

Université de Montréal

**Synthèse des analogues de l'[azaPhe⁴]-GHRP-6 comme
potentiels modulateurs du récepteur CD36**

Par

Kelvine Chignen Possi,

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales

En vue de l'obtention de grade de Maîtrise ès sciences (M.Sc.) en chimie

Novembre 2017

© Kelvine Chignen Possi, 2017

Résumé

Les azapeptides sont des mimes peptidiques où l'un ou plusieurs des carbones de la chaîne principale ont été remplacés par des atomes d'azote. Ce remplacement augmente la rigidité de la structure peptidique et favorise le repliement de type β . Le repliement de type β des azapeptides est associé à plusieurs propriétés thérapeutiques. Comparativement aux peptides parents, les azapeptides pourraient non seulement avoir une activité et une sélectivité accrues mais aussi une plus grande stabilité qui prolonge sa durée d'action et le rend plus résistant aux dégradations métaboliques. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés particulièrement au peptide sécréteur d'hormone de croissance 6 (GHRP-6, H-His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) qui est un hexapeptide synthétique possédant une affinité pour deux récepteurs distincts: les récepteurs de *growth hormone secretagogue receptor 1a* (GHS-R1a) et le récepteur *cluster of differentiation 36* (CD36). Une sélectivité envers le récepteur CD36 offre les possibilités de soigner des maladies d'ordre angiogénique, telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). De plus, le récepteur CD36 peut interagir avec un corécepteur *toll-like receptor 2* (TLR2) pour induire des réponses immunitaires innées.

En sachant que la présence d'un acide « aza » aminé avec un groupement aromatique sur sa chaîne latérale est primordiale pour augmenter sa sélectivité envers le récepteur CD36, les travaux effectués au cours de ma maîtrise qui seront détaillés dans cet ouvrage visent à développer une librairie d'analogues de [aza, Phe⁴]-GHRP-6, en vue d'étudier leur affinité pour le récepteur CD36, leur potentiel à moduler la quantité de monoxyde d'azote (*nitric oxide* (NO)) produite par les agonistes du TLR2 et enfin leurs propriétés angiogéniques.

En réponse à nos objectifs, une librairie de vingt-cinq azapeptides GHRP-6 a été synthétisée. Vingt-trois de ces analogues ont été synthétisés sur support solide et les deux autres en utilisant une approche qui combine la chimie en solution et sur support solide. Tous les analogues synthétisés ont été testés pour leur habileté à moduler la quantité de monoxyde d'azote (NO) produite par les agonistes du TLR2 dans les macrophages. Ensuite, quatorze de ces analogues ont été évalués pour leur affinité avec le récepteur CD36 et pour leurs propriétés angiogéniques. Cette approche a permis d'effectuer une étude de la relation structure-activité des azapeptides modulateurs du récepteur CD36, et aussi à identifier de nouveaux candidats pour le sondage biochimique et du potentiel thérapeutique de ce récepteur.

Mots-clés : Mimes peptidiques, azapeptides, *N*-alkylation régio-sélective, GHRP-6, récepteur CD36, *N*-alkylation, relation entre la structure et l'activité biologique.

Abstract

Aza-peptides are peptide mimics in which one or more carbon atoms in the α -position have been replaced by a nitrogen atom. This replacement increases the rigidity of the peptide structure and promotes β -turn conformation, which is associated with many biological activities. Compared to the parent peptide, aza-peptides may have increased activity and selectivity as well as greater stability, prolonged duration of action and resistance to metabolic degradation. Growth hormone releasing peptide 6 (GHRP-6, H-His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) is a synthetic hexapeptide possessing affinity for two different receptors: growth hormone secretagogue receptor 1a (GHS-R1a) and cluster of differentiation receptor 36 (CD36). Selective affinity to CD36 may have therapeutic potential for the treatment of disease by modulating angiogenesis. In addition, CD36 is co-expressed with the toll-like receptor 2 (TLR2) and implicated in innate immunity.

Bearing in mind that the presence of an "aza" amino acid having an aromatic group on his side chain is essential to increase the selectivity towards the CD36 receptor, the work carried out during my master degree has aimed to synthesize a library of [azaPhe⁴]-GHRP-6 analogues to study their affinity for CD36, their potential to modulate TLR2 agonist-induced nitric oxide production and finally their angiogenesis properties. A library of 25 aza-peptides was made. Twenty-three analogues were synthesized using a solid-phase approach and two analogs were made using a combination of solution and solid phase chemistry.

All twenty-five analogues were tested for their ability to modulate the amount of nitric oxide produced in macrophages after treatment with a TLR2 agonist. Subsequently, fourteen of

analogs were evaluated for their CD36 binding affinity and for their angiogenesis properties. This approach has provided fundamental knowledge of the structure activity relationships of azapeptide modulators of CD36 as well as novel candidates for probing the chemical biology and medicinal potential of this receptor.

