarbazone-D-Phe-Lys-NH₂**. LCMS (0-80% MeOH, 10 min) R.T. = 5.9 min; LCMS (ESI) calcd for C₂₃H₃₂N₆O₃ [M+2H]⁺, 440.5 found *m/z* 441.3.

Representative alkylation of azaGly, preparation of azaPhe-peptide resin



To the swollen semicarbazone peptide bound resin (0.1 g, 67 μmol) in THF (1 mL), potassium *tert*-butoxide (25 mg, 0.2 mmol, 3 equiv.) was added. The mixture was agitated on an automated shaker for 30 min, treated with the benzyl bromide (24 μL, 0.2 mmol, 3 equiv.) and agitated at room temperature for an additional 16 h. The resin was filtered and washed with DMF (2 x 10 mL), MeOH (2 x 10 mL), THF (2 x 10 mL), and DCM (2 x 10 mL) and dried under vacuum. The extent of reaction conversion was monitored on an aliquot (3 mg) of resin which was subjected to 1 mL of TFA/TES/H₂O (95:2.5:2.5, v/v/v) for resin cleavage and the crude was analyzed by LCMS. **Benzaldehyde semicarbazone-(benzyl)-D-Phe-Lys-NH₂**. LCMS (0-80% MeOH, 10 min) R.T. = 6.2 min; LCMS (ESI) calcd for C₃₀H₃₈N₆O₃ [M+2H]⁺, 530.7 found *m/z* 531.3.

Representative protocol for semicarbazone removal, preparation of azaPhe- D-Phe-Lys-(Boc) peptide resin



Resin-bound semicarbazone (0.1 g, 67 μmol) was treated with a solution of 1.5 M $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ in pyridine (2.5 mL) and heated with sonication at 60°C for 12 h. The resin was filtered and washed under vacuum with 10% DIEA:DMF (3 x 10 mL), DMF (3 x 10 mL), MeOH (3 x 10 mL), THF (3 x 10 mL), and DCM (3 x 10 mL). The extent of reaction conversion was monitored on an aliquot (3 mg) of resin which was subjected to 1 mL of TFA/TES/ H_2O (95:2.5:2.5, v/v/v) for resin cleavage and the crude was analyzed by LCMS. **azaPhe-D-Phe-Lys-NH₂**. LCMS (0-80% MeOH, 10 min) R.T. = 5.6 min; LCMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 440.2 found m/z 441.3.

Characterization of aza-peptides

His-D-Trp-Ala-azaPhe-D-Phe-Lys-NH₂ (136). LCMS (0-40% MeOH, 20 min) R.T. = 16.3 min; (0-40% MeCN, 20 min) R.T. = 13.3 min; LCMS (ESI) calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{55}\text{N}_{12}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 835.4 found m/z 835.2; HRMS Calcd m/z for $\text{C}_{43}\text{H}_{55}\text{N}_{12}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 835.4362, found 835.43494. **His-D-Trp-Ala-aza(*p*-methoxy)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (137)**. LCMS (0-40% MeOH, 20 min) R.T. = 16.9 min; (0-40% MeCN, 20 min) R.T. = 13.2 min; LCMS (ESI) calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{57}\text{N}_{12}\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 865.4 found m/z 865.2; HRMS Calcd m/z for $\text{C}_{44}\text{H}_{57}\text{N}_{12}\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 865.44677, found 865.44611. **His-D-Trp-Ala-aza(*p*-trifluoromethyl)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (138)**. LCMS (0-40% MeOH, 20 min) R.T. = 20.6 min; (0-40% MeCN, 20 min) R.T. = 15.1 min; LCMS (ESI) calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{54}\text{F}_3\text{N}_{12}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 902.9 found m/z 903.2; HRMS Calcd m/z for $\text{C}_{44}\text{H}_{54}\text{F}_3\text{N}_{12}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 903.42359, found 903.42303. **His-D-Trp-azaAla-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (139)**. LCMS (0-40% MeOH,

20 min) R.T. = 16.7 min; (0-40% MeCN, 20 min) R.T. = 13.5 min; LCMS (ESI) calcd for $C_{45}H_{56}N_{13}O_6$ $[M+H]^+$, 873.9 found m/z 874.2; HRMS Calcd m/z for $C_{45}H_{56}N_{13}O_6$ $[M+H]^+$ 874.4471, found 874.44707. **His-D-Trp-aza-(allyl)Gly-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (140).** LCMS (0-40% MeOH, 20 min) R.T. = 17.2 min; (0-40% MeCN, 20 min) R.T. = 13.8 min; LCMS (ESI) calcd for $C_{47}H_{58}N_{13}O_6$ $[M+H]^+$, 900.4 found m/z 900.2; HRMS Calcd m/z for $C_{47}H_{58}N_{13}O_6$ $[M+H]^+$ 900.46275, found 900.46228. **His-D-Trp-aza-(propargyl)Gly-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (141).** LCMS (0-40% MeOH, 20 min) R.T. = 18.2 min; (0-40% MeCN, 20 min) R.T. = 13.6 min; LCMS (ESI) calcd for $C_{47}H_{56}N_{13}O_6$ $[M+H]^+$, 898.4 found m/z 898.5; HRMS Calcd m/z for $C_{47}H_{56}N_{13}O_6$ $[M+H]^+$ 898.4471, found 898.44678. **His-D-Trp-azaVal-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (142).** LCMS (0-40% MeOH, 20 min) R.T. = 22.5 min; (0-40% MeCN, 20 min) R.T. = 17.4 min; LCMS (ESI) calcd for $C_{47}H_{60}N_{13}O_6$ $[M+H]^+$, 902.5 found m/z 902.5; HRMS Calcd m/z for $C_{47}H_{60}N_{13}O_6$ $[M+H]^+$ 902.4784, found 902.47626. **His-aza-(2-pyridyl)Ala-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (143).** LCMS (0-40% MeOH, 20 min) R.T. = 10.5 min; (0-40% MeCN, 20 min) R.T. = 9.91 min; LCMS (ESI) calcd for $C_{42}H_{54}N_{13}O_6$ $[M+H]^+$, 836.4 found m/z 836.2; HRMS Calcd m/z for $C_{42}H_{54}N_{13}O_6$ $[M+H]^+$ 836.43145, found 836.43069. **His-aza-(p-trifluoromethyl)Phe-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (144).** LCMS (0-40% MeOH, 20 min) R.T. = 21.1 min; (0-40% MeCN, 20 min) R.T. = 14.9 min; LCMS (ESI) calcd for $C_{44}H_{54}F_3N_{12}O_6$ $[M+H]^+$, 902.9 found m/z 903.4; HRMS Calcd m/z for $C_{44}H_{54}F_3N_{12}O_6$ $[M+H]^+$ 903.42359, found 903.42341. **His-aza-(cinnamoyl)Gly-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (145).** LCMS (0-40% MeOH, 20 min) R.T. = 19.5 min; (0-40% MeCN, 20 min) R.T. = 14.1 min; LCMS (ESI) calcd for $C_{45}H_{57}N_{12}O_6$ $[M+H]^+$, 861.5 found m/z 861.5; HRMS Calcd m/z for $C_{45}H_{57}N_{12}O_6$ $[M+H]^+$ 861.45185, found 861.4515. **His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂.** LCMS (0-40% MeOH, 20 min) R.T. = 15.3 min; (0-40% MeCN, 20 min) R.T. = 13.7 min; LCMS (ESI) calcd for $C_{46}H_{57}N_{12}O_6$ $[M+H]^+$, 873.5 found m/z 873.5; HRMS Calcd m/z for $C_{46}H_{57}N_{12}O_6$ $[M+H]^+$ 873.45185, found 873.44997.

2. **Chapitre 4 (article 2, supporting information) :**

The following experimental procedures and characterization data of compounds was reproduced in part from *Org. Lett.* **2010**, 12(13), 2916-2919. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ol100932m> (supporting information). Available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Reagents. 3-Iodoanisole, 4-iodoanisole, 4-iodotoluene, 1-iodo-4-fluorobenzene, and iodobenzene were purchased from Aldrich and filtered through a small plug of silica prior to use. Copper iodide was purchased from Aldrich and purified by dissolving it in a boiling saturated solution of aqueous NaI, followed by dilution with water, filtering and washing.³ Ethylene diamine and 1,4-dioxane were freshly distilled over NaOH, followed by distillation over sodium, and stored under argon. Potassium *tert*-butoxide, *N*-methylmorpholine, and isobutyl chloroformate were purchased from Aldrich and used as received. The amino acids, Fmoc-His(Trt), Fmoc-D-Trp(Boc), Fmoc-Ala, Fmoc-Trp(Boc), Fmoc-D-Phe, FmocLys(Boc), and H-Phe-OtBu, and coupling reagents such as HBTU and diisopropylcarbodiimide (DIC) were purchased from GL Biochem™ and used as received.

Procedure for the *N*-arylation of semicarbazone on solid support

Table 1. Optimization of the *N*-Arylation conditions of resin bound semicarbazone **3**.

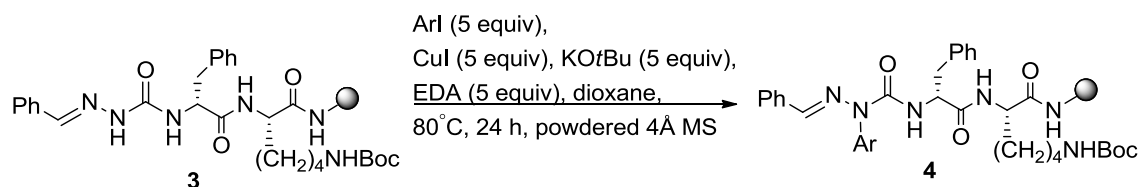
Entry	Solvent	Base	Additive	LCMS conversion (214nm) (%)
1	DMSO	Cs ₂ CO ₃	N/A	20
2	DMSO	K ₃ PO ₄	N/A	34
3	DMSO	K ₂ CO ₃	N/A	34

³ Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D.; *Purification of Laboratory Chemicals*, Butterworth-Heinemann, 1996, p.381.

4	DMSO	Cs ₂ CO ₃	4-hydroxy-L-proline	49
5	DMF	Cs ₂ CO ₃	N/A	51
6	DMF	Cs ₂ CO ₃	Ethylene diamine ^a	49 ^b
7	Dioxane	<i>t</i> BuOK	Ethylene diamine, powdered MS 4Å	75

- a- Other ligands tried: L-Glycine, L-Sarcosine, L-Proline, 4-Hydroxy-L-Proline, L-Cysteine, *N,N'*-dimethylethylene diamine, (+/-)-trans-1,2-diaminocyclohexane.
- b- Complete disappearance of starting material accompanied by formation of an unknown side product.

Representative protocol for *N*-arylation of semicarbazone on solid support



The swollen semicarbazone peptide bound resin **3** (300 mg, 0.192 mmoles) in freshly distilled dioxane was treated sequentially with the aryl iodide (5 equiv, 0.96 mmoles), CuI (190 mg, 0.96 mmoles, 5 equiv), KO*t*Bu (108 mg, 0.96 mmoles, 5 equiv), ethylene diamine (64 μL, 0.96 mmoles, 5 equiv) and powdered 4 Å molecular sieves. The resin was kept under argon atmosphere throughout manipulations. The 6.0 mL SUPELCO filtration tubes were capped, sealed with parafilm, and heated in a water bath with sonication at 80 °C for 24 hours. The resin was filtered and washed under vacuum with DMF (3 x 10 mL), DMF/0.1N HCl (3:1) (3 x 10 mL), H₂O (3 x 10 mL), MeOH (3 x 10 mL), THF (3 x 10 mL), and DCM (3 x 10 mL). The extent of reaction conversion was monitored on an aliquot of resin which was subjected to TFA/TES/H₂O (95:2.5:2.5, v/v/v) for resin cleavage and the crude filtered solution was analyzed by LCMS.

Benzaldehyde semicarbazone-(benzene)-D-Phe-Lys-NH₂ (4a). LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 19.42 min; LCMS (ESI) calcd for C₂₉H₃₅N₆O₃ [M+H]⁺, 515.2 found *m/z* 515.2.

Benzaldehyde semicarbazone-(3-anisole)-D-Phe-Lys-NH₂ (4b). LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 18.91 min; LCMS (ESI) calcd for C₃₀H₃₇N₆O₄ [M+H]⁺, 545.2 found *m/z* 545.2. **Benzaldehyde semicarbazone-(4-anisole)-D-Phe-Lys-NH₂ (4c).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 18.99 min; LCMS (ESI) calcd for C₃₀H₃₇N₆O₄ [M+H]⁺, 545.2 found *m/z* 545.2. **Benzaldehyde semicarbazone-(4-toluene)-D-Phe-Lys-NH₂ (4d).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 19.47 min; LCMS (ESI) calcd for C₃₀H₃₇N₆O₃ [M+H]⁺, 529.2 found *m/z* 529.2. **Benzaldehyde semicarbazone-(4-fluorobenzene)-D-Phe-Lys-NH₂ (4e).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 18.74 min; LCMS (ESI) calcd for C₂₉H₃₄N₆O₃F [M+H]⁺, 533.2 found *m/z* 533.2. **Benzaldehyde semicarbazone-(3-indole)-D-Phe-Lys-NH₂ (4f).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 19.91 min; LCMS (ESI) calcd for C₃₁H₃₆N₇O₃ [M+H]⁺, 554.2 found *m/z* 554.2. **Benzaldehyde semicarbazone-(5-imidazole)-D-Phe-Lys-NH₂ (4g).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 16.41 min; LCMS (ESI) calcd for C₃₆H₃₃N₈O₃ [M+H]⁺, 439.2 found *m/z* 439.2. **Benzaldehyde semicarbazone-(benzene)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (9a).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 19.10 min; LCMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₀N₉O₅ [M+H]⁺, 772.4 found *m/e* 772.4. **Benzaldehyde semicarbazone-(3-anisole)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (9b).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 19.51 min; LCMS (ESI) calcd for C₄₄H₅₂N₉O₆ [M+H]⁺, 802.4 found *m/e* 802.4. **Benzaldehyde semicarbazone-(4-anisole)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (9c).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 19.45 min; LCMS (ESI) calcd for C₄₄H₅₂N₉O₆ [M+H]⁺, 802.4 found *m/e* 802.4. **Benzaldehyde semicarbazone-(4-toluene)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (9d).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 19.91 min; LCMS (ESI) calcd for C₄₄H₅₂N₉O₅ [M+H]⁺, 786.4 found *m/e* 786.4. **Benzaldehyde semicarbazone-(4-fluorobenzene)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (9e).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 19.27 min; LCMS (ESI) calcd for C₄₃H₄₉N₉O₅F [M+H]⁺, 790.3 found *m/e* 790.4. **Benzaldehyde semicarbazone-(3-indole)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (9f).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 19.46 min; LCMS (ESI) calcd for C₄₅H₅₁N₁₀O₅ [M+H]⁺, 811.4 found *m/e* 811.4.