Keywords: peptide mimes, azapeptides, regioselective *N*-alkylation, GHRP-6, receptor CD36, structure-activity relationships.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iv
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xii
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements	xviii
1. Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1. Les peptides et les protéines	2
1.2. Propriétés des peptides et peptidomimétiques	5
1.3. Le repliement β des peptides et des mimes peptidiques	9
1.4. Synthèse des peptides et des azapeptides.....	13
1.4.1. Synthèse des peptides	13
1.4.2. Synthèse des azapeptides	15
1.4.3 Synthèse des peptides aza-1,2,3-triazole-3-alanine.	22
1.5. Objectif du mémoire	25
Chapitre 2 : Influence de l'histidine-1 et de l'azaphénylalanine-4 GHRP6 sur l'affinité, les activités anti-inflammatoires et les propriétés antiangiogéniques du récepteur CD36	30
2. Mise en contexte du chapitre 2	31
2.1. La dégénérescence maculaire liée à l'âge.....	31
2.1.1. Définition.....	31
2.1.2. Développement de la maladie.....	32
2.1.3. Traitements disponibles et limitations	34

2.2.	Relation entre la dégénérescence maculaire liée à l'âge et le récepteur CD36.....	36
2.2.1.	Définition.....	36
2.2.2.	Le CD36 et la DMLA	38
2.3.	Analogues du ligand GHRP-6 et l'aza-GHRP-6.	39
2.3.1.	Les GHRP-6 et leurs potentiels thérapeutiques	39
2.3.2.	Propriétés des aza-GHRP-6.	41
2.4.	Description des tests biologiques utilisés pour évaluer la sélectivité au récepteur CD36 par rapport au récepteur GHS-R1a	42
2.4.1.	Le test de marquage par photo-affinité covalente compétitive du récepteur	42
2.4.2.	Le test de germination microvasculaire sur des explants choroïdiens de souris.....	47
2.4.3.	Le test de monoxyde d'azote (NO).....	49
2.5.	Problématique adressée dans l'article 1	50
3.	Article	52
	Contribution des auteurs	52
	Influences of Histidine-1 and Azaphenylalanine-4 on the Affinity, Anti-inflammatory and Antiangiogenic Activities of Azapeptide Cluster of Differentiation 36 Receptor Modulators.....	53
3.1.	ABSTRACT:	53
3.2.	INTRODUCTION	54
3.3.	RESULTS AND DISCUSSION.....	56
3.4.	CONCLUSION.....	69
	EXPERIMENTAL SECTION	70
3.5.	AUTHOR INFORMATION	83

3.6.	ACKNOWLEDGMENTS	85
3.7.	ABBREVIATIONS	85
3.8.	ASSOCIATED CONTENT:.....	85
4.	Perspectives et conclusion	86
4.1.	Perspectives	86
4.2.	Conclusion.	89
	Bibliographie	91
	Annexe 1: Partie expérimentale du chapitre 2	115
1)	3-(tert-Butyldimethylsilyloxy)benzylaldehyde 3.15 ¹⁸²	115
2)	Synthesis of aryl alcohol.....	116
3)	Representative synthesis of benzylbromide: ¹⁸²	118
4)	Benzhydrylidene-aza-4-ethoxyphenylalaninyl-D-phenylalanine <i>tert</i> -butyl ester (3.23) ⁷⁸ ...	120
5)	Representative protocol for deprotection of the semi-carbazone on solid support: aza-2,4,6-trifluorophenylalaninyl-D-phenylalaninyl-N ^ε -(Boc)lysine Rink amide resin (3.9n) ⁷⁶	125
6)	Representative acylation of aza-peptide Rink amide resin with Fmoc-Ala-OH: Fmoc-alaninyl-2,4,6-trifluorophenylalaninyl-D-phenylalaninyl-N ^ε -(Boc)lysine Rink amide resin (3.10n) ⁷⁶	126
I.	Caractérisation des données.....	127
1)	Azapeptides.....	127
II.	Spectres RMN.....	140
III.	Spectres LC-MS.....	156

Liste des figures

Figure 1.1 : Structure de la ghréline humaine et de rat (1.1) ^{3,4} et de la léptine en structure 3D (1.2).....	2
Figure 1.2 : Quelques médicaments anti-obésité disponibles sur le marché : l’Orlistat (1.3), ¹⁰ le Lorcaserin (1.4), ¹¹ le Qnexa (qui est la combinaison du Phentermine (1.5) et du Topiramte (1.6)). ¹² ...	3
Figure 1.3 : Peptides et protéines utilisés pour le traitement du diabète de type I : Insuline humaine (1.7) ¹⁵ et le metreléptine (1.8). ¹⁶	4
Figure 1.4 : Exemples de structures de peptides et de protéines.....	6
Figure 1.5 : Représentation des angles dièdres dans un peptide.....	7
Figure 1.6 : Différents peptidométiques dérivés des peptides naturels. ^{25,26}	9
Figure 1.7: Représentation d’un repliement β	10
Figure 1.8 : Structure de peptide et azapeptide. ⁴²	12
Figure 1.9: Structures du Zoladex et l’Atazanavir. ^{43,44}	13
Figure 1.10 : Structure de l’hexa peptide synthétique GHRP-6 et de ses analogues [azaF ⁴]-, [Ala ¹ , azaF ⁴]- et [azaY ⁴]-GHRP-6. ¹⁰⁶	27
Figure 2.1: La dégénérescence maculaire liée à l’âge (DMLA) ¹¹³	32
Figure 2.2: Cycle physiologique et potentiels lieux d’interventions pour lutter contre la DMLA. ¹¹³	33
Figure 2.3: Représentation schématique de la protéine CD36.....	37
Figure 2.4: Structures chimiques du met-enkephalin, GHRP-6, l’héxareline et l’EP80317. ^{118, 120, 121, 122}	39
Figure 2.5: Représentation de la courbe dose-réponse. ¹⁵⁸	46
Figure 2.6: Illustration du test de germination microvasculaire sur des explants choroïdiens de souris.	48
Figure 2.7: Production du NO induite par les interactions entre TLR2-TLR6 et le récepteur CD36.....	50
Figure 3.1 : Effects of [aza-F4]-GHRP-6 analogues on the overproduction of nitric oxide (NO) induced by the TLR-2 agonist R-FSL-1 in J774 (A) and RAW (B-D) macrophage cell line. *, P < 0.05; **, P < 0.01 and ***, P < 0.001 vs R-FSL-1 control	64

Figure 3.2 : Competition curves of [A1, aza-F4]-GHRP-6 analogs (3.1) for binding of photoactivable [125I]-Tyr-Bpa-Ala-hexarelin in rat cardiac membrane..... 65

Figure 3.3 : Competition binding curves of [aza-F⁴]-GHRP-6 analogs (3.2) for binding of photoactivable [¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexarelin in rat cardiac membrane. 66

Figure 3.4 : Angiogenic effects of CD36 ligands in mouse choroidal explant model..... 68

Liste des schémas

Schéma 1.1 : Stratégies générales utilisées pour synthétiser les azapeptides. ⁷⁰	16
Schéma 1.2 : Synthèse des peptides aza-glycines.....	19
Schéma 1.3 : Alkylation régiosélective du dipeptide benzhydrylidene glycine et aza-glycine en phase solide. ^{76,77}	20
Schéma 1.4 : Cycloaddition thermique de Huisgen. ^{91,92}	23
Schéma 1.5 : Mécanisme de synthèse des 1,2,3-triazole de type 1,4 catalysé par le cuivre (I). ⁹⁵	24
Schéma 1.6 : Stratégie développée pour synthétiser les [aza-1,2,3-triazole-3-alanine]-GHRP-6 analogues sur support solide. ⁹⁹	25
Schéma 1.7 : Résumé du mémoire : Stratégies utilisées pour synthétiser des analogues de l'aza-Phe ⁴ [GHRP-6].....	28
Schéma 2.1 : Iodation de l'héxareline. ^{152,132,153}	44
Schéma 2.2 : Synthèse du CD36-[¹²⁵ I]-Tyr-Bpa-Ala-hexareline par l'irradiation ultraviolet à environ 350 nm. ^{151,153,157}	45
Schéma 3.1: Synthesis of [A ¹ , azaF ⁴]-GHRP-6 and [azaF ⁴]-GHRP-6 analogs (3.1) and (3.2).....	57
Schéma 3.3 : Synthesis of [aza-1,2,3-triazole-3-alanine]-GHRP-6 (3.3)	62
Schéma 4.1 : Sensibilité des [aza(p-R)Y ⁴]-GHRP-6 au milieu acide.	87
Schéma 4.2 : Suggestion des analogues de l'azapeptide-GHRP-6 pour les futures études	88

Liste des tableaux

Tableau 1.1: Types de repliements β . ³⁰	10
Tableau 3.1: Purity, retention times and mass of [azaF4]-GHRP-6 analogues	60
Tableau 3.2: IC ₅₀ binding values for CD36 receptors and angiogenic activity of selected analogues....	67

Liste des abréviations

[α]	rotation spécifique [en (deg ml/ g dm)]
Å	Angstrom
Ac	acétyle
Ala	alanine
Ar	aryle
AzaXaa	acide « aza » aminé
BEMP	2-(<i>tert</i> -Butylimino)- <i>N,N</i> -diethyl-1,3-diméthyl-1,3,215-diazaphosphan-2-amine
Bn	benzyle
BOC	<i>tert</i> -butyloxycarbonyle
br	<i>broad</i>
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butyle
C	Concentration
°C	degré Celsius
Calcd	<i>calculated</i>
Cbz	benzyloxycarbonyle
CD	<i>circular dichroism</i>
CD36	<i>cluster of differentiation 36</i>
CDI	carbonyldiimidazole
δ	déplacement chimique en ppm
d	doublet
D	Debye
DCM	dichlorométhane
dd	doublet de doublet
Deg	degré

DIC	<i>N,N</i> -diisopropylcarbodiimide
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
ESI	<i>electrospray ionization</i>
Et	éthyle
FA	acide formique
Fmoc	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-R1a	<i>growth hormone secretagogue receptor 1a</i>
h	heure(s)
HATU	hexafluorophosphate d'hydroxy-azabenzotriazol-1-yle 1,1,3,3-tétraméthylaminium
HBTU	hexafluorophosphate d'hydroxy-benzotriazol-1-yle 1,1,3,3-tetra méthylaminium
His	histidine
HOBt	hydroxybenzotriazole
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
IC ₅₀	<i>Inhibitor concentration</i>
<i>J</i>	constante de couplage en Hz
kcal	kilocalorie
l, L	litre(s), liter(s)

LCMS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>
LDLox	lipoprotéines de basse densité oxydées
Lys	lysine
M	mole par litre
MB	Membrane Bruch
mM	millimole par litre
Me	méthyle
MHz	Mégahertz
Min	minute(s)
M	mole
mMol	millimole
m	multiplet
mp	<i>melting point</i>
MS	<i>mass spectrometry, molecular sieves</i>
nM	nanomolaire
NMM	<i>N</i> -méthylmorpholine
NMP	<i>N</i> -méthyl-2-pyrrolidone
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
oxLDL	<i>oxydized low-density lipoprotein</i>
PER	pigment épithélial de la rétine
Ph	phényle
Phe	phénylalanine
ppm	partie par million
Pr	propyle