Characterization of [aza-arylgly] GHRP-6 aza-peptides (6a-g, 10a-f, R=H)

His-D-Trp-Ala-aza(phenylglycine)-D-Phe-Lys-NH₂ (6a). LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 9.53 min; (0-80% MeCN, 20 min) R.T. = 8.4 min; HRMS Calcd m/z for C₄₂H₅₃N₁₂O₆ [M+H]⁺ 821.4205, found 821.4217. **His-D-Trp-Ala-aza(*o*-anisole)-D-Phe-Lys-NH₂ (6b).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 10.35 min; (0-40% MeCN, 35 min) R.T. = 14.17 min; HRMS Calcd m/z for C₄₃H₅₅N₁₂O₇ [M+H]⁺ 851.4311, found 851.4293. **His-D-Trp-Ala-aza(*p*-anisole)-D-Phe-Lys-NH₂ (6c).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 10.21 min; (0-80% MeCN, 35 min) R.T. = 8.41 min; HRMS Calcd m/z for C₄₃H₅₅N₁₂O₇ [M+H]⁺ 851.4311, found 851.4307. **His-D-Trp-Ala-aza(*p*-toluene)-D-Phe-Lys-NH₂ (6d).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 10.34 min; (0-40% MeCN, 35 min) R.T. = 14.53 min; HRMS Calcd m/z for C₄₃H₅₅N₁₂O₆ [M+H]⁺ 835.4362, found 835.4352. **His-D-Trp-Ala-aza(*p*-fluoro benzene)-D-Phe-Lys-NH₂ (6e).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 9.77 min; (0-40% MeCN, 35 min) R.T. = 13.79 min; HRMS Calcd m/z for C₄₂H₅₂FN₁₂O₆ [M+H]⁺ 839.4111, found 839.4107. **His-D-Trp-Ala-aza(indoyl)-D-Phe-Lys-NH₂ (6f).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 10.50 min; (0-80% MeCN, 35 min) R.T. = 8.62 min; HRMS Calcd m/z for C₄₄H₅₃N₁₃O₆ [M+H]⁺ 860.4314, found 860.4321. **His-D-Trp-Ala-aza(imidazolyl)-D-Phe-Lys-NH₂ (6g).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 7.84 min; (0-80% MeCN, 35 min) R.T. = 7.31 min; HRMS Calcd m/z for C₃₉H₅₁N₁₄O₆ [M+H]⁺ 811.4111, found 811.4081. **His-Aza(phenylglycine)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (10a).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 8.51 min; (0-40% MeCN, 35 min) R.T. = 11.50 min; HRMS Calcd m/z for C₄₂H₅₃N₁₂O₆ [M+H]⁺ 821.4206, found 821.4204. **His-Aza(*o*-anisole)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (10b).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 10.18 min; (0-40% MeCN, 35 min) R.T. = 12.90 min; HRMS Calcd m/z for C₄₃H₅₅N₁₂O₇ [M+H]⁺ 851.4311, found 851.4296. **His-Aza(*p*-anisole)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (10c).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 10.10 min; (0-80% MeCN, 35 min) R.T. = 7.39 min; HRMS Calcd m/z for C₄₃H₅₅N₁₂O₇ [M+H]⁺ 851.4311, found 851.4301. **His-Aza(*p*-toluene)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (10d).** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 9.39 min; (0-80% MeCN, 35 min) R.T. = 7.61 min; HRMS Calcd m/z for C₄₃H₅₅N₁₂O₆ [M+H]⁺ 835.4362,

found 835.4359. **His-Aza(*p*-fluoro benzene)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (10e)**. LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 8.83 min; (0-80% MeCN, 35 min) R.T. = 7.43 min; HRMS Calcd m/z for C₄₂H₅₂FN₁₂O₆ [M+H]⁺ 839.4111, found 839.4105. **His-Aza(indoyl)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (10f)**. LCMS (20-80% MeOH, 35 min) R.T. = 12.96 min; (0-80% MeCN, 35 min) R.T. = 11.65 min; HRMS Calcd m/z for C₄₄H₅₃N₁₃O₆Na [M+Na]⁺ 882.4134, found 882.4121.

Benzylidene aza-glycinyl-phenylalaninyl *tert*-butyl ester

A solution of *p*-nitrophenylchloroformate (2.37 g, 10 mmol) in 100 mL of dry dichloromethane at 0 °C was treated dropwise with a solution of benzaldehyde hydrazone (1.2 g, 10 mmol) in 100 mL of dry dichloromethane. The ice bath was removed and the reactive mixture was allowed to warm to room temperature. After one hour, the solution was cooled back to 0 °C prior to addition of a premixed solution of phenylalanine *tert*-butyl ester hydrochloride (2.84 g, 10 mmol) and DIEA (1.9 mL, 20 mmol) in dry dichloromethane (30 mL). After stirring overnight, the crude reactive mixture was concentrated under vacuum and purified using a gradient of 10% to 50% Et₂O in petroleum ether to give a yellow oil (1.68 g, 46%): R_f 1.75 (1:1 Et₂O : petroleum ether); [α]_D²⁰ 61.25 (c 2.40, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.46 (9H, s), 3.14-3.19 (2H, m), 4.56-4.62 (1H, m), 5.68 (1H, d, *J* = 6.2 Hz), 7.21-7.37 (7H, m), 8.21-8.26 (2H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170.9, 156.6, 153.3, 136.5, 130.3, 129.4, 128.1, 125.9, 122.8, 83.8, 56.1, 39.1, 28.8. HRMS m/z 368.19762, (M+H)⁺ calcd for [C₂₁H₂₆N₃O₃]⁺ : 368.19687.

Benzylidene aza-glycinyl-phenylalanine

Benzylidene aza-glycinyl-phenylalaninyl *tert*-butyl ester (1.3 g, 3.54 mmol) was dissolved in 20 mL of a 1:1 mixture of dichloromethane and TFA and stirred at room temperature for 30 min, when complete disappearance of starting material was observed by TLC. Evaporation of the volatiles yielded a light brown solid that was used without further purification (935mg, 86%): R_f 0.11 (8 : 2 hexanes: EtOAc); [α]_D²⁰ 86.7 (c 0.83, CHCl₃); mp

133.0 – 135.3 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.22 (1H, q, $J = 6.4, 14.0$ Hz), 3.34 (1H, q, $J = 5.3, 14.1$ Hz), 4.79 (1H, q, $J = 6.4, 13.7$ Hz), 5.57 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 7.09-7.41 (8H, m), 8.22-8.27 (2H, m). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 175.4, 155.0, 152.3, 144.6, 134.5, 128.9, 128.6, 127.2, 124.8, 121.6, 54.3, 37.2.

Benzylidene aza-glycinyl-phenylalaninyl isopropylamide (11)

Benzylidene aza-glycinyl-phenylalanine (724 mg, 2.33 mmol) was dissolved in 30 mL of dry THF, cooled to -15 °C, and treated sequentially with isobutyl chloroformate (0.35 mL, 2.67 mmol) and *N*-methylmorpholine (0.26 mL, 2.33 mmol). The reaction was monitored by TLC. After 20 min, complete disappearance of the starting material and appearance of the activated intermediate was observed by TLC, R_f 0.97 (10% MeOH in DCM). Isopropyl amine was added in one portion to the reaction, which was stirred for an additional hour. The volatiles were removed under vacuum, and the residue was redissolved in EtOAc and extracted three times each with 5% NaHCO_3 and 5% citric acid. The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated to a residue that was purified on a column of silica gel using a gradient of 10 to 35% EtOAc in hexanes to give benzylidene aza-glycinyl-phenylalaninyl isopropylamide as a white solid (682 mg, 83%) : R_f 0.50 (1 : 1 hexanes: EtOAc); $[\alpha]_D^{20}$ 4.41 (c 0.77, MeOH); mp 150.2 – 153.6 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.94 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), 1.05 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), 3.04 (1H, q, $J = 8.8, 13.4$ Hz), 3.21 (1H, q, $J = 5.8, 13.4$ Hz), 3.95-3.97 (1H, m), 4.01-4.39 (1H, m), 5.36 (1H, d, $J = 7.6$), 6.26 (1H, d, $J = 8.0$), 7.22-7.37 (7H, m), 8.22-8.25 (2H, m). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 168.6, 155.3, 152.2, 144.5, 135.8, 129.0, 128.5, 126.9, 125.8, 124.7, 121.6, 115.2, 56.4, 41.4, 39.2, 22.1, 21.9. HRMS m/z 353.1977, $(\text{M}+\text{H})^+$ calcd for $[\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_2]^+$: 353.1972.

Aza-toluyglycine-phenylalaninyl isopropyl amide (12)

Benzylidene aza-glycinyl-phenylalaninyl isopropylamide **11** (200 mg, 0.57 mmol) was dissolved in 5 mL of freshly distilled dioxane in a flame-dried 10 mL round bottom flask. Potassium *tert*-butoxide (127 mg, 1.14 mmol), copper iodide (108 mg, 0.57 mmol),

ethylene diamine (76 μ L, 1.14 mmol), and 4-iodotoluene (149 mg, 0.68 mmol) were added to the flask in succession and the mixture was heated at reflux at 80 °C. After 12 h, the reactive mixture was cooled to room temperature and filtered through a pad of silica. The filtrate was evaporated under reduced pressure and the resulting oil was chromatographed on silica gel using 10% EtOAc in hexanes. Evaporation of the collected fractions gave azatolulylglycine-phenylalaninyl isopropyl amide as a white solid (40 mg, 20%): R_f 0.79 (1 : 1 hexanes: EtOAc); $[\alpha]_D^{20}$ 93.8 (c 0.58, CHCl_3); mp 109.2 – 112.9 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.13-1.17 (6H, m), 2.39 (3H, s), 3.13-3.27 (2H, m), 4.09-4.18 (1H, m), 4.77 (1H, t, J = 4.17 Hz), 6.91-6.96 (2H, m), 7.17-7.27 (5H, m), 7.35-7.38 (2H, m). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 171.8, 154.7, 135.4, 134.1, 130.8, 130.7, 129.0, 128.1, 121.9, 60.3, 44.5, 34.7, 21.7, 20.0, 19.9.

3. Chapitre 5 (Partie A, article 3, supporting information)

The following experimental procedures and characterization data of compounds was reproduced in part from J. Org. Chem. 2010, 75(15), 5385-5387. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jo100957z> (supporting information). Available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Charaterization of semicarbazones intermediates after the 1,3-dipolar cycloaddition

1-Phenyl-triazole 5a: LCMS (0-80% MeOH, 35 min) retention time (R.T.) = 19.89 min; LCMS (ESI) calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{N}_9\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 596.3 found m/z 596.2. **1-(*p*-methoxy)phenyl-triazole 5b:** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 19.20 min; LCMS (ESI) calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_9\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 626.3 found m/z 626.2. **1-(*m*-methoxy)phenyl-triazole 5c:** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 18.95 min; LCMS (ESI) calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_9\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 626.2 found m/z 626.2. **1-(*p*-methyl)phenyl-triazole 5d:** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 19.49 min; LCMS (ESI) calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_9\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 610.3 found m/z 610.2. **1-(*p*-fluoro)phenyl-triazole 5e:** LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 19.05 min; LCMS (ESI) calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{N}_9\text{O}_3\text{F}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 614.3 found m/z 614.2. **1-(*m*-trifluoromethyl)phenyl-**

triazole 5f: LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 20.27 min; LCMS (ESI) calcd for $C_{33}H_{37}N_9O_3F_3$ $[M+H]^+$, 664.3 found m/z 664.2. **1-Naphthalene-triazole**: LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 19.30 min; LCMS (ESI) calcd for $C_{36}H_{40}N_9O_3$ $[M+H]^+$, 646.3 found m/z 646.2.

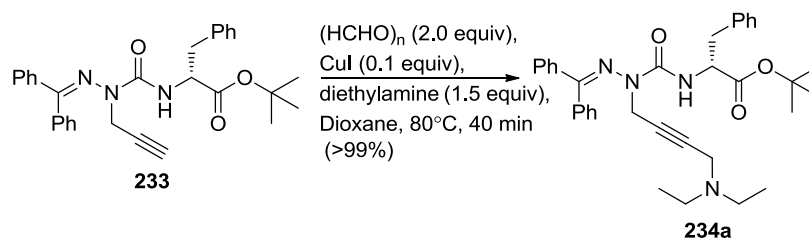
Characterization of [aza-1,2,3-triazole-3-alanine⁴]-GHRP-6 azapeptides 8a-g

[Aza-1-phenyl-1,2,3-triazole-3-alanine⁴]-GHRP-6 8a: LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 11.45 min; (0-40% MeCN, 35 min) R.T. = 15.39 min; HRMS Calcd m/z for $C_{45}H_{56}N_{15}O_6$ $[M+H]^+$ 902.4532, found 902.4516. **[Aza-1-(*p*-methoxy)phenyl-1,2,3-triazole-3-alanine⁴]-GHRP-6 8b**: LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 12.02 min; (0-80% MeCN, 35 min) R.T. = 9.18 min; HRMS Calcd m/z for $C_{46}H_{58}N_{15}O_7$ $[M+H]^+$ 932.4638, found 932.4617. **[Aza-1-(*m*-methoxy)phenyl-1,2,3-triazole-3-alanine⁴]-GHRP-6 8c**: LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 11.80 min; (0-80% MeCN, 35 min) R.T. = 9.20 min; HRMS Calcd m/z for $C_{46}H_{58}N_{15}O_7$ $[M+H]^+$ 932.4638, found 932.4617. **[Aza-1-(*p*-toluyl-1,2,3-triazole-3-alanine⁴)-GHRP-6 8d**: LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 12.27 min; (0-80% MeCN, 35 min) R.T. = 9.42 min; HRMS Calcd m/z for $C_{46}H_{58}N_{15}O_6$ $[M+H]^+$ 916.4689, found 916.4657. **[Aza-1-(*p*-fluoro)phenyl-1,2,3-triazole-3-alanine⁴]-GHRP-6 8e**: LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 11.63 min; (0-80% MeCN, 35 min) R.T. = 9.14 min; HRMS Calcd m/z for $C_{45}H_{55}FN_{15}O_6$ $[M+H]^+$ 920.4438, found 920.4423. **[Aza-1-(*m*-trifluoromethyl)phenyl-1,2,3-triazole-3-alanine⁴]-GHRP-6 8f**: LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 13.22 min; (0-80% MeCN, 35 min) R.T. = 9.88 min; HRMS Calcd m/z for $C_{46}H_{55}N_{15}O_6F_3$ $[M+H]^+$ 970.4406, found 970.4374. **[Aza-1-naphthyl-1,2,3-triazole-3-alanine⁴]-GHRP-6 8g**: LCMS (0-80% MeOH, 35 min) R.T. = 12.85 min; (0-80% MeCN, 35 min) R.T. = 11.11 min; HRMS Calcd m/z for $C_{49}H_{58}N_{15}O_6$ $[M+H]^+$ 952.4689, found 952.4660.