<i>i</i> -Pr	<i>iso</i> -propyle
q	quadruplet
R _f	facteur de rétention (en chromatographie)
RMN	résonance magnétique nucléaire
RPE	<i>retinal pigment epithelium</i>
rt	room temperature
RT	<i>retention time</i>
RP	<i>reverse phase</i>
s	singulet
SAR	<i>Structure-Activity Relationship</i>
Ser	sérine
SPPS	<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>
t	triplet
T	température
TBDMS	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyl
TBTU	tétrafluoroborate de benzotriazol-1-yle 1,1,3,3-tétraméthyleaminium
TEA	triéthylamine
TES	triéthylsilane
TFA	acide trifluoroacétique
Theor	théorique
THF	tétrahydrofurane
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
TMS	tétraméthylsilane, triméthylsilyle
t.p	température pièce
t.r,	temps de rétention

Trp	tryptophane
Trt	triphénylméthyle
UV	Ultraviolet

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche le Professeur William David Lubell de m'avoir acceptée au sein de son équipe pour préparer ma maîtrise. Tu as été pour moi un grand soutien intellectuel et moral. Ta clairvoyance et ton optimisme ont été pour moi un encouragement inestimable. Je n'oublierai jamais cette phrase de toi « ce qu'on voit comme problème est en fait une opportunité ». Je me souviens de cette phrase à chaque fois qu'une synthèse chimique ne donne pas le produit attendu et au lieu de voir un problème je vois un nouveau défi qui pourrait être exploité à d'autres fins. Tu as toujours eu mon intérêt à cœur et pour cela je ne saurais comment te remercier assez.

Je remercie le Dr. Yésica Garcia-Ramos de m'avoir encadrée comme stagiaire à mes débuts au sein de l'équipe et d'avoir contribué à l'avancement de mes travaux de recherche. Au-delà de la recherche, tu es une personne toujours souriante et pleine de vie. Peu importe le stress et les frustrations qui peuvent parfois affecter la recherche, tu as toujours su garder la « Positive attitude ».

Je tiens également à remercier le Professeur Davit Zargarian de m'avoir offert mon premier stage à l'Université de Montréal. Je remercie également Berline Monga Soumé, étudiante en cycle de doctorat ès sciences, de m'avoir supervisée pendant cette période.

Je remercie nos collaborateurs, le Professeur Hug Ong et le Dr. Mukandila Mulumba du département de pharmacie, le professeur Sylvain Chemtob du département de pédiatrie de

l'Université de Montréal et le Dr. Samy Omri de la compagnie Mperia Therapeutics. Inc. pour leur contribution à ces travaux.

Je remercie mes collègues et amis Dr. Mariam Traoré, Dr. Jinqiang Zang, Dr. Carine Bourguet, Nagavenkata Durga Prasad Atmuri, Anh Minh Thao Nguyen, Fatemeh Mohammadpour, Ramesh Chingle et Azade Geran pour la bonne humeur apportée au laboratoire et vos conseils. J'ai toujours eu du plaisir à travailler en votre compagnie et plus d'une fois vous m'avez aidé à trouver une solution face aux difficultés rencontrées dans mon projet.

Merci à Antoine Douchez, Julien Poupart, Cynthia Crifar et Mohamed Atfani pour avoir révisé et apporté vos corrections lors de la rédaction de ce mémoire.

J'apprécie également l'ambiance chaleureuse qu'apportent tous les membres de l'équipe que j'ai eu à côtoyer. La définition réelle de l'esprit d'équipe qui règne au sein du groupe est une valeur que je garderais en moi toute ma vie.

Je remercie tout le personnel du centre régional de spectrométrie de masse de l'Université de Montréal pour leur soutien technique et toutes les analyses des spectres de masses. Je pense particulièrement à Dr. Alexandra Furtos-Matei, Marie-Christine Tang, Louiza Mahrouche et Simon Comtois-Marotte

Je remercie toute ma famille et amies pour leur soutien inconditionnel, pour la chaleur qu'elle m'a toujours apportée. Je pense particulièrement à mes parents, à tous mes frères et sœurs, à mon oncle tonton Évariste et son épouse Yolande, à tonton Jean, à ma sœur de cœur Caroline et son époux Éric, à Vigeline et Aïssatou.

Enfin mais pas le moindre, je remercie mon époux Yannick Armel pour son amour, son soutien physique et moral. Au-delà d'occuper une place spéciale dans ma vie et dans mon cœur, tu me connais tellement bien que, de fois, j'ai l'impression que tu lis dans mes pensées. Je t'aime et m'estime chanceuse de t'avoir dans ma vie.

A mes enfants Daniel et Gabriella

1. Chapitre 1 : Introduction

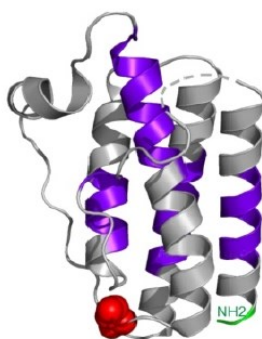
1.1. Les peptides et les protéines

Un peptide est une séquence d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons amide aussi appelées liaisons peptidiques. Les peptides sont souvent classés suivant le nombre d'acides aminés impliqués dans leur séquence. Ainsi, lorsque nous avons une séquence de 10 acides aminés ou moins, on parle d'oligopeptides, entre 11 et 50 acides aminés, nous avons des peptides et pour une séquence de plus de 50 acides aminés, nous avons des protéines.¹ Les protéines et les peptides sont des constituants vitaux du corps humain présents dans de nombreux processus physiologiques et biologiques.²

Humaine NH₂-Gly-Ser-ser(O-octonyl)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg-CO₂H

Rat NH₂-Gly-Ser-ser(O-octonyl)Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-Ala-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg-CO₂H

1.1 Ghréline



1.2 Léptine

Figure 1.1 : Structure de la ghréline humaine et de rat (1.1)^{3,4} et de la léptine en structure 3D (1.2).