4. Chapitre 5 (Partie B)

Reagents. Propargyl bromide was purchased from Aldrich and filtered on a silica plug prior to use. Secondary amines (piperidine, diethylamine, dicyclohexylamine, diisopropylamine, morpholine, diallylamine, and *N*-benzylmethylamine) were freshly distilled over KOH using a kugelrohr short-path vacuum distillation apparatus. Copper iodide was purchased from Aldrich and purified by dissolving in a boiling saturated solution of aqueous NaI, followed by dilution with water, filtering and washing.³³ Benzophenone hydrazone, *p*-nitrophenylchloroformate, potassium *tert*-butoxide, collidine, bis(trichloromethyl) carbonate (BTC), hydroxylamine hydrochloride, pyridine, all were purchased from Aldrich, Alfa Aesar, or Strem Chemicals and used without further purification. The amino acids, Fmoc-His(Trt), Fmoc-D-Trp(Boc), Fmoc-Ala, Fmoc-D-Phe, Fmoc-Lys(Boc), and H-D-Phe-OtBu, and coupling reagents such as HBTU, all were purchased from GL Biochem™ and used as received.

Representative protocol for the A³ coupling of benzhydrylidene aza-propargylglycinyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (**233**)



Benzhydrylidene aza-(*N,N*-diethylaminomethyl)propargylglycinyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (**234a**)

To a solution of aza-dipeptide **233** (200mg, 0.416 mmol) dissolved in 3 mL of freshly distilled dioxane, in a 4 mL sealed vial, were added paraformaldehyde (25mg, 0.831 mmol), diethylamine (65 μ L, 0.624 mmol), and CuI (4mg, 0.021 mmol). The solution was heated to 80°C for 40 minutes, until complete disappearance of starting material by TLC.

Dioxane was evaporated under reduced pressure and the product was purified on silica gel using 100% ethyl acetate to afford **234a** as a yellow oil (240 mg, >99%) : R_f 0.11 (1 : 1 ethyl acetate : hexanes); $[\alpha]_D^{20}$ 0 (c 0.88, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.49-7.22 (15H, m), 7.11 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 4.83-4.73 (1H, m), 4.26 (1H, d, $J = 18$ Hz), 3.88 (1H, d, $J = 18$ Hz), 3.34 (2H, s), 3.18 (2H, d, $J = 5.7$ Hz), 2.48-2.38 (4H, m), 1.42 (9H, s), 0.97 (6H, t, $J = 7.1$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 170.4, 157.4, 157.1, 138.1, 136.2, 135.2, 129.6, 129.3, 128.7, 128.2, 128.0, 127.7, 126.4, 81.4, 79.1, 77.6, 54.6, 46.7, 40.2, 38.2, 34.9, 27.6, 12.2. IR (neat) 1680, 1489, 1366, 1150, 754, 694. HRMS m/z 567.3310, $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $[\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_3]^+$: 567.3330.

Benzhydrylidene aza-(*N,N*-dicyclohexylaminomethyl)propargylglyciny-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (234b)

Using the representative procedure for the synthesis of **234a**, aza-dipeptide **233** (200mg, 0.416 mmol) was dissolved in 3 mL of freshly distilled dioxane, in a 4 mL sealed tube, to which was added paraformaldehyde (25mg, 0.831 mmol), dicyclohexylamine (124 μL , 0.624 mmol), and CuI (4mg, 0.021 mmol). The product was purified on silica gel using 30% ethyl acetate in hexanes to afford **234b** as an orange oil (267 mg, 95%) : R_f 0.40 (1 : 1 ethyl acetate: hexanes); $[\alpha]_D^{20}$ -5.06 (c 0.80, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.49-7.23 (15H, m), 7.12 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 4.82-4.74 (1H, m), 4.18 (1H, d, $J = 18$ Hz), 3.89 (1H, d, $J = 18$ Hz), 3.40 (2H, s), 3.25-3.14 (2H, m), 2.71-2.62 (2H, m), 1.81-1.63 (8H, m), 1.60-1.50 (2H, m), 1.42 (9H, s), 1.31-0.98 (10H, m). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 170.4, 157.4, 156.8, 138.2, 136.2, 135.3, 129.5, 129.3, 129.2, 128.7, 128.2, 128.1, 128.0, 127.7, 126.4, 82.8, 81.3, 76.9, 56.7, 54.6, 38.3, 35.0, 34.5, 30.8, 27.6, 25.9, 25.7. IR (neat) 2923, 1680, 1487, 1366, 1152, 753, 699. HRMS m/z 675.4247, $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $[\text{C}_{43}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{O}_3]^+$: 675.4269.

Benzhydrylidene aza-(*N*-benzylmethylaminomethyl)propargylglycinyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (234c)

Using the representative procedure for the synthesis of **234a**, aza-dipeptide **233** (200mg, 0.416 mmol) was dissolved in 3 mL of freshly distilled dioxane, in a 4 mL sealed tube, in which was added paraformaldehyde (25mg, 0.831 mmol), *N*-methylbenzylamine (60 μ L, 0.624 mmol), and CuI (4mg, 0.021 mmol). The product was purified on silica gel using 30% ethyl acetate in hexanes to afford **234c** as a yellow oil (209 mg, >99%) : R_f 0.39 (1 : 1 ethyl acetate : hexanes); $[\alpha]_D^{20}$ -4.48 (c 0.89, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.53-7.22 (20H, m), 7.18 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 4.87-4.80 (1H, m), 4.34 (1H, d, $J = 18$ Hz), 3.99 (1H, d, $J = 18$ Hz), 3.49(2H, s), 3.26-3.21 (4H, m), 2.26 (3H, s), 1.45 (9H, s). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 170.5, 157.5, 157.0, 138.2, 138.1, 136.2, 135.2, 129.6, 129.3, 128.8, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 126.8, 126.5, 81.4, 79.9, 77.9, 59.6, 54.7, 44.8, 41.4, 38.2, 35.0, 27.7. IR (neat) 1733, 1682, 1492, 1367, 1152, 1055, 1033, 754, 700. HRMS m/z 615.3308, $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $[\text{C}_{39}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_3]^+$: 615.3330.

Benzhydrylidene aza-(*N*-morpholinomethyl)propargylglycinyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (234d)

Using the representative procedure for the synthesis of **234a**, aza-dipeptide **233** (150mg, 0.312 mmol) was dissolved in 2.5 mL of freshly distilled dioxane, in a 4 mL sealed tube, to which was added paraformaldehyde (19mg, 0.623 mmol), morpholine (40 μ L, 0.468 mmol), and CuI (3 mg, 0.016 mmol). The product was purified on silica gel using 100% ethyl acetate to afford **234d** as a yellow oil (196 mg, >99%) : R_f 0.12 (1 : 1 ethyl acetate : hexanes); $[\alpha]_D^{20}$ -7.56 (c 0.87, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.48-7.23 (15H, m), 7.09 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 4.81-4.74 (1H, m), 4.25 (1H, d, $J = 18$ Hz), 3.94 (1H, d, $J = 18$ Hz), 3.60 (4H, t, $J = 5.6$ Hz), 3.21-3.16 (4H, m), 2.44 (4H, t, $J = 4.5$ Hz), 1.42 (9H, s). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 170.4, 157.3, 157.2, 138.1, 136.2, 135.1, 129.7, 129.3, 128.8, 128.2, 128.1, 127.9, 127.8, 126.4, 81.4, 79.8, 78.0, 66.3, 54.6, 51.8, 47.1, 38.1, 34.9,

27.6. IR (neat) 1679, 1486, 1366, 1149, 1114, 1004, 753, 698. HRMS m/z 581.3102, $[M+H]^+$ calculated for $[C_{35}H_{41}N_4O_4]^+$: 581.3122.

Benzhydrylidene aza-(*N,N*-diisopropylaminomethyl)propargylglycinyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (234e)

Using the representative procedure for the synthesis of **234a**, aza-dipeptide **233** (150mg, 0.312 mmol) was dissolved in 2.5 mL of freshly distilled dioxane, in a 4 mL sealed tube, to which was added paraformaldehyde (19mg, 0.623 mmol), diisopropylamine (66 μ L, 0.468 mmol), and CuI (3mg, 0.016 mmol). The product was purified on silica gel using 50% ethyl acetate in hexanes to afford **234e** as a yellow oil (185 mg, >99%) : R_f 0.22 (1 : 1 ethyl acetate : hexanes); $[\alpha]_D^{20}$ 0 (c 0.82, $CHCl_3$); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.50-7.24 (15H, m), 7.12 (1H, d, J = 8.0 Hz), 4.82-4.73 (1H, m), 4.24 (1H, d, J = 18 Hz), 3.84 (1H, d, J = 18 Hz), 3.34 (2H, s), 3.18 (2H, d, J = 6.0 Hz), 3.14-3.08 (2H, m), 1.43 (9H, s), 1.00 (12H, d, J = 6.0 Hz). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 170.8, 157.8, 157.2, 138.5, 136.6, 135.6, 129.9, 129.7, 129.6, 129.1, 128.6, 128.5, 128.4, 128.1, 126.8, 82.5, 81.7, 77.9, 55.0, 48.1, 38.7, 35.5, 34.1, 28.0, 20.5. IR (neat) 1733, 1682, 1489, 1367, 1055, 1033, 1017, 753, 631. HRMS m/z 595.3621, $[M+H]^+$ calculated for $[C_{37}H_{47}N_4O_3]^+$: 595.3643.

Benzhydrylidene aza-(*N,N*-diallylaminomethyl)propargylglycinyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (234f)

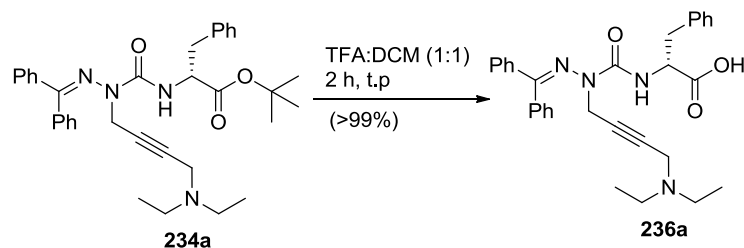
Using the representative procedure for the synthesis of **234a**, aza-dipeptide **233** (150mg, 0.312 mmol) was dissolved in 2.5 mL of freshly distilled dioxane, in a 4 mL sealed tube, to which was added paraformaldehyde (19mg, 0.623 mmol), diallylamine (58 μ L, 0.468 mmol), and CuI (3mg, 0.016 mmol). The product was purified on silica gel using 30% ethyl acetate in hexanes to afford **234f** as a yellow oil (182 mg, >99%) : R_f 0.62 (1 : 1 ethyl acetate : hexanes); $[\alpha]_D^{20}$ 0 (c 0.83, $CHCl_3$); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.50-7.24 (15H, m), 7.14 (1H, d, J = 8.0 Hz), 5.82-5.70 (2H, m), 5.15-5.06 (4H, m), 4.83-4.76 (1H, m), 4.28 (1H, d, J = 18 Hz), 3.93 (1H, d, J = 18 Hz), 3.31 (2H, s), 3.20 (2H, d, J = 5.9 Hz),

3.03 (4H, d, $J = 6.4$ Hz), 1.44 (9H, s). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 170.8, 157.8, 157.4, 138.5, 136.6, 135.6, 135.3, 130.0, 129.7, 129.1, 128.6, 128.4, 128.1, 126.8, 118.0, 81.8, 79.9, 78.1, 56.3, 55.0, 41.7, 38.6, 35.2, 28.0. IR (neat) 1683, 1490, 1368, 1055, 1033, 1016, 754, 631. HRMS m/z 591.3302, $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $[\text{C}_{37}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_3]^+$: 591.3330.

Benzhydrylidene aza-(*N*-piperidinomethyl)propargylglycinyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (234g)

Using the representative procedure for the synthesis of **234a**, aza-dipeptide **233** (200mg, 0.416 mmol) was dissolved in 3 mL of freshly distilled dioxane, in a 4 mL sealed tube, to which was added paraformaldehyde (25mg, 0.831 mmol), piperidine (62 μL , 0.624 mmol), and CuI (4mg, 0.021 mmol). The product was purified on silica gel using 100% ethyl acetate to afford **234g** as a yellow oil (240 mg, 99.7%) : R_f 0.24 (100% ethyl acetate); $[\alpha]_D^{20}$ -6.59 (c 1.0, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.51-7.23 (15H, m), 7.08 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 4.81-4.74 (1H, m), 4.25 (1H, d, $J = 18$ Hz), 3.92 (1H, d, $J = 18$ Hz), 3.21-3.17 (4H, m), 2.45-2.35 (4H, m), 1.56-1.48 (4H, m), 1.43 (9H, s), 1.38-1.30 (2H, m). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 170.4, 157.4, 157.1, 138.2, 136.2, 135.2, 129.5, 129.3, 129.2, 128.8, 128.2, 128.0, 127.7, 126.4, 81.4, 54.6, 52.7, 47.4, 38.2, 34.9, 27.6, 25.4, 23.4. IR (neat) 1680, 1488, 1366, 1151, 1106, 766, 695. HRMS m/z 579.3331, $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $[\text{C}_{36}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_3]^+$: 579.3330.

Representative procedure for the *tert*-butyl ester deprotection:



Benzhydrylidene aza-(*N,N*-diethylaminomethyl)propargylglycinyl-D-phenylalanine (236a)

tert-Butyl ester **234a** (240mg, 0.42 mmol) was dissolved in 6 ml of a 1:1 DCM:TFA and stirred for 2 h. The volatiles were removed by evaporation under reduced pressure and the residue was dissolved in DCM and concentrated to remove residual TFA to give **236a** as an orange oil (252 mg, >99%), which was used without further purification: R_f 0.11 (1:9 MeOH: DCM); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.97 (1H, brs), 7.86-7.14 (15H, m), 7.00 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 4.84-4.75 (1H, m), 4.13 (1H, d, $J = 18$ Hz), 3.97-3.85 (3H, m), 3.34-2.99 (6H, m), 1.34-1.18 (6H, m). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 174.9, 162.2, 158.4, 136.7, 135.3, 134.0, 132.3, 130.8, 130.1, 129.8, 128.9, 128.7, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.0, 113.6, 85.5, 69.7, 54.2, 48.1, 39.7, 37.0, 36.0, 9.0. HRMS m/z 511.2691, $(\text{M}+\text{H})^+$ calcd for $[\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_3]^+$: 511.2704. IR (neat) 2992, 1650, 1507, 1445, 1154, 701.

Benzhydrylidene aza-(*N,N*-dicyclohexylaminomethyl)propargylglycinyl-D-phenylalanine (236b)

tert-Butyl ester **234b** (267mg, 0.40 mmol) was treated under the same conditions to prepare acid **236a** to provide acid **236b** as an orange oil (267 mg, >99%), which was used without further purification: R_f 0.18 (1:9 MeOH : DCM); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.94 (1H, brs), 7.87-7.14 (15H, m), 7.01 (1H, d, $J = 7.4$ Hz), 4.90-4.77 (1H, m), 4.12 (1H, d, $J = 18$ Hz), 3.97-3.85 (3H, m), 3.56-3.38 (2H, m), 3.32-3.18 (2H, m), 2.13-1.02 (20H, m). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 175.4, 162.5, 158.5, 136.9, 136.7, 135.1, 134.0, 132.5, 130.9, 130.2, 129.9, 128.9, 128.8, 128.5, 128.3, 128.1, 128.0, 127.0, 84.9, 72.4, 60.8, 54.1, 37.1, 36.2, 35.7, 28.2, 26.8, 24.6. HRMS m/z 619.3627, $(\text{M}+\text{H})^+$ calcd for $[\text{C}_{39}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_3]^+$: 619.3643. IR (neat) 2939, 1738, 1657, 1496, 1445, 1144, 696.

Benzhydrylidene aza-(*N*-benzylmethylaminomethyl)propargylglycinyl-D-phenylalanine (236c)

tert-Butyl ester **234c** (209mg, 0.34 mmol) was treated under the same conditions to prepare acid **236a** to provide acid **236c** as an orange oil (202 mg, >99%), which was used without further purification: R_f 0.18 (1:9 MeOH : DCM); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.65

(1H, brs), 7.86-7.00 (21H, m), 4.86-4.76 (1H, m), 4.33-4.12 (3H, m), 3.99-3.62 (3H, m), 3.32-3.14 (2H, m), 2.80-2.73 (3H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 175.2, 162.7, 159.0, 137.4, 137.2, 135.7, 134.4, 132.7, 131.2, 130.8, 130.6, 130.5, 130.4, 130.2, 129.5, 129.2, 129.1, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 127.3, 116.9, 114.0, 87.1, 70.5, 58.1, 54.6, 43.7, 39.8, 37.3, 36.7. HRMS *m/z* 559.2687, (M+H)⁺ calcd for [C₃₅H₃₅N₄O₃]⁺ : 559.2704. IR (neat) 3010, 1737, 1654, 1497, 1144, 755, 698.

Benzhydrylidene aza-(*N*-morpholinomethyl)propargylglyciny-D-phenylalanine (236d)

tert-Butyl ester **234d** (196mg, 0.34 mmol) was treated under the same conditions to prepare acid **236a** to provide acid **236d** as an off white foam (162 mg, 91%), which was used without further purification: *R_f* 0.18 (1:9 MeOH : DCM); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.84-7.20 (15H, m), 7.00 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 4.84-4.75 (1H, m), 4.17 (1H, d, *J* = 18 Hz), 3.98-3.73 (7H, m), 3.40-3.08 (6H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.7, 162.7, 158.6, 136.7, 135.3, 133.9, 132.4, 130.9, 130.1, 129.8, 128.9, 128.8, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 127.0, 86.6, 69.8, 63.3, 54.2, 50.1, 46.0, 36.9, 36.2. HRMS *m/z* 525.2479, (M+H)⁺ calcd for [C₃₁H₃₃N₄O₄]⁺ : 525.2496. IR (neat) 2326, 1735, 1660, 1495, 1444, 1169, 1126, 766, 695.

Benzhydrylidene aza-(*N,N*-diisopropylaminomethyl)propargylglyciny-D-phenylalanine (236e)

tert-Butyl ester **234e** (185mg, 0.31 mmol) was treated under the same conditions to prepare acid **236a** to provide acid **236e** as an off white foam (172 mg, >99%), which was used without further purification: *R_f* 0.11 (1:9 MeOH : DCM); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.40 (1H, brs), 7.85-7.15 (15H, m), 6.99 (1H, d, *J* = 7.7 Hz), 4.82-4.73 (1H, m), 4.09 (1H, d, *J* = 18 Hz), 3.98-3.69 (5H, m), 3.31-3.15 (2H, m), 1.45-1.22 (12H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.7, 161.7, 158.5, 137.1, 136.8, 135.4, 134.0, 132.3, 130.8, 130.1, 129.8, 128.9, 128.8, 128.5, 128.2, 128.1, 128.0, 126.9, 85.1, 72.2, 54.2, 53.8, 37.0, 36.0, 35.0,

18.2, 16.6. HRMS m/z 539.3001, (M+H)⁺ calcd for [C₃₃H₃₉N₄O₃]⁺ : 539.3017. IR (neat) 2992, 1737, 1659, 1509, 1445, 1166, 703.

Benzhydrylidene aza-(*N,N*-diallylaminomethyl)propargylglycinyl-D-phenylalanine (236f)

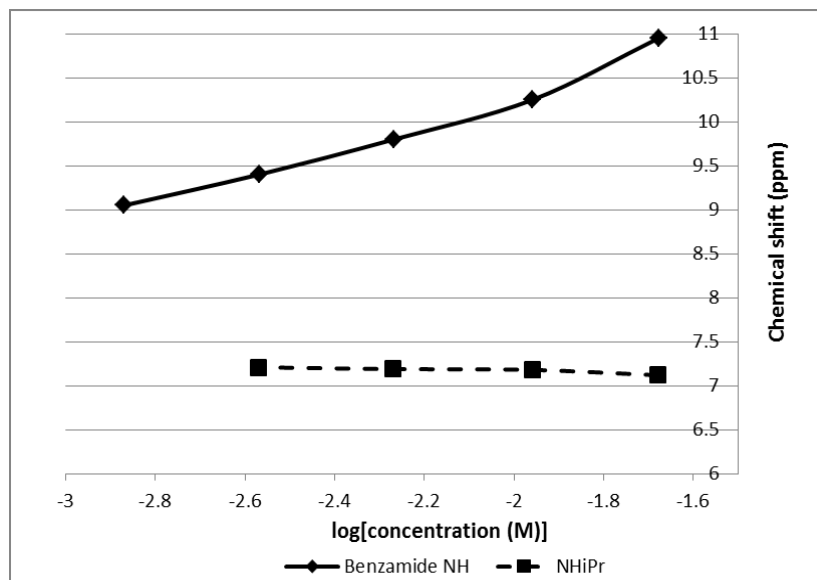
tert-Butyl ester **234f** (182mg, 0.31 mmol) was treated under the same conditions to prepare acid **236a** to provide acid **236f** as an orange oil (171 mg, >99%), which was used without further purification: R_f0.25 (1:9 MeOH : DCM); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 11.07 (1H, brs), 7.89-6.92 (16H, m), 5.94-5.81 (2H, m), 5.63-5.29 (4H, m), 4.88-4.72 (1H, m), 4.17-4.12 (1H, d, *J* = 18 Hz), 4.01-3.09 (9H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.8, 161.7, 158.3, 136.8, 135.4, 134.1, 132.3, 130.7, 130.1, 129.8, 128.9, 128.8, 128.5, 128.2, 128.1, 128.0, 127.0, 126.3, 125.5, 86.2, 69.8, 54.9, 54.2, 40.0, 37.0, 36.0. HRMS m/z 535.2686, (M+H)⁺ calcd for [C₃₃H₃₅N₄O₃]⁺ : 535.2704. IR (neat) 3008, 1737, 1659, 1498, 1445, 1169, 702.

Benzhydrylidene aza-(*N*-piperidinomethyl)propargylglycinyl-D-phenylalanine (234g)

tert-Butyl ester **234g** (240mg, 0.41 mmol) was treated under the same conditions to prepare acid **236a** to provide acid **236g** as an orange oil (296 mg, >99%), which was used without further purification: R_f0.07 (1:9 MeOH : DCM); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.44 (1H, brs), 7.64-6.93 (16H, m), 4.83-4.71 (1H, m), 4.19 (1H, d, *J* = 18Hz), 3.90-3.72 (3H, m), 3.63-3.04 (4H, m), 2.93-2.76 (2H, m), 1.93-1.69 (6H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.2, 161.3, 158.5, 137.1, 136.9, 135.5, 134.1, 132.2, 130.6, 130.0, 129.7, 129.0, 128.9, 128.7, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 126.8, 86.0, 70.5, 54.2, 51.8, 46.0, 36.9, 36.0, 22.4, 20.8. HRMS m/z 523.2683, (M+H)⁺ calcd for [C₃₂H₃₅N₄O₃]⁺ : 523.2704. IR (neat) 2964, 1674, 1647, 1175, 1131, 1055, 1033, 699.

Characterization of [azaLys⁴]-GHRP-6 azapeptides (240a-g)**His-D-Trp-Ala-aza(*N,N*-(diethylaminomethyl)propargylglycinyI)-D-Phe-Lys-NH₂****(240a).** LCMS (5-40% MeOH, 20 min) R.T. = 9.90 min; (5-40% MeCN, 20 min) R.T. = 9.56 min; HRMS Calcd m/z for C₄₄H₆₁N₁₃NaO₆ [M+23]⁺ 890.4760, found 890.4766.**His-D-Trp-Ala-aza(*N,N*-(dicyclohexylaminomethyl)propargylglycinyI)-D-Phe-Lys-NH₂****(240b).** LCMS (5-80% MeOH, 20 min) R.T. = 9.43 min; (5-80% MeCN, 20 min) R.T. = 8.39 min; HRMS Calculated m/z for C₅₂H₇₃N₁₃NaO₆ [M+23]⁺ 998.5699, found 998.5701.**His-D-Trp-Ala-aza(*N*-benzylmethylaminomethyl)propargylglycinyI)-D-Phe-Lys-NH₂****(240c).** LCMS (5-80% MeOH, 20 min) R.T = 8.19 min; (5-80% MeCN, 20 min) R.T. = 7.79 min; HRMS Calculated m/z for C₄₈H₆₁N₁₃NaO₆ [M+23]⁺ 938.4760, found 938.4768.**His-D-Trp-Ala-aza(*N*-morpholinomethyl)propargylglycinyI)-D-Phe-Lys-NH₂ (240d).**LCMS (5-40% MeOH, 20 min) R.T = 7.99 min; (5-40% MeCN, 20 min) R.T. = 7.63 min; HRMS Calculated m/z for C₄₄H₅₉N₁₃NaO₇ [M+23]⁺ 904.4553, found 904.4555.**His-D-Trp-Ala-aza(*N,N*-(diisopropylaminomethyl)propargylglycinyI)-D-Phe-Lys-NH₂ (240e).**LCMS (5-40% MeOH, 20 min) R.T = 8.87 min; (5-40% MeCN, 20 min) R.T. = 8.13 min; HRMS Calculated m/z for C₄₆H₆₅N₁₃NaO₆ [M+23]⁺ 918.5073, found 918.5079.**His-D-Trp-Ala-aza(*N,N*-(diallylaminomethyl)propargylglycinyI)-D-Phe-Lys-NH₂ (240f).**LCMS (5-40% MeOH, 20 min) R.T = 9.41 min; (5-40% MeCN, 20 min) R.T. = 8.32 min; HRMS Calculated m/z for C₄₆H₆₁N₁₃NaO₆ [M+23]⁺ 914.476, found 914.4770.

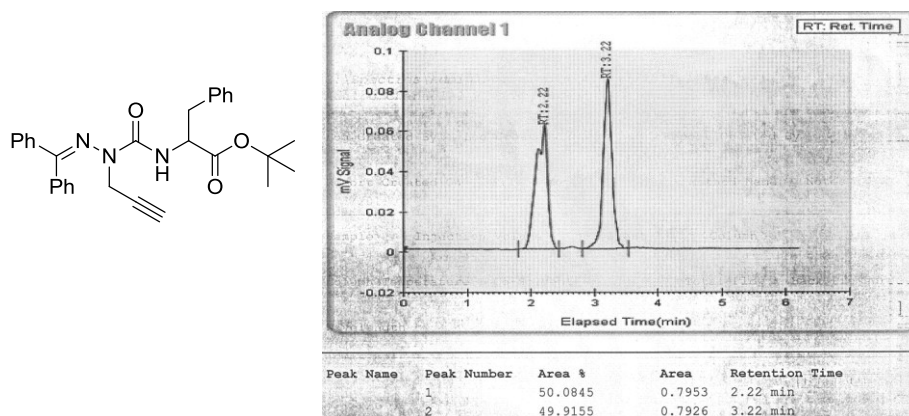
5. Chapitre 6

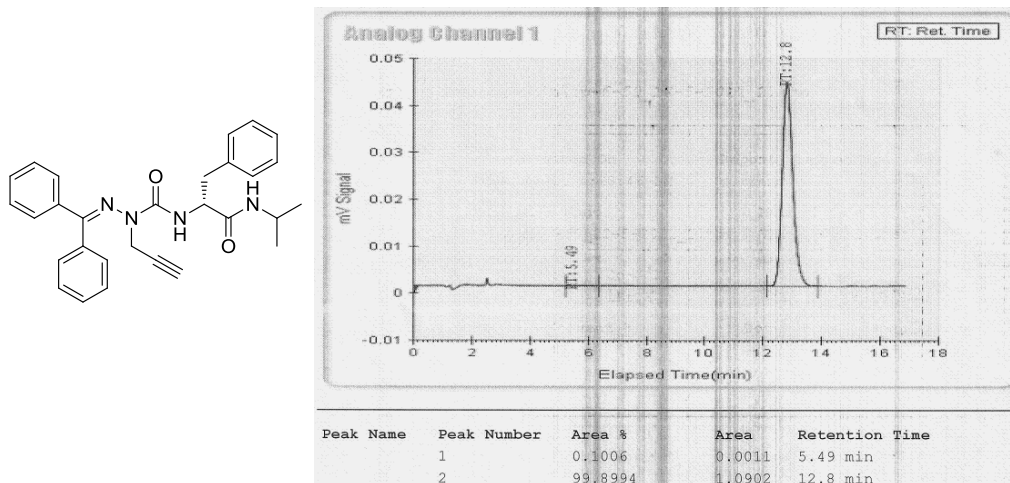


Supplementary Figure 1. NMR chemical shift of the amide and semicarbazide protons of **14** in CDCl₃ at room temperature, as a function of the logarithm of concentration.