(Image de la léptine provenant de Baig, M.; Tariq, S.; Tariq, S., Homocysteine and leptin in the pathogenesis of osteoporosis—evidences, conflicts and expectations. In *Advances in Osteoporosis*, InTech: 2015)⁵

Les peptides ont plusieurs propriétés thérapeutiques. Par exemple la ghréline (**1.1**)³ est un peptide *N*-acylé (**Figure 1.1**) qui stimule la libération de l'hormone de croissance et contrôle l'appétit. Il se trouve principalement dans l'estomac et a pour source secondaire les organes tels que les intestins, l'hypophyse, les reins, le placenta et l'hypothalamus. Les récepteurs de la ghréline sont situés dans diverses régions du cerveau.⁶

Une diminution de la quantité de ghréline (**1.1**) stimule l'appétit et par analogie, son augmentation crée la sensation de satiété.⁷ Pour contrebalancer les effets de la ghréline, la léptine (**1.2**) (qui est également une hormone peptidique impliquée dans le bilan énergétique) supprime l'apport alimentaire et favorise la perte de poids (**Figure 1.1**). Ainsi les personnes obèses sont résistantes à la léptine et leur niveau de ghréline est diminué.⁸ Cette découverte a conduit à la mise sur le marché de plusieurs médicaments anti-obésité incluant l'Orlistat, le Lorcaserin et le Qnexa qui est une combinaison de deux médicaments qui sont le Phentermine et le Topiramate (**Figure 1.2**). En plus de ces médicaments, une dizaine d'autres candidats se trouvent présentement en phase 2 et 3 d'étude clinique.⁹

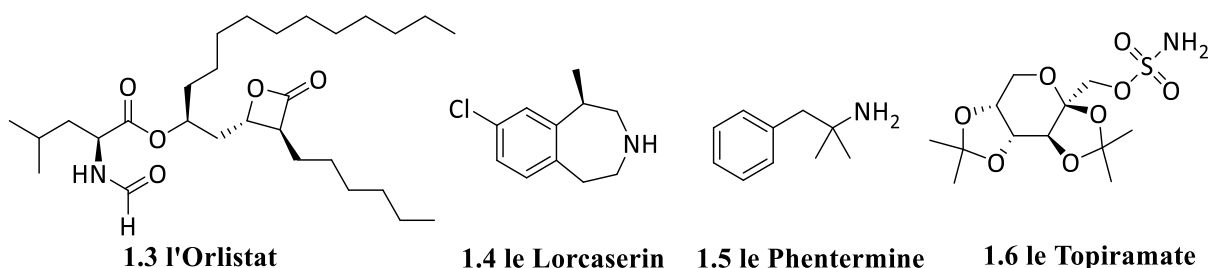


Figure 1.2 : Quelques médicaments anti-obésité disponibles sur le marché : l'Orlistat (**1.3**),¹⁰ le Lorcaserin (**1.4**),¹¹ le Qnexa (qui est la combinaison du Phentermine (**1.5**) et du Topiramate (**1.6**)).¹²

médicaments de base peptidique sur le marché et une centaine d'autres en étude préclinique et clinique.¹⁷

1.2. Propriétés des peptides et peptidomimétiques

Les peptides et les protéines sont organisés en quatre structures possibles qui sont la structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire (**Figure 1.4**).

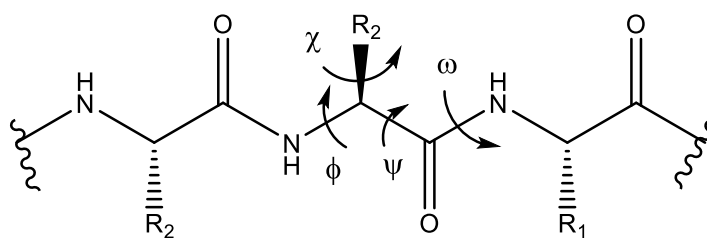
La structure primaire (**1.9**) est l'enchaînement d'acides aminés reliés entre eux par les liaisons amides et des ponts disulfures. Ils se représentent typiquement à gauche par une fonction amine et à droite une fonction carboxylique.^{18,19}

Lorsque les acides aminés d'une chaîne peptidique interagissent entre eux ou avec les acides aminés d'une autre chaîne polypeptidique à travers des ponts d'hydrogènes, le peptide ou la protéine forme une structure secondaire. Les structures secondaires peuvent avoir une conformation de type hélice α (**1.10**), l'hélice 3_{10} (**1.11**)¹⁸ similaire à l'hélice α , le feuillet β antiparallèle (**1.12**) ou parallèle (**1.13**) qui peuvent adopter un repliement du tour β du type I (**1.14**) ou du type II (**1.15**),^{19,20} et enfin, un tour γ , qui est soit normal (**1.16**), ou inverse (**1.17**).²¹

Lorsque différents éléments de structures secondaires (hélice α , feuillet β , tour β , etc.) se retrouvent regroupés, on parle de structure tertiaire. Enfin la structure quaternaire (**1.19**) se réfère à la façon dont les hélices α , les feuilles β et les tours γ se replient pour former plusieurs chaînes polypeptidiques ayant chacune sa propre structure tertiaire par des forces non covalentes telles que des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogènes et des interactions de Van der Waals.¹⁹

(Structure secondaire traduite de: Howland, J., Biochemistry: By D. Voet and JG Voet. *John Wiley and Sons: New York, Biochem. Educ* **1990**, *18*, 1223. Structure primaire, tertiaire et quaternaire provenant de : Férey, N.; Bouyer, G.; Martin, C.; Drif, A.; Bourdot, P.; Ammi, M.; Nelson, J.; Burkhardt, J.-M.; Autin, L. Docking de protéines en réalité virtuelle Une approche hybride et multimodale. *Technique et science informatiques* **2009**, *28* (8), 983-1015.)

L'activité biologique que peuvent avoir les peptides et protéines dépend énormément de leur structure tridimensionnelle et des interactions que les peptides exercent avec le récepteur ou l'accepteur.¹ Malgré l'importance des peptides dans de nombreux processus physiologiques, ils sont rapidement hydrolysés par des protéases et par conséquent ont un temps de vie court. De plus, les peptides ne peuvent pas généralement traverser les membranes cellulaires ou la barrière hémato-encéphalique à cause de leur nature polaire. Contrairement aux protéines qui sont généralement rigides, les peptides ont une flexibilité conformationnelle au niveau de leurs angles de torsions phi (ϕ) ($\text{HNC}_\alpha\text{C}_\beta$), psi (ψ) ($\text{NC}_\alpha\text{CN}$) et chi (χ) ($\text{NC}_\alpha\text{C}_\beta\text{R}_2$) des chaînes latérales ((1.20), **Figure 1.5**), ce qui peut engendrer des effets secondaires dus à leurs interactions avec plusieurs sous-types de récepteurs dans l'organisme.^{22,23}



1.20

Figure 1.5 : Représentation des angles dièdres dans un peptide.

La flexibilité des peptides influence négativement leur efficacité et réduit leur utilisation comme médicament. De plus, en se basant sur la relation entre la conformation et l'activité biologique, il a été démontré que la conformation qui favorise la liaison et celle qui favorise la traduction

des signaux d'une hormone ou d'un neurotransmetteur peuvent être différentes.²² Pour ce faire, plusieurs scientifiques se sont donné pour mission de synthétiser les mimes peptidiques pouvant adopter une structure secondaire spécifique (hélice α , feuillet β , tour γ , tour β , etc.) conduisant à une meilleure sélectivité, une plus grande stabilité et une meilleure bioactivité que le peptide parent. En effet, les structures secondaires sont contrôlées par leurs angles de torsions tels que ϕ , χ et ψ . L'angle ω est souvent *trans* (180°) à l'exception de la proline qui influence la conformation des peptides et leur permet d'adopter la configuration *cis* ou *trans*.²² Ainsi certains changements apportés aux peptides ou aux protéines naturels obligerait ces derniers à adopter une conformation particulière.

Dans l'optique de réduire les limitations liées à l'utilisation des peptides naturels, les modifications apportées aux peptides naturels ont conduit à la synthèse de plusieurs catégories de mimes peptidiques ou peptidomimétiques (**Figure 1.6**). Les peptidomimétiques (mimes peptidiques) sont des composés dont les éléments essentiels (pharmacophore) qui miment la conformation en 3 dimensions (3D) d'un peptide naturel ou d'une protéine tout en conservant sa capacité d'interagir avec la cible biologique et produisent le même effet biologique.²⁴

Nous pouvons souligner des transformations telles que l'alkylation de l'azote en position α (**1.21**), la substitution du carbone α de l'un des acides aminés dans la séquence peptidique (**1.22**), la cyclisation de la chaîne linéaire des peptides (**1.23**), le remplacement de l'azote α par l'oxygène ou le soufre (**1.24**), le remplacement de la fonction carboxylique par d'autres groupements fonctionnels (le thioamide (**1.25**), l'oxyde de phosphine (**1.26**), et l'acide boronique (**1.27**)), la génération des hétérocycles (**1.28**), la synthèse des lactames de Freidinger (**1.29**), le remplacement du carbone α (**1.30**) par d'autres éléments tel que l'oxygène, le soufre (S) ou l'azote (N) et enfin l'extension du squelette peptidique (**1.31**).²⁵