Benzhydrylidene Aza-propargylglyciny-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (**1**)

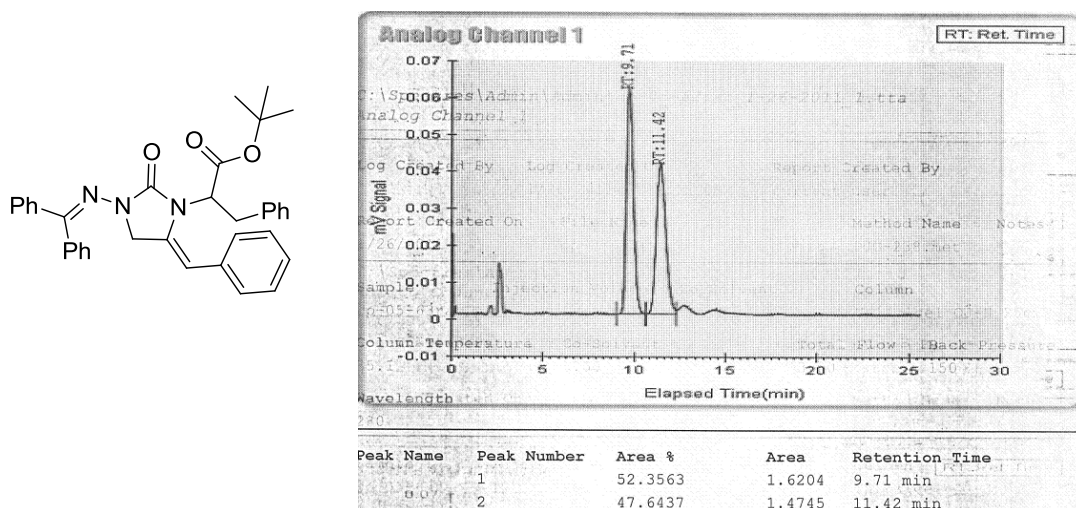
The degree of racemization (e. r 84 : 16) was determined by SFC analysis on a chiral stationary phase [Chiralcel AD-H 25 cm, 15% *i*-PrOH, 3mL/min, 35°C, 150 bar, t_r (minor) 3.27 min, t_r (major) 5.12 min]:

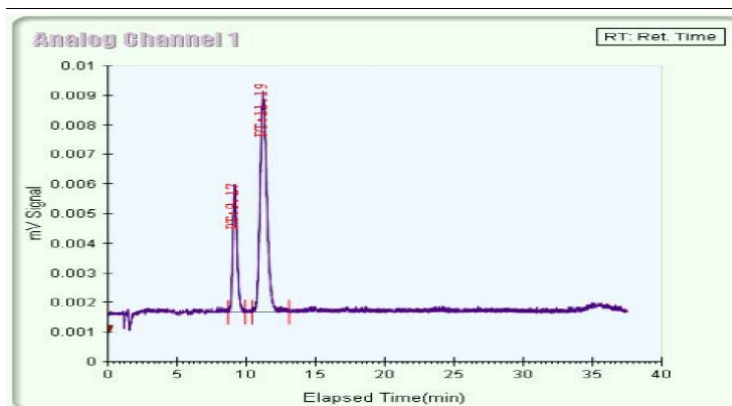
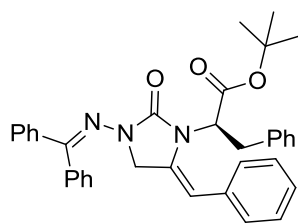




(2'R, 4Z)-1-((Diphenylmethylene)amino)-3-(tert-butyl-3'-phenyl-2'-propanoate)-4-benzylidene-imidazolidin-2-one (24a)

The enantiomeric ratio (73:27) was determined by SFC analysis on chiral stationary phase (Chiralcel OJ-H 25 cm, 5% *i*-PrOH, 3mL/min, 35°C, 150bar, t_r (minor) 9.2 min, t_r (major) 11.2 min.





Peak Name	Peak Number	Peak Concentration	Area %	Area
	1		26.5151	0.0916
	2		73.4849	0.2538

Bibliographie

- 1 Verlander, M. Industrial Applications of Solid-Phase Peptide Synthesis – A Status Report. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2007**, *13*, 75-82.
- 2 Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- 3 Rizo, J.; Gierach, L. M. Constrained Peptides: Models of Bioactive Peptides and Protein Substructures. *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 387-418.
- 4 Voet D, Voet JG. Biochemistry. New York: J Wiley; 1990. 1223 p
- 5 Venkatachalam, C. M. Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425-1436.
- 6 Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M. A revised set of potentials for β -turn formation in proteins. *Protein Science* **1994**, *3*, 2207-2216.
- 7 Marcelino, A. M. C.; Gierasch, L. M. Roles of β -Turns in Protein Folding: From Peptide Models to Protein Engineering. *Biopolymers* **2008**, *89* (5), 380-391.
- 8 Rose, G. D, Gierasch, L. M., Smith, J. A. Turns in peptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 1-109.
- 9 (a) Stanfield, R. L.; Fieser, T. M.; Lerner, R. A.; Wilson, I. A. Crystal structures of an antibody to a peptide and its complex with peptide antigen at 2.8 Å. *Science* **1990**, *248*(4956), 712–719. (b) Rini, J. M.; Schulze-Gahmen, U.; Wilson, I. A. Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition *Science* **1992**, *255*(5047), 959–965. (c) Garcia, K. C.; Ronco, P. M.; Verroust, P. J.; Brünger, A. T.; Amzel, L. M. Three-dimensional structure of an angiotensin II-Fab complex at 3 Å: hormone recognition by an anti-idiotypic antibody. *Science* **1992**, *257*(5069), 502–507.

-
- 10 Williams, D. H.; Cox, J. P. L.; Doig, A. J.; Gardner, M.; Gerhard, U.; Kaye, P. T.; Lal, A. R.; Nicholls, I. A.; Salter, C. J.; Mitchell, R. C. Toward the Semiquantitative Estimation of Binding Constants. Guides for Peptide-Peptide Binding in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7020-7030.
- 11 Marshall, G. R. A Hierarchical Approach to Peptidomimetic Design. *Tetrahedron* **1993**, 3547-3558.
- 12 (a) Halab, L.; Lubell, W. D. Use of Steric Interactions to Control Peptide Turn Geometry. Synthesis of Type VI β -Turn Mimics with 5-*tert*-Butylproline. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3312-3321. (b) Halab, L.; Lubell, W. D. Influence of N-terminal residue stereochemistry on the prolyl amide geometry and the conformation of 5-*tert*-butylproline type VI beta-turn mimics. *J. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 92-104.
- 13 (a) Freidinger, R. M., Veber, D. F.; Perlow, D. S.; Brooks, J. R.; Saperstein, R. *Science*. **1980**, *210*, 656. (b) Freidinger, R. M.; Perlow, D. S.; Veber, D. F. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 104. (c) Freidinger, R. M. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3631. (d) Jamieson, A. G.; Boutard, N.; Beauregard, K.; Bodas, M. S.; Ong, H.; Quiniou, C.; Chemtob, S.; Lubell, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7917-7927. (e) Boutard, N.; Jamieson, A. G.; Ong, H.; Lubell, W. D. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2010**, *75*, 40-50.
- 14 (a) Hinds, M. G.; Richards, N. G. J.; Robinson, J. A. Design and Synthesis of a Novel Peptide β -Turn Mimetic. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 1447-1449. (b) Hinds, M. G.; Welsh, J. H.; Brennan, D. M.; Fisher, J.; Glennie, M. J.; Richards, N. G. J.; Turner, D. L.; Robinson, J. A. Synthesis, Conformational Properties, and Antibody Recognition of Peptides Containing β -Turn Mimetics Based on α -Alkylproline Derivatives. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1777-1789. (c) Genin, M. J.; Gleason, W. B.; Johnson, R. L. Design, Synthesis, and X-ray Crystallographic Analysis of Two Novel Spirolactam Systems as β -Turn Mimics. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 860-866.

-
- 15 (a) Nagai, U.; Sato, K.; Nakamura, R.; Kato, R. Biyclic turned dipeptide (BTD) as a β -turn mimetic; its design, synthesis and incorporation into bioactive peptides. *Tetrahedron* **1993**, *49* (17), 3577-3592. (b) Hata, M.; Marshall, G. R. Do benzodiazepines mimic reverse-turn structures? *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2006**, *20*, 321–331.
- 16 (a) Pour une revue de la littérature, voir: Cluzeau, J.; Lubell, W. D. Design, Synthesis, and Application of Azabicyclo[X.Y.0]alkanone Amino Acids as Constrained Dipeptide Surrogates and Peptide Mimics. *Biopolymers (Peptide Science)* **2005**, *80*, 98–150.
- 17 Boeglin, D.; Hamdan, F. F.; Melendez, R. E.; Cluzeau, J.; Laperriere, A.; Héroux, M.; Bouvier, M.; Lubell, W. D. Calcitonin Gene-Related Peptide Analogues with Aza and Indolizidinone Amino Acid Residues Reveal Conformational Requirements for Antagonist Activity at the Human Calcitonin Gene-Related Peptide 1 Receptor. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1401-1408.
- 18 Pour des articles de revues sur les azapeptides, voir : (a) Proulx, C.; Sabatino, D.; Hopewell, R.; Spiegel, J.; García Ramos, Y.; Lubell, W. D. Azapeptides and their therapeutic potential. *Future Med.Chem.* **2011**, *3(9)*, 1139–1164. (b) Zega A. Azapeptides as Pharmacological Agents. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 589–597. (c) Gante J. Azapeptides. *Synthesis* **1989**, *6*, 405-413.
- 19 Reynolds, C. H.; Hormann, R. E. Theoretical Study of the Structure and Rotational Flexibility of Diacylhydrazines: Implications for the Structure of Nonsteroidal Ecdysone Agonists and Azapeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9395-9401.
- 20 Thormann, M.; Hofmann, H.-J. Conformational properties of azapeptides. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **1999**, *469*, 63–76.

-
- 21 Lee, H.-J.; Ahn, I.-A.; Ro, S.; Choi, K.-H., Choi, Y.-S.; Lee, K.-B. Role of azaamino acid residue in β -turn formation and stability in designed peptide. *J. Pept. Res.* **2000**, *56*(1), 35–46.
- 22 Lee, H.-J.; Choi, K.-H.; Ahn, I.-A.; Ro, S.; Jang, H. G.; Choi, Y.-S.; Lee, K.-B. The β -turn preferential solution conformation of a tetrapeptide containing an azaamino acid residue. *J. Mol. Struct.* **2001**, *569*(1–3), 43–54.
- 23 Lee, H. J.; Park, H. M.; Lee, K. B. The β -turn scaffold of tripeptide containing an azaphenylalanine residue. *Biophys. Chem.* **2007**, *125*(1), 117–126.
- 24 Benatalah, Z.; Aubry, A.; Boussard, G.; Marraud, M. Evidence for a β -turn in an azadipeptide sequence. Synthesis and crystal structure of $\text{Bu}^t\text{CO-Pro-AzaAla-NHPri}$. *Int. J. Pept. Protein. Res.* **1991**, *38*(6), 603–605.
- 25 André, F.; Boussard, G.; Bayeul, D.; Didierjean, C.; Aubry, A.; Marraud, M. Azapeptides II. X-Ray Structures of Aza-alanine and Aza-asparagine-containing Peptides. *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 556–562.
- 26 Marraud, M.; Aubry, A. Crystal structures of peptides and modified peptides. *Pept. Sci.* **1996**, *40*(1), 45–83.
- 27 Lecoq, A.; Boussard, G.; Marraud, M.; Aubry, A. Crystal state conformation of three azapeptides containing the azaproline residue, a β -turn regulator. *Biopolymers* **1993**, *33*(7), 1051–1059.
- 28 Didierjean, C.; Aubry, A.; Wyckaert, F.; Boussard, G. Structural features of the Pip/AzPip couple in the crystalline state: influence of the relative AzPip location in an azadipeptide sequence upon the induced chirality and conformational characteristics. *J. Pept. Res.* **2000**, *55*, 308–317.
- 29 Hemmerlin, C.; Cung, M. T.; Boussard, G. Synthesis and conformational preferences in solution and crystalline states of an azatripeptide. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*(30), 5009–5012.

-
- 30 MacArthur, M. W.; Thornton, J. Influence of proline residues on protein conformation. *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 397-412.
- 31 (a) Venkatachalapathi, Y. V.; Venkataram Prasad, B. V.; Balaram, P. Conformational Analysis of Small Disulfide Loops. Spectroscopic and Theoretical Studies on a Synthetic Cyclic Tetrapeptide Containing Cystine. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *21*, 5502-5509.
- (b) Boussard, G.; Marraud, M. β Turns in Model Dipeptides. An Infrared Quantitative Analysis with NMR Correlation. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1825-1828.
- 32 Andersen, N. H.; Neidigh, J. W.; Harris, S. M.; Lee, G. M.; Liu, Z.; Tong, H. Extracting Information from the Temperature Gradients of Polypeptide NH Chemical Shifts. 1. The Importance of Conformational Averaging. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8547-8561.
- 33 Nowick, J. S.; Abdi, M.; Bellamo, K. A.; Love, J. A.; Martinez, E. J.; Noronha, G.; Smith, E. M.; Ziller, J. W. Molecular Scaffolds. 2. Intramolecular Hydrogen Bonding in 1,2-Diaminoethane Diureas. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 89-99.
- 34 André, F.; Vicherat, A.; Boussard, G.; Aubry, A.; Marraud, M.; Aza-peptides. III. Experimental structural analysis of aza-alanine and aza-asparagine-containing peptides. *J. Pept. Res.* **1997**, *50*, 372-381.
- 35 Zouikri, M.; Vicherat, A.; Aubry, A.; Marraud, M.; Boussard, G. Azaproline as a β -turn inducer residue opposed to proline. *J. Pept. Res.* **1998**, *52*(1), 19-26.
- 36 Dutta, A.S.; Giles, M. Polypeptides. Part XIV. A Comparative Study of the Stability towards Enzymes of Model Tripeptides Containing α -Aza-amino acids, L.-Amino acids, and D-Amino acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I.* **1976**, 244-248.
- 37 Fairlie, D. P.; Tyndall, J. D. A.; Reid, R. C.; Wong, A. K.; Abbenante, G.; Scanlon, M. J.; March, D. R.; Bergman, D. A.; Chai, C. L. L.; Burkett, B. A. Conformational

-
- Selection of Inhibitors and Substrates by Proteolytic Enzymes: Implications for Drug Design and Polypeptide Processing. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1271-1281.
- 38 Gassman, J. M.; Magrath, J. An active-site titrant for chymotrypsin, and evidence that azapeptides esters are less susceptible to nucleophilic attack than ordinary esters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*(15), 1771-1774.
- 39 Powers, J. C.; Boone, R.; Carroll, D. L.; Gupton, B. F.; Kam C.-M.; Nishino, N.; Sakamoto, M.; Tuhy, P. M. Reaction of Azapeptides with Human Leukocyte Elastase and Porcine Pancreatic Elastase *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*(7), 4288-4294.
- 40 Taha, A.; True, N. Experimental ¹H NMR and Computational Studies of Internal Rotation of Solvated Formamide *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 2985-2993.
- 41 Kurtz, A. N.; Niemann, C. The interaction of Ethyl 1-Acetyl-2-benzylcarbazate with *alpha*-Chymotrypsin. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 1879-1882.
- 42 Magrath, J.; Abeles, R. H. Cysteine Protease Inhibition by Azapeptide Esters. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4279-4283.
- 43 Wiczerzak E, Drabik P, Łankiewicz L, Ołdziej S, Grzonka Z, Abrahamson M, Grubb A, Brömme D. Azapeptides Structurally Based upon Inhibitory Sites of Cystatins as Potent and Selective Inhibitors of Cysteine Proteases. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*(19), 4202-4211.
- 44 Xing, R.; Hanzlik, R. P. Azapeptides as Inhibitors and Active Site Titrants for Cysteine Proteinases. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1344-1351.
- 45 Zhang, R.; Durkin, J. P.; Windsor, W. T. Azapeptides as Inhibitors of the Hepatitis C Virus NS3 Serine Protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1005-1008.
- 46 Huang, Y.; Malcom, B. A.; Vederas, J. C. Synthesis and Testing of Azaglutamine Derivatives as Inhibitors of Hepatitis A Virus (HAV) 3C Proteinase. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 607-619.

-
- 47 Verhelst, S. H. L.; Witte, M. D.; Arastu-Kapur, S.; Fonovic, M.; Bogyo, M. Novel Aza Peptide Inhibitors and Active-Site Probes of Papain-Family Cysteine Proteases. *Chem. Bio. Chem.* **2006**, *7*, 943-950.
- 48 (a) Löser, R.; Frizler, M.; Schilling, K.; Gütschow, M. Azadipeptide nitriles : highly potent and proteolytically stable inhibitors of papain-like cysteine proteases. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 4331-4334. (b) Frizler, M.; Stirnberg, M.; Sisay, M. T.; Gütschow, M. Development of nitrile-based peptidic inhibitors of cystein cathepsins. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 294-322. (c) Frizler, M.; Lohr, F.; Furtmann, N.; Kläs, J.; Gütschow, M. Structural Optimization of Azadipeptide Nitriles Strongly Increases Association Rates and Allows the Development of Selective Cathepsin Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 396-400.
- 49 (a) Asgian, J. L.; James, K. E.; Li, Z. Z.; Carter, W.; Barrett, A. J.; Mikolajczyk, J.; Salvesen, G. S.; Powers, J. C. Aza-Peptide Epoxides: A New Class of Inhibitors Selective for Clan CD Cysteine Proteases *J. Med. Chem.* **2002**, *45*(23), 4958–4960.(b) James, K. E.; Asgian, J. L.; Li, Z. Z.; Ekici, O. D.; Rubin, J. R.; Mikolajczyk, J.; Salvesen, G. S.; Powers, J. C. Design, Synthesis, and Evaluation of Aza-Peptide Epoxides as Selective and Potent Inhibitors of Caspases-1, -3, -6, and -8 *J. Med. Chem.* **2004**, *47*(6), 1553–1574.
- 50 (a) Ekici, O. D.; Li, Z. Z.; Campbell, A. J.; James, K. E.; Asgian, J. L.; Mikolajczyk, J.; Salvesen, G. S.; Ganesan, R.; Jelakovic, S.; Grutter, M. G.; Powers, J. C. Design, Synthesis and Evaluation of Aza-peptide Michael Acceptors as Selective and Potent Inhibitors of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, -9 and -10. *J. Med. Chem.* **2004**, *49*(19), 5728-5749. (b) Ekici, O. D.; Gotz, M. G.; James, K. E.; Li, Z. Z.; Rukamp, B. J.; Asgian, J. L.; Caffrey, C. R.; Hansell, E.; Dvorak, J.; McKerrow, J. H.; Potempa, J.; Travis, J.; Mikolajczyk, J.; Salvesen, G. S.; Powers, J. C. Aza-Peptide Michael

-
- Acceptors: A New Class of Inhibitors Specific for Caspases and other Clan CD Cysteine Proteases. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*(8), 1889-1892.
- 51 Barrett, A. J.; Rawlings, N. D. Evolutionary Lines of Cysteine Peptidases. *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 727-733.
- 52 Bailey, M. D.; Halmos, T.; Goudreau, N.; Lescop, E.; Llinàs-Brunet, M. Novel Azapeptide Inhibitors of Hepatitis C Virus Serine Protease. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3788-3799.
- 53 Boeglin D, Xiang Z, Sorenson NB, Wood MS, Haskell-Luevano C, Lubell WD. Azascanning of the Potent Melanocortin Receptor Agonist Ac-His-d-Phe-Arg-Trp-NH₂. *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67*(4), 275-283.
- 54 Gibson, C.; Goodman, S. L.; Hahn, D.; Holzemann, G.; Kessler, H. Novel Solid-Phase Synthesis of Azapeptides and Azapeptoides via Fmoc-Strategy and Its Application in the Synthesis of RGD-Mimetics. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*(20), 7388-7394.
- 55 Hart, M.; Beeson, C. Utility of Azapeptides as Major Histocompatibility Complex Class II Protein Ligands for T-Cell Activation. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*(22), 3700-3709.
- 56 Weber, D.; Berger, C.; Eickelmann, P.; Antel, J.; Kessler, H. Design of Selective Peptidomimetic Agonists for the Human Orphan Receptor BRS-3. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*(10), 1918-1930.
- 57 Andurkar, S. V.; Béguin, C.; Stables, J. P.; Kohn, H. Synthesis and Structural Studies of Aza Analogues of Functionalized Amino Acids: New Anticonvulsant Agents. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*(9), 1475-1478.
- 58 Gray, C. J.; Quibell, M.; Baggett, N.; Hammerle, T. Incorporation of azaglutamine residues into peptides synthesised by the ultra-high load solid (gel)-phase technique. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*(5), 351-362.

-
- 59 Liley M, Johnson T. Solid phase synthesis of azapeptides utilising reversible amide bond protection to prevent hydantoin formation. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41(20), 3983-3985.
- 60 Ahn, I. A.; Woong Kim, S.; Ro, S. Solid phase synthesis of azapeptides using an automatic synthesizer. *Mol. Divers.* **1998**, 4(1), 23-24.
- 61 Melendez, R. E.; Lubell, W. D. Aza-Amino Acid Scan for Rapid Identification of Secondary Structure Based on the Application of *N*-Boc-Aza1-Dipeptides in Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(21), 6759-6764.
- 62 André F, Marraud M, Tsouloufis T, Tzartos SJ, Boussard G. Triphosgene: an efficient carbonylating agent for liquid and solid-phase aza-peptide synthesis. Application to the synthesis of two aza-analogues of the AChR MIR decapeptide. *J. Pept. Sci.* **1997**, 3(6), 429-441.
- 63 Boeglin, D.; Lubell, W. D. Aza-Amino Acid Scanning of Secondary Structure Suited for Solid-Phase Peptide Synthesis with Fmoc Chemistry and Aza-Amino Acids with Heteroatomic Side Chains. *J. Comb. Chem.* **2005**, 7(6), 864-878.
- 64 Freeman NS, Hurevich M, Gilon C. Synthesis of N'-substituted Ddz-protected hydrazines and their application in solid phase synthesis of aza-peptides. *Tetrahedron* **2009**, 65(8), 1737-1745.
- 65 Frochot C, Vanderesse R, Driou A, Linden G, Marraud M, Thong Cung, M. A solid-phase synthesis of three aza-, iminoaza- and reduced aza-peptides from the same precursor. *Lett. Pept. Sci.* **1997**, 4(4), 219-225.
- 66 Momany, F.; Bowers, C. Y.; Reynolds, G. A.; Hong, A.; Newlander, K. Conformational Energy Studies and *in Vitro* and *in Vivo* Activity Data on Growth Hormone-Releasing Peptides. *Endocrinol.* **1984**, 114(5), 1531-1536.

-
- 67 Bowers, C. Y.; Momany, F.; Reynolds, G. A.; Chang, D.; Hong, A.; Chang, K.; Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone *in vitro*. *Endocrinol.* **1981**, *106*, 663.
- 68 Momany, F.; Bowers, C. Y.; Reynolds, G. A.; Chang, D.; Hong, A.; Newlander, K. Design, Synthesis, and Biological Activity of Peptides which Release Growth Hormone *in vitro*. *Endocrinol.* **1981**, *108*(1), 31-39.
- 69 Howard, A. D.; Feighner, S. D.; Cully, D. F.; Arena, J. P.; Liberato, P. A.; Rosenblum, C. I. *et al.* A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* **1996**, *273*, 974–977.
- 70 (a) Kojima, M.; Hosoda, H.; Date, Y.; Nakazato, M.; Matsuo, H.; Kangawa, K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **1999**, *402*, 656–660. (b) Hosoda, H.; Kojima, M.; Kangawa, K. Biological, Physiological, and Pharmacological Aspects of Ghrelin. *J. Pharmacol. Sci.* **2006**, *100*, 398 – 410.
- 71 Popovic, V.; Damjanovic, S.; Micic, D.; Djurovic, M.; Dieguez, C.; Casanueva, F.F; Blocked Growth Hormone-Releasing Peptide (GHRP-6)-Induced GH Secretion and Absence of the Synergic Action of GHRP-6 Plus GH-Releasing Hormone in Patients with Hypothalamopituitary Disconnection: Evidence That GHRP-6 Main Action Is Exerted at the Hypothalamic Level. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1995**, *80*(3), 942-947.
- 72 Popovic, V.; Leal, A.; Micic, D.; Koppeschaar, H.P.F.; Torres, E.; Paramo, C.; Obradovic, S.; Dieguez, C.; Casanueva, F. F. GHreleasing hormone and GH-releasing peptide-6 for diagnostic testing in GH-deficient adults. *Lancet* **2000**, *356*, 1137–1142.
- 73 Cordido, F.; Peñalva, A.; Dieguez, C.; Casanueva, F. F. Massive growth hormone (GH) discharge in obese subjects after the combined administration of GH-releasing

-
- hormone and GHRP-6: evidence for a marked somatotroph secretory capability in obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1993**, *76*, 819-23.
- 74 Laron, Z.; Frenkel, J.; Deghenghl, R.; Anin, S.; Klinger, B.; Siibergeld, A. Intranasal administration of the GHRP hexarelin accelerates growth in short children. *Clinical Endocrinol.* **1995**, *43*, 631–635.
- 75 Frutos, M. G-S.; Cacicedo, L.; Fernandez, C.; Vicent, D.; Velasco, B.; Zapatero, H.; Sanchez-Franco, F.; Insights into a role of GH secretagogues in reversing the age-related decline in the GH/IGF-1 axis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2007**, *293*, E1140-E1152.
- 76 Lucchesi, P. A. Growth Hormone-Releasing Peptides and the Heart: Secretagogues or Cardioprotectors? *Cardiovasc. Res.* **2004**, *61*, 7-8.
- 77 Bodart, V.; Bouchard, J. F.; McNicoll, N.; Escher, E.; Carriere, P.; Ghigo, E.; Sejlitz, T.; Sirois, M.G.; Lamontagne, D.; Ong, H. Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. *Circ. Res.* **1999**, *85*, 796-802.
- 78 Dawson, D.W.; Pearce, S. F.; Zhong, R.; Silverstein, R. L.; Frazier, W. A.; Bouck, N. P. CD36 mediates the in vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J. Cell. Biol.* **1997**, *138*, 707–717.
- 79 Nicholson, A. C.; Frieda, S.; Pearce, A.; Silverstein, R. L. Oxidized LDL Binds to CD36 on Human Monocyte-Derived Macrophages and Transfected Cell Lines. Evidence Implicating the Lipid Moiety of the Lipoprotein as the Binding Site. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1995**, *15*, 269-275.
- 80 Demers, A.; McNicoll, N.; Febbraio, M.; Servant, M.; Marleau, S.; Silverstein, R.; Ong, H.; Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem. J.* **2004**, *382*, 417–424.

-
- 81 Collot-Teixeira, S.; Martin, J.; McDermott-Roe, C.; Poston, R.; McGregor, J. L. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardio. Res.* **2007**, *75*, 468–477.
- 82 Ong, H.; Tremblay, A.; Febbraio, M.; Silverstein, R. L.; Avallone, R.; Iken, K.; Wang, Y.; Bujold, K.; Demers, A.; Sirois, M. G. *et al.* (2003) Growth hormone-releasing peptides as inhibitors of fatty streaks formation: A new therapy for atherosclerosis. In Program and Abstracts of the 85th Annual Meeting of The Endocrine Society, Philadelphia, 19–22 June 2003, p. 361, abstract P-223.
- 83 Febbraio, M.; Silverstein, R. L. CD36: Implications in Cardiovascular Disease. *Int J Biochem Cell Biol.* **2007**, *39*(11), 2012–2030.
- 84 Friedman, D. S.; O’Colmain, B. J.; Munoz, B.; Tomany, S. C.; McCarty, C.; de Jong, P. T. V. M.; Nemesure, B.; Mitchell, P.; Kempen, J.; Congdon, N. *Arch Ophthalmol.* **2004**, *122*, 564-572
- 85 Jager, R. D.; Mieler, W. F.; Miller, J. W. Age-Related Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 2606-2617.
- 86 Geysen, H. M.; Meloen, R. H.; Berteling, S. J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1984**, *81*, 3998-4002.
- 87 Houghten, R. A. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1985**, *82*, 5131-5135.
- 88 Ede, N. J. Multiple parallel synthesis of peptides on SynPhase™ grafted supports. *Journal of Immunological Methods.* **2002**, *267*, 3–11.
- 89 <http://www.combichemlab.com/website/files/Combichem/Microreactors/irori.htm>, page consultée le 4 avril 2012.

-
- 90 Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M.; Hruby, V. J.; Kazmierski, W. M.; Knapp, R. J. A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature* **1991**, *354*, 82.
- 91 Furka, A.; Sebestyén, F.; Asgedom, M.; Dibó, G. General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 487.
- 92 Pour une revue de la littérature, voir: Lam, K. S.; Lebl, M.; Krchňák, V. The “One-Bead-One-Compound” Combinatorial Library Method. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411-448.
- 93 Salmon, S. E.; Lam, K. S.; Lebl, M.; Kandola, A.; Khattri, P. S.; Wade, S.; Patek, M.; Kocis, P.; Krchnak, V.; Thorpe, D.; Felder, S. Discovery of Biologically Active Peptides in Random Libraries: Solution- Phase Testing After Staged Orthogonal Release from Resin Beads. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 11708-11712.
- 94 Liu, R.; Marik, J.; Lam, K. S. A Novel Peptide-Based Encoding System for “One-Bead One-Compound” Peptidomimetic and Small Molecule Combinatorial Libraries. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7678-7680.
- 95 Geysen, H. M.; Rodda, S. J.; Mason, T. J. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol. Immunol.* **1986**, *23*, 709-715.
- 96 Erb, E.; Janda, K. D.; Brenner, S. Recursive deconvolution of combinatorial chemical libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11422-11426.
- 97 Pinilla, C.; Appel, J. R.; Blanc, P.; Houghten, R. A. Rapid identification of high affinity peptide ligands using positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries. *Biotechniques* **1992**, *13*, 901-905.
- 98 Merrifield, R. B.; Stewart, J. M. Automated Peptide Synthesis. *Nature* **1965**, *207*, 522 – 523.