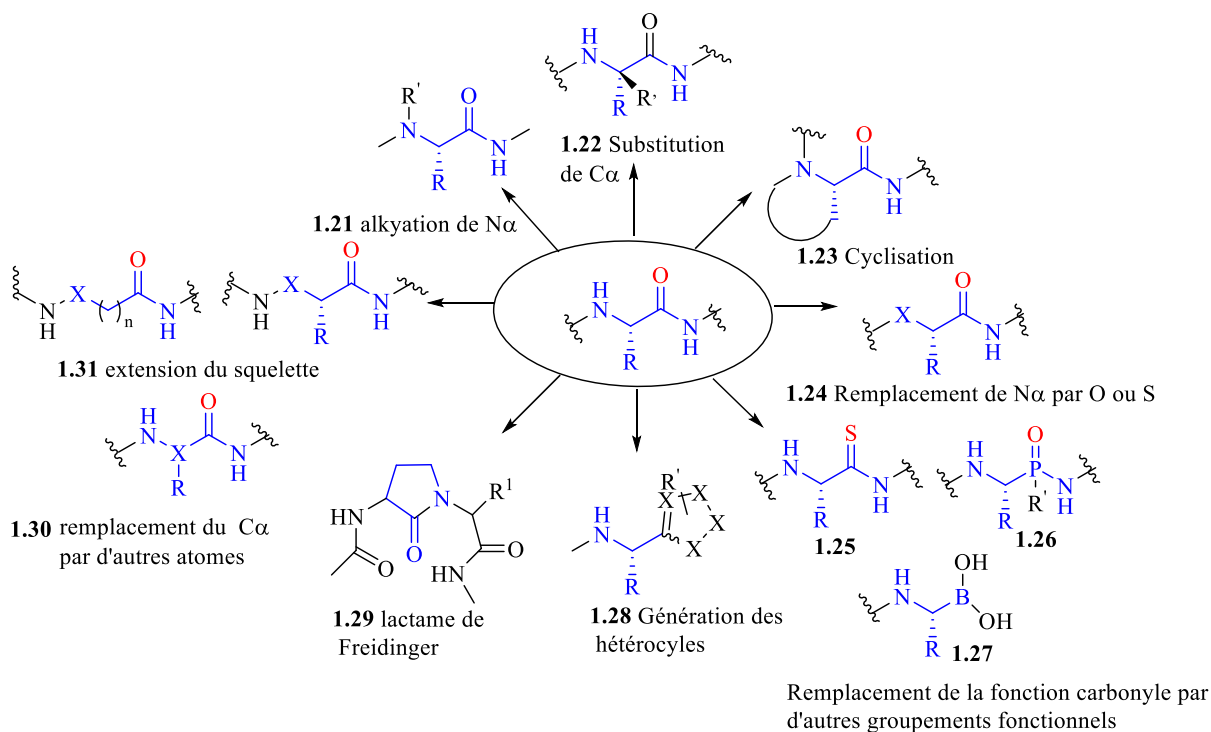


Figure 1.6 : Différents peptidométiques dérivés des peptides naturels.^{25,26}

1.3. Le repliement β des peptides et des mimes peptidiques

La structure des peptides et protéines est composée par une variété d'éléments de structure secondaire. Parmi ces structures, le repliement β (1.31) représente en moyenne 25% de tous les éléments de structures secondaires des protéines.²⁷ Les repliements β sont largement impliqués dans plusieurs processus biologiques.²⁸ Ils sont considérés comme étant les initiateurs des repliements que peuvent adopter les polypeptides et les protéines ceci en orientant les hélices α et les brins β .²⁹ De plus, le repliement β facilite la reconnaissance du peptide par des récepteurs en positionnant les chaînes latérales des carbones α ($C\alpha$) de telle sorte qu'elles soient reconnues stériquement et électroniquement par des récepteurs.²⁷ Grâce à toutes ces propriétés, les

repliements du type β (**Tableau 1.1**) sont impliqués dans de nombreuses interactions hormones-récepteurs et protéines-protéines qui constituent la clé des activités biologiques dans des mécanismes immunologiques, métaboliques, génomiques et endocrinologiques.²⁸

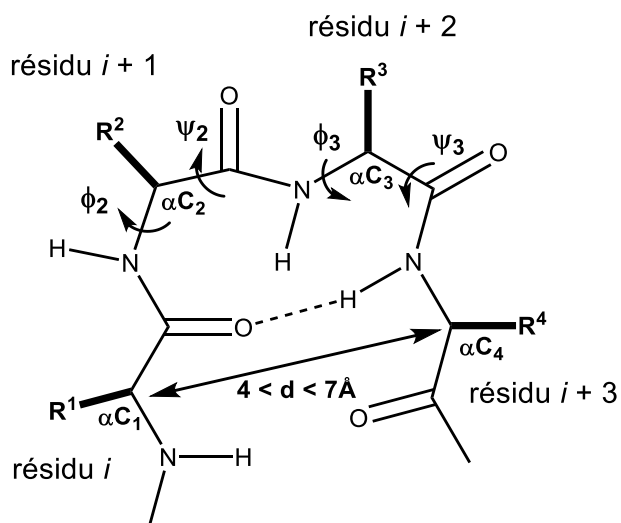


Figure 1.7: Représentation d'un repliement β

Types de repliement β	ϕ^{i+1}	ψ^{i+1}	ϕ^{i+1}	ψ^{i+2}
βI	-60	-30	-90	0
$\beta I'$	60	30	90	0
βII	-60	120	80	0
$\beta II'$	60	-120	-80	0
βIII	-60	-30	-60	-30
$\beta III'$	60	30	60	30
βVI	-60	120	-90	0
$\beta VI'$	-120	120	-60	150

Tableau 1.1: Types de repliements β .³⁰

En fait, les repliements β sont formés par quatre acides aminés et sont classés suivant les angles de torsions du second ($i+1$) et du troisième résidu ($i+2$) de la séquence peptidique (**Figure 1.7**). De plus, un pont hydrogène entre l'oxygène du carbonyle du premier résidu (i) et l'hydrogène de l'amide du troisième résidu peut potentiellement se former. Dans le repliement β , les carbones α des résidus i et $i+4$ sont séparés l'un de l'autre par une distance se situant entre 4 et 7 Å.³¹

Ainsi plusieurs modifications ont été apportées aux peptides naturels pour synthétiser des mimes peptidiques capables d'adopter un repliement β et avoir une plus grande stabilité. La substitution d'un ou plusieurs atomes de carbone en position α par l'atome d'azote pour former les azapeptides,^{32,30,33} l'incorporation des benzodiazepines,³³ spiro lactames,³⁴ azabicycloacanes,^{35,36,37,38} lactames de Freidinger^{26,39} et la proline dans la structure peptidique⁴⁰ constituent quelques exemples de modification induisant le repliement du type β .