-
- 99 Boeijen, A.; van Ameijde, J.; Liskamp, R. M. J. Solid-Phase Synthesis of Oligopeptide Peptidomimetics Employing the Fmoc Protection Strategy. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (25), 8454–8462.
- 100 (a) Cho, C. Y.; Moran, E. J.; Cherry, S. R.; Stephans, J. C.; Fodor, S. P.; Adams, C. L.; Sundaram, A.; Jacobs, J. W.; Schultz, P. G. An unnatural biopolymer. *Science* **1993**, *261*, 1303-1305. (b) Cho, C. Y.; Youngquist, R. S.; Paikoff, S. J.; Beresini, M. H.; Hebert, A. R.; Berleau, L. T.; Liu, C. W.; Wemmer, D. E.; Keough, T.; Schultz, P. G. Synthesis and Screening of Linear and Cyclic Oligocarbamate Libraries. Discovery of High Affinity Ligands for GPIIb/IIIa. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (31), 7706–7718.
- 101 Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Kent, S. B. H.; Moos, W.H. Efficient Method for the Preparation of Peptoids [Oligo(N-substituted glycines)] by Submonomer Solid-Phase Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10646-10647.
- 102 (a) Ostresh, J. M.; Husar, G. M.; Blondelle, S. E.; Dörner, B.; Weber, P. A.; Houghten, R. A. "Libraries from libraries": Chemical transformation of combinatorial libraries to extend the range and repertoire of chemical diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 11138. (b) Dörner, B.; Husar, G. M.; Ostresh, J. M.; Houghten, R. A. The Synthesis of Peptidomimetic Combinatorial Libraries Through Successive Amide Alkylations. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*(5), 709-715.
- 103 Burkoth, T. S.; Beausoleil, E.; Kaur, S.; Tang, D.; Cohen, F. E.; Zuckermann, R. N. Toward the Synthesis of Artificial Proteins: The Discovery of an Amphiphilic Helical Peptoid Assembly. *Chemistry & Biology.* **2002**, *9*, 647–654.
- 104 Humet, M.; Carbonell, T.; Masip, I.; Sánchez-Baeza, F.; Mora, P.; Cantón, E.; Gobernado, M.; Abad, A.; Pérez-Payá, E.; Messeguer, A. A Positional Scanning Combinatorial Library of Peptoids As a Source of Biological Active Molecules: Identification of Antimicrobials. *J. Comb. Chem.*, **2003**, *5* (5), 597–605.

-
- 105 (a) Nefzi, A.; Ostresh, J. M.; Meyer, J.-P.; Houghten, R. A. Solid phase synthesis of heterocyclic compounds from linear peptides: Cyclic ureas and thioureas. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38(6), 931-934. (b) Nefzi, A.; Dooley, C.; Ostresh, J. M.; Houghten, R. A. Combinatorial chemistry: From peptides and peptidomimetics to small organic and heterocyclic compounds. *Bioorg. Med Chem Lett.* **1998**, 8(17), 2273-2278.
- 106 O'Donnell, M. J.; Zhou, C.; Scott, W. L. Solid-Phase Unnatural Peptide Synthesis (UPS). *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6070-6071.
- 107 La majorité des résultats discutés sont publiés dans : Sabatino, D.; Proulx, C.; Kloczek, S.; Bourguet, C. B.; Boeglin, D.; Ong, H.; Lubell, W. D. Exploring Side-Chain Diversity by Submonomer Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. *Org. Lett.* **2009**, 11, 3650.
- 108 Lubell, W. D.; Blankenship, J. W.; Fridkin, G.; Kaul, R. (2005) "Peptides." Science of Synthesis 21.11, Chemistry of Amides. Thieme, Stuttgart, 713-809.
- 109 Résultats non publiés.
- 110 García Ramos, Y.; Lubell, W. D. Résultats non publiés.
- 111 (a) Hayashi, Y.; Sekiyama, N.; Nakanishi, S.; Jane, D. E.; Sunter, D. C.; Birse, E. F.; Udvarhelyi, P. M.; Watkins, J. C. Analysis of Agonist and Antagonist Activities of Phenylglycine Derivatives for Different Cloned Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes. *J. Neurosci.* **1994**, 74(5), 3370-3377. (b) Bedingfield, J. S.; Kemp, M. C.; Jane, D. E.; Tse, H.-E.; Roberts, P. J.; Watkins, J. C. Structure-activity relationships for a series of phenylglycine derivatives acting at metabotropic glutamate receptors (mGluRs). *Br. J. Pharmacol.* **1995**, 116, 3323. (c) Bedingfield, J. S.; Jane, D. E.; Kemp, M. C.; Toms, N. J.; Roberts, P. J. Novel potent selective phenylglycine antagonists of metabotropic glutamate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, 309, 71-78.

-
- 112 Chen, K. X.; Njoroge, F. G.; Pichardo, J.; Prongay, A.; Butkiewicz, N.; Yao, N.; Madison, V.; Girijavallabhan, V. Potent 7-Hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic Acid-Based Macrocyclic Inhibitors of Hepatitis C Virus NS3 Protease. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 567-574.
- 113 Oost, T. K.; Sun, C.; Armstrong, R. C.; Al-Assaad, A.-S.; Betz, S. F.; Deckwerth, T. L.; Ding, H.; Elmore, S. W.; Meadows, R. P.; Olejniczak, E. T.; Oleksijew, A.; Oltersdorf, T.; Rosenberg, S. H.; Shoemaker, A. R.; Tomaselli, K. J.; Zou, H.; and Fesik, S. W. Discovery of Potent Antagonists of the Antiapoptotic Protein XIAP for the Treatment of Cancer. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4417-4426.
- 114 (a) Williams, R. M.; Hendrix, J. A. Asymmetric Synthesis of Arylglycines. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 889-917.
- 115 Smith, G. G.; Sivakua, T. Mechanism of the Racemization of Amino Acids. Kinetics of Racemization of Arylglycines. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*(5), 628-634.
- 116 Elsayy, M. A.; Hewageb, C.; Walkera, B. *J. Pept. Sci.* **2012**, *18*, 302-311.
- 117 Zhao, L.; Baslé, O.; Li, C.-J. Site-specific C-functionalization of free-(NH) peptides and glycine derivatives via direct C-H bond functionalization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*(11), 4106-4111.
- 118 (a) Wolfe, J. P.; Wagaw, S.; Marcoux, J.-F.; Buchwald, S. L. Rational Development of Practical Catalysts for Aromatic Carbon-Nitrogen Bond Formation. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 805-818. (b) Hartwig, J.-F. Carbon-Heteroatom Bond-Forming Reductive Eliminations of Amines, Ethers, and Sulfides. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*(12), 852-860.
- 119 (a) Wolter, M.; Klapars, A.; Buchwald, S. L. Synthesis of *N*-Aryl Hydrazides by Copper-Catalyzed Coupling of Hydrazides with Aryl Iodides. *Org. Lett.* **2001**, *3*(23), 3803-3805. (b) Lam, M. S.; Lee, H. W.; Chan, A. S. C.; Kwong, F. Y.

-
- Copper(I)-picolinic acid catalyzed N-arylation of hydrazides. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6192-6194.
- 120 Jiang, L.; Lu, X.; Zhang, H.; Jiang, Y., Ma, D. CuI/4-Hydro-L-proline as a More Effective Catalytic System for Coupling of Aryl Bromides with *N*-Boc Hydrazine and Aqueous Ammonia. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4542-4546.
- 121 Klapars, A.; Antilla, J. C.; Huang, X.; Buchwald, S. L. A General and Efficient Copper Catalyst for the Amidation of Aryl Halides and the *N*-Arylation of Nitrogen Heterocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7727-7729.
- 122 Barluenga, J.; Moriel, P.; Aznar, F.; Valdés, C. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling between Vinyl Halides and tert-Butyl Carbazate: First General Synthesis of the Unusual *N*-Boc-*N*-alkenylhydrazines. *Org. Lett.* **2007**, *9*(2), 275-278.
- 123 Reichelt, A.; Falsey, J.R.; Rzasa, R.M.; Thiel, O.R.; Achmatowicz, M.M.; Larsen, R.D.; Zhang, D. Palladium-Catalyzed Chemoselective Monoarylation of Hydrazides for the Synthesis of [1,2,4]Triazolo[4,3-*a*]pyridines. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 792-795.
- 124 Starkov, P.; Zemskov, I.; Sillard, R.; Tšubrik, O.; Mäeorg, U. Copper-catalyzed *N*-arylation of carbamate-protected hydrazones with organobismuthanes. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1155-1157.
- 125 Goldberg, A. A. Hydrolysis of substituted *o*-chlorobenzoic acids. The mechanism of the reaction between *o*-halogenobenzoic acids and nucleophilic reagents. *J. Chem. Soc.* **1952**, 4368-4373.
- 126 Combs, A. P.; Rafalski, M. *N*-Arylation of Sulfonamides on Solid Supports. *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 29-32.
- 127 Wu, T. Y. H.; Schultz, P. G. A Versatile Linkage Strategy for Solid-Phase Synthesis of *N,N*-Dimethyltryptamines and β -Carbolines. *Org. Lett.* **2002**, *4*(23), 4033-4036.
- 128 Kaval, N.; Singh, B. K.; Ermolat'ev, D. S.; Claerhout, S.; Parmar, V. S.; Van der Eycken, J.; Van der Eycken, E. Transition Metal-Catalyzed Orthogonal Solid-Phase

-
- Decoration of the 2(1*H*)-Pyrazinone Scaffold Using a Sulfur Linker. *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 446-453.
- 129 Bettinetti, L.; Löber, S.; Hübner, H.; Gmeiner, P. Parallel Synthesis and Biological Screening of Dopamine Receptor Ligands Taking Advantage of a Click Chemistry Based BAL Linker. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 309-316.
- 130 Huisgen, R. *Proc. Chem. Soc.* **1961**, 357-396.
- 131 (a) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064. (b) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- 132 Boren, B. C.; Narayan, S.; Rasmussen, L. K.; Zhang, L.; Zhao, H.; Lin, Z.; Jia, G.; Fokin, V. V. Ruthenium-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition: Scope and Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8923–8930.
- 133 Hartmuth C. Kolb, M. G. Finn, and K. Barry Sharpless. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- 134 El-Sagheer, A. H.; Brown, T. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1388–1405.
- 135 Elchinger, P.-H.; Faugeras, P.-A.; Boëns, B.; Brouillette, F.; Montplaisir, D.; Zerrouki, R.; Lucas, R. Polysaccharides: The “Click” Chemistry Impact. *Polymers* **2011**, *3*, 1607-1651.
- 136 (a) Speers, A. E.; Adam, G. C.; Cravatt, B. F. Activity-Based Protein Profiling in Vivo Using a Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4686-4687. (b) Beatty, K. E.; Liu, J. C.; Xie, F.; Dieterich, D. C.; Schuman, E. M.; Wang, Q.; Tirrell, D. A. Fluorescence Visualization of Newly Synthesized Proteins in Mammalian Cells. *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7524–7527.
- 137 (a) Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am.*

-
- Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192-3193. (b) Gupta, S. S.; Kuzelka, J.; Singh, P.; Lewis, W. G.; Manchester, M.; Finn, M. G. Accelerated Bioorthogonal Conjugation: A Practical Method for the Ligation of Diverse Functional Molecules to a Polyvalent Virus Scaffold. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1572–1579.
- 138 Link, A. J.; Tirrell, D. A. Cell Surface Labeling of Escherichia coli via Copper(I)-Catalyzed [3+2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164-11165.
- 139 Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272–1279.
- 140 Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. *Drug Discovery Today* **2003**, *8*(24), 1128-1137.
- 141 Tornøe, C. W.; Sanderson, S. J.; Mottram, J. C.; Coombs, G. H.; Meldal, M. Combinatorial Library of Peptidotriazoles: Identification of [1,2,3]-Triazole Inhibitors against a Recombinant *Leishmania mexicana* Cysteine Protease. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 312-324.
- 142 Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. Click Chemistry Reactions in Medicinal Chemistry: Applications of the 1,3-dipolar Cycloaddition Between Azides and Alkynes. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*(2), 278 -308.
- 143 Ikeda, Y.; Kawahara, S.; Taki, M.; Kuno, A.; Hasegawa, T.; Taira, K. Synthesis of a novel histidine analogue and its efficient incorporation into a protein *in vivo*. *Protein Engineering* **2003**, *16*(9), 699-706.
- 144 Herr, R. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3379–3393.
- 145 Palmer, M. H.; Findlay, R. H.; Gaskell, A. J. Electronic Charge Distribution and Moments of Five- and Six-membered Heterocycles. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1974**, 420–428.
- 146 Abell, A. D. Heterocyclic-based peptidomimetics. *Lett. Pept. Sci.* **2002**, *8*, 267-272.

-
- 147 Capicciotti, C. J.; Trant, J. F.; Leclère, M.; Ben, R. N. Synthesis of C-Linked Triazole-Containing AFGP Analogues and Their Ability to Inhibit Ice Recrystallization. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (4), 605–616.
- 148 Tam, A.; Arnold, U.; Soellner, M. B.; Raines, R. T. Protein Prosthesis: 1,5-Disubstituted[1,2,3]triazoles as cis-Peptide Bond Surrogates. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12670-12671.
- 149 Oh, K.; Guan, Z. A convergent synthesis of new β -turn mimics by click chemistry. *Chem. Commun.* **2006**, 3069–3071.
- 150 Wu, C.-F.; Zhao, X.; Lan, W.-X.; Cao, C.; Liu, J.-T.; Jiang, X.-K.; Li, Z.-T. A 1,4-Diphenyl-1,2,3-Triazole-Based β -Turn Mimic Constructed by Click Chemistry. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 4261–4270.
- 151 (a) Bock, V. D.; Perciaccante, R.; Jansen, T. P.; Hiemstra, H.; vanMaarseveen, J. H. Click Chemistry as a Route to Cyclic Tetrapeptide Analogues: Synthesis of *cyclo*-[Pro-Val- ψ (triazole)-Pro-Tyr]. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 919–922. (b) Bock, V. D.; Speijer, D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. 1,2,3-Triazoles as peptide bond isosteres: synthesis and biological evaluation of cyclotetrapeptide mimics. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 971-975.
- 152 Beierle, J. M.; Horne, W. S.; van Maarseveen, J. H.; Waser, B.; Reubi, J. C.; Ghadiri, M. R. Conformationally Homogeneous Heterocyclic Pseudotetrapeptides as Three-Dimensional Scaffolds for Rational Drug Design: Receptor-Selective Somatostatin Analogues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4725–4729.
- 153 Jagasia, R.; Holub, J. M.; Bollinger, M.; Kirshenbaum, K.; Finn, M. G. Peptide Cyclization and Cyclodimerization by CuI-Mediated Azide-Alkyne Cycloaddition. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2964-2974.

-
- 154 van Maarseveen, J. H.; Horne, W. S.; Ghadiri, M. R. Efficient Route to C₂ Symmetric Heterocyclic Backbone Modified Cyclic Peptides. *Org. Lett.* **2005**, 7(20), 4503-4506.
- 155 Ingale, S.; Dawson, P. E. On Resin Side-Chain Cyclization of Complex Peptides Using CuAAC. *Org. Lett.* **2011**, 13(11).
- 156 Turner, R. A.; Oliver, A. G.; Lokey, R. S. Click Chemistry as a Macrocyclization Tool in the Solid-Phase Synthesis of Small Cyclic Peptides. *Org. Lett.* **2007**, 9, 5011.
- 157 Kawagishi, H.; Somoto, A.; Kuranari, J.; Kimura, A.; Chiba, S. A novel cyclotetrapeptide produced by *Lactobacillus helveticus* as a tyrosinase inhibitor. *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 3439–3440.
- 158 Horne, W. S.; Yadav, M. K.; Stout, C. D.; Ghadiri, M. R. Heterocyclic Peptide Backbone Modifications in an r-Helical Coiled Coil. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15366-15367.
- 159 Cantel, S.; Isaad Ale, C.; Scrima, M.; Levy, J. J.; DiMarchi, R. D.; Rovero, P.; Halperin, J. A.; D'Ursi, A. M.; Papini, A. M.; Chorev, M. Synthesis and conformational analysis of a cyclic peptide obtained via i to i + 4 intramolecular side-chain to side-chain azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 5663–5674.
- 160 Angelo, N. G.; Arora, P. S. Nonpeptidic Foldamers from Amino Acids: Synthesis and Characterization of 1,3-Substituted Triazole Oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 17134-17135.
- 161 Bochi, R. J.; Chabala, J. C.; Harris, E.; Peterson, L. H.; Barash, L.; Beattie, T.; Brown, J. E.; Graham, D. W.; Waksmunski, F. S.; Tischler, M.; Joshua, H.; Smith, J.; Colwell, L. F.; Wyvratt, Jr., M. J.; Fisher, M. H. Benzylated 1,2,3-Triazoles as Anticoccidiostats. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 2843-2852.

-
- 162 Linares, D.; Bottzeck, O.; Pereira, O.; Praud-Tabariès, A.; Blache, Y. Designing 2-aminoimidazole alkaloids analogs with anti-biofilm activities: Structure–activities relationships of polysubstituted triazoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*(22), 6751-6755.
- 163 Klein, M.; Krainz, K.; Redwan, I. N.; Dinér, P.; Grøtli, M. Synthesis of Chiral 1,4-Disubstituted-1,2,3-Triazole Derivatives from Amino Acids. *Molecules* **2009**, *14*, 5124-5143.
- 164 Buysse, K.; Farard, J.; Nikolaou, A.; Vanderheyden, P.; Vauquelin, G.; Pedersen, D. S.; Tourwé, D.; Ballet, S. Amino Triazolo Diazepines (Ata) as Constrained Histidine Mimics. *Org. Lett.* **2011**, *13*(24), 6468-6471.
- 165 Schofield, K.; Grimmett, M. R.; Keene, B. R. T. *Heteroaromatic Nitrogen Compounds: The Azoles*; Cambridge University Press: New York, 1976.
- 166 Kee, J.-M.; Villani, B.; Carpenter, L. R.; Muir, T. W. Development of Stable Phosphohistidine Analogues. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14327–14329.
- 167 Röhrig, U. F.; Majjigapu, S. R.; Grosdidier, A.; Bron, S.; Stroobant, V.; Pilotte, L.; Colau, D.; Vogel, P.; Van den Eynde, B. J.; Zoete, V.; Michielin, O. Rational Design of 4-Aryl-1,2,3-Triazoles for Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Inhibition. *J. Med. Chem.* ASAP.
- 168 Moorhouse, A. D.; Moses, J. E. Click Chemistry and Medicinal Chemistry: A Case of “Cyclo-Addiction”. *Chem. Med. Chem.* **2008**, *3*, 715 – 723.
- 169 Bräse, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V. Organic Azides: An Exploding Diversity of a Unique Class of Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5188 – 5240.
- 170 Appukkuttan, P.; Dehaen, W.; Fokin, V. V.; Van der Eycken, E. A Microwave-Assisted Click Chemistry Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles via a

-
- Copper(I)-Catalyzed Three-Component Reaction. *Org. Lett.* **2004**, 6(23), 4223-4225.
- 171 Beckmann, H. S. G.; Wittmann, V. One-Pot Procedure for Diazo Transfer and Azide-Alkyne Cycloaddition: Triazole Linkages from Amines. *Org. Lett.* **2007**, 9(1), 1-4.
- 172 Barral, K.; Moorhouse, A. D.; Moses, J. E. Efficient Conversion of Aromatic Amines into Azides: A One-Pot Synthesis of Triazole Linkages. *Org. Lett.* **2007**, 9(9), 1809-1811.
- 173 Feldman, A. K.; Colasson, B.; Fokin, V. V. One-Pot Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles from In Situ Generated Azides. *Org. Lett.* **2004**, 6(22), 3897-3899.
- 174 Xu, W.-M.; Huang, X.; Tang, E. Solid-Phase Synthesis of 1,2-Diheterocyclic-Substituted (E)-Olefins from a Supported Selenium Resin. *J. Comb. Chem.* **2005**, 7, 726-733.
- 175 Bolduc, O. R.; Lambert-Lanteigne, P.; Colin, D. Y.; Zhao, S. S.; Proulx, C.; Boeglin, D.; Lubell, W. D.; Pelletier, J. N.; Féthière, J.; Ong, H.; Masson, J.-F. Modified peptide monolayer binding His-tagged biomolecules for small ligand screening with SPR biosensors. *Analyst* **2011**, 136, 3142-3148.
- 176 Peshkov, V. A.; Pereshivko, O. P.; Van der Eycken, E. V. A walk around the A³-coupling. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 3790-3807.
- 177 Marleau, S.; Harb, D.; Bujold, K.; Avallone, R.; Iken, K.; Wang, Y.; Demers, A.; Sirois, M. G.; Febbraio, M.; Silverstein, R. L.; Tremblay, A.; Ong, H. EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.* **2005**, 19, 1869-1871.

-
- 178 Walsh, C. T.; Garneau-Tsodikova, S.; Gatto, G. J., Jr. Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7342–7372.
- 179 Bannister, A. J.; Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **2011**, *21*, 381–395.
- 180 Oliveira, E. F.; Cerqueira, N. M. F. S. A.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. Mechanism of Formation of the Internal Aldimine in Pyridoxal 5'-Phosphate-Dependent Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15496–15505.
- 181 Lin, S.; Cronan, J. E. Closing in on complete pathways of biotin biosynthesis. *Mol. Bio. Syst.* **2011**, *7*, 1811–1821.
- 182 Puthenveetil, S.; Liu, D. S.; White, K. A.; Thompson, S.; Ting, A. Y. Yeast Display Evolution of a Kinetically Efficient 13-Amino Acid Substrate for Lipoic Acid Ligase. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16430–16438.
- 183 Rabiller, C.; Danho, D. Model Compounds for Rhodopsin and Bacteriorhodopsin: Synthesis, and ¹H- and ¹³C-NMR Study. *Helvetica Chimica Acta* **1984**, *67*, 1254–1273.
- 184 Culhane, J. C.; Wang, D.; Yen, P. M.; Cole, P. A. Comparative Analysis of Small Molecules and Histone Substrate Analogues as LSD1 Lysine Demethylase Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3164–3176.
- 185 Huang, R.; Holbert, M. A.; Tarrant, M. K.; Curtet, S.; Colquhoun, D. R.; Dancy, B. M.; Dancy, B. C.; Hwang, Y.; Tang, Y.; Meeth, K.; Marmorstein, R.; Cole, R. N.; Khochbin, S.; Cole, P. A. Site-Specific Introduction of an Acetyl-Lysine Mimic into Peptides and Proteins by Cysteine Alkylation. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9986–9987.
- 186 Smith, B. C.; Denu, J. M. Sir2 Deacetylases Exhibit Nucleophilic Participation of Acetyl-Lysine in NAD⁺ Cleavage. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5802–5803.

-
- 187 Hughes, R. M.; Waters, M. L. Effects of Lysine Acetylation in a α -Hairpin Peptide: Comparison of an Amide- π and a Cation- π Interaction *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13586-13591.
- 188 Rivier, J.; Porter, J.; Hoeger, C.; Theobald, P.; Craig, A. G.; Dykert, J.; Corrigan, A.; Perrin, M.; Hook, W. A.; Siraganian, R. P.; Vale, I. W.; Rivier, C. Gonadotropin-Releasing Hormone Antagonists with N ω -Triazolylornithine, -lysine, or -*p*-aminophenylalanine Residues at Positions 5 and 6. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4210-4278.
- 189 Stokker, G. E.; Hoffman, W. F.; Homnick, C. F. A Simple and Inexpensive Synthesis of 4-(Aminomethyl)-L-phenylalanine. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5015-5016.
- 190 Ganorkar, R.; Natarajan, A.; Mamai, A.; Madalengoitia, J. S. Synthesis of Conformationally Constrained Lysine Analogues. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5004-5007.
- 191 Goswami, R.; Moloney, M. G. Novel peptidomimetic structures: enantioselective synthesis of conformationally constrained lysine, ornithine and alanine analogues from pyroglutamic acid. *Chem. Commun.* **1999**, 2333-2334.
- 192 Stalker, R. A.; Munsch, T. E.; Tran, J. D.; Nie, X.; Warmuth, R.; Beatty, A.; Aakeröy, C. B. Asymmetric synthesis of two new conformationally constrained lysine derivatives. *Tetrahedron* **2002**, *58*(24), 4837-4849.
- 193 Campbell, J. A.; Rapoport, H. Chiroselective Syntheses of Conformationally Constrained 7-Azabicycloheptane Amino Acids by Transannular Alkylation. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6313-6325.
- 194 Zhang, K.; Wang, J.; Sun, Z.; Nguyen, D.-H.; Schweizer, F. Synthesis of Sugar-Lysine Chimera with Integrated *gluco*-Configured 1,3-Hydroxyamine Motif. *Synlett* **2007**, *2*, 239-242.

-
- 195 Murray, P. J.; Starkey, I. D. The enantiospecific synthesis of functionalised pipercolic acids as constrained analogues of lysine. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *11*(11), 1875-1878.
- 196 Murray, P. J.; Starkey, I. D.; Davies, J. E. The enantiospecific synthesis of novel lysine analogues incorporating a pyrrolidine containing side chain. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*(37), 6721-6724.
- 197 Rivier, J. E.; Hoeger, C.; Erchegeyi, J.; Gulyas, J.; DeBoard, R.; Craig, A. G.; Koerber, S. C.; Wenger, S.; Waser, B.; Schaer, J.-C.; Reubi, J. C. Potent Somatostatin Undecapeptide Agonists Selective for Somatostatin Receptor 1 (sst1). *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2238-2246.
- 198 McNally, J. J.; Youngman, M. A.; Dax, S. L. Mannich reactions of resin-bound substrates: 2. A versatile three-component solid-phase organic synthesis methodology. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 967-970.
- 199 (a) Youngman, M. A.; Dax, S. L. Mannich Reactions of a Resin-Bound Terminal Alkyne. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*(36), 6347-6350. (b) Youngman, M. A.; Dax, S. L. Solid-Phase Mannich Condensation of Amines, Aldehydes, and Alkynes: Investigation of Diverse Aldehyde Inputs. *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 469-472.
- 200 Dyatkin, A. B.; Rivero, R. A. The solid phase synthesis of complex propargylamines using the combination of sonogashira and mannich reactions. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*(22), 3647-3650.
- 201 Pour un exemple où ces conditions sont utilisées, voir: Holub, J. M.; Jang, H.; Kirshenbaum, K. Clickity-click: highly functionalized peptoid oligomers generated by sequential conjugation reactions on solid-phase support. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1497-1502.

-
- 202 Bourguet, C. B.; Sabatino, D.; Lubell, W. D. Benzophenone semicarbazone protection strategy for synthesis of aza-glycine containing aza-peptides. *Pept. Sci.* **2008**, *90*(6), 824-831.
- 203 Bourguet, C. B.; Proulx, C.; Klocek, S.; Sabatino, D.; Lubell, W. D. Solution-phase submonomer diversification of aza-dipeptide building blocks and their application in aza-peptide and aza-DKP synthesis. *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 284-296.
- 204 Bush, C. A.; Sarkar, S. K.; Kopple, K. D. Circular dichroism of β turns in peptides and proteins. *Biochemistry* **1978**, *17*, 4951-4954.
- 205 Freidinger, R. M.; Veber, D. F.; Perlow, D. S.; Brooks, J. R.; Saperstein, R. Bioactive conformation of luteinizing hormone-releasing hormone: evidence from a conformationally constrained analog. *Science* **1980**, *210*, 656.
- 206 Toniolo, C. Conformationally restricted peptides through short-range cyclizations. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 287-300.
- 207 Elliot, R. L.; Kopecka, H.; Tufano, M. D.; Shue, Y.-K.; Gauri, A. J.; Lin, C.-W.; Bianchi, B. R.; Miller, T. R.; Witte, D. G.; Stashko, M. A.; Asin, K. E.; Nikkel, A. L.; Bednarz, L.; Nadzan, A. M. Novel Asp³²- Replacement Tetrapeptide Analogues as Potent and Selective CCK-A Agonists. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1562.
- 208 (a) Jamieson, A. G.; Boutard, N.; Beauregard, K.; Bodas, M. S.; Ong, H.; Quiniou, C.; Chemtob, S.; Lubell, W. D. Positional Scanning for Peptide Secondary Structure by Systematic Solid-Phase Synthesis of Amino Lactam Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7917-7927. (b) Boutard, N.; Jamieson, A. G.; Ong, H.; Lubell, W. D. Structure-activity analysis of the growth hormone secretagogue GHRP-6 by alpha- and beta-amino gamma-lactam positional scanning. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2010**, *75*, 40-50.
- 209 Peshkov, V. A.; Pereshivko, O. P.; Sharma, S.; Meganathan, T.; Parmar, V. S.; Ermolat'ev, D. S.; Van der Eycken, E. V. Tetrasubstituted 2-Imidazolones via

-
- Ag(I)-Catalyzed Cycloisomerization of Propargylic Ureas. *J. Org. Chem.*, **2011**, 76(14), 5867–5872.
- 210 Lei, A.; Lu, X. Palladium(II)-Catalyzed Tandem Intramolecular Aminopalladation of Alkynes and Conjugate Addition. Synthesis of Oxazolidinones, Imidazolidinones, and Lactams. *Org. Lett.* **2000**, 2(17), 2699-2702.
- 211 Verniest, G.; Padwa, A. Gold- and Silver-Mediated Cycloisomerizations of *N*-Propargylamides. *Org. Lett.* **2008**, 10(19), 4379-4382.
- 212 Chiu, S.-K.; Keifer, L.; Timberlake, J. W. Synthesis of Imidazolidinediones and Oxazolidinediones from Cyclization of Propargylureas and Propargyl Carbamates. *J. Med. Chem.* **1979**, 22(6), 746-748.
- 213 Kimura, M.; Kure, S.; Yoshida, Z.; Tanaka, S.; Fugami, K.; Tamaru, Y. Convenient synthesis of densely functionalized *N*-substituted 4-methylene-2-oxazolidinone. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31(34), 4887-4890.
- 214 Ramesh, R.; Chandrasekaran, Y.; Megha, R.; Chandrasekaran, S. Base catalyzed cyclization of *N*-aryl and *N*-alkyl-*O*-propargyl carbamates to 4-alkylidene-2-oxazolidinones. *Tetrahedron* **2007**, 63(37), 9153-9162.