Les azapeptides (**Figure 1.8**) sont formés en remplaçant le carbone α ($C\alpha$) d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence peptidique (**1.33**) par un atome d'azote (**1.34**).⁴¹ Ce remplacement de la liaison flexible $C\alpha-C(O)$ par une liaison rigide $N\alpha-C(O)$ occasionne une modification des propriétés chimiques et pharmacologiques par rapport au peptide parent.⁴² En effet, l'électrophilie du carbonyle est diminuée par la présence d'un résidu « aza ».⁴³ La répulsion électronique des paires isolées des deux azotes adjacents et la structure planaire de la fonction urée restreignent respectivement les mouvements autour des angles dièdres ϕ et ψ , en obligeant le peptide à adopter un repliement de β de type I, II, ou VI (**Tableau 1.1**).^{44,45} Cette prédiction a été validée par des études spectroscopiques, cristallographiques, infra-rouge et par résonance magnétique nucléaire.⁴²

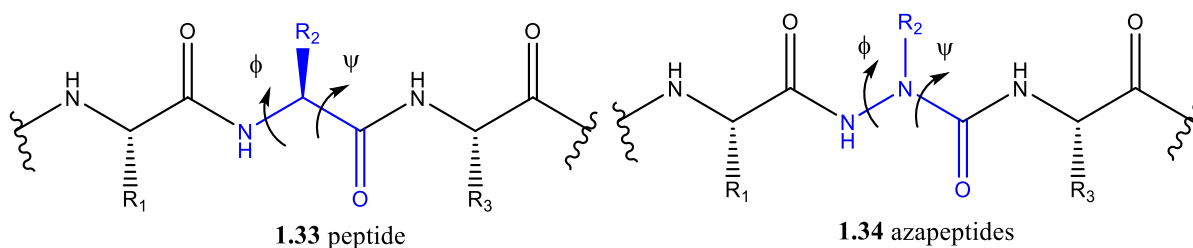


Figure 1.8 : Structure de peptide et azapeptide.⁴²

En plus d'être moins flexibles que les peptides parents, les azapeptides ont une plus grande durée d'action grâce à l'urée qui est plus difficile à cliver, comparativement à la fonction amide. Les azapeptides pourraient avoir également une plus grande sélectivité et résistance à l'hydrolyse enzymatique.⁴⁶ A cet effet, les azapeptides sont très souvent utilisés comme inhibiteurs de la protéase à sérine et cystéine. Ces protéases sont associées à la progression des maladies humaines infectieuses et malignes.⁴⁶ Cette grande famille d'enzymes emploie la cystéine et la sérine comme leur site nucléophile actif (respectivement le thiol et l'alcool) pour hydrolyser la liaison peptidique.⁴⁷ C'est ainsi que les protéases à sérine, telles la chymotrypsine et la trypsine jouent un rôle important dans la digestion des peptides et des protéines afin de réguler la fonction protéique de divers organismes.⁴⁸ Ces propriétés ont conduit au développement des thérapies contre certaines maladies, telles que les neutrophiles humains,⁴⁹ l'hépatite C⁵⁰ et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).⁵¹ Le Zoladex (**1.35**) qui est utilisé pour le traitement du cancer du sein et la prostate,⁴⁸ l'Atazanavir (**1.36**) est utilisé pour le traitement de la protéase du VIH (**Figure 1.9**).⁴⁷ En plus de ces exemples, d'autres azapeptides sont en études précliniques et cliniques pour le traitement des maladies telles que la DMLA, l'athérosclérose, et le diabète.³¹

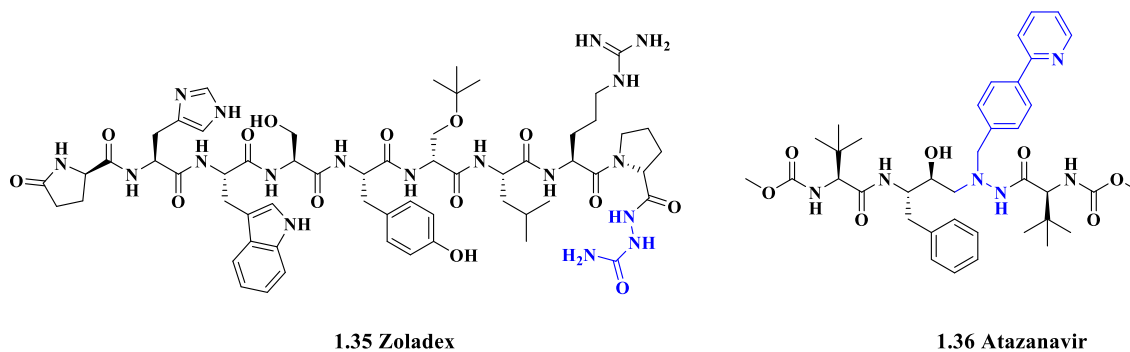


Figure 1.9: Structures du Zoladex et l'Atazanavir.^{43, 44}

1.4. Synthèse des peptides et des azapetides

1.4.1. Synthèse des peptides

En 1881, Curtius a synthétisé le benzoylglycylglycine, le premier dipeptide protégé, en traitant la glycine avec le chlorure de benzoyle.⁵² Le dipeptide glycylglycine a été publié 20 ans plus tard par Emil Fischer et Fourneau.⁵³ Lors de la 14^{ème} réunion des scientifiques et médecins allemands tenue à Karlsbad, Emil Fischer fut le premier à employer le terme dipeptide. Grâce à ses travaux, il reçut le prix Nobel en 1902. Il est à cet effet considéré comme étant le père fondateur de la synthèse peptidique.⁵⁴ Par la suite, l'idée d'utiliser les groupements protecteurs temporaires pour augmenter la sélectivité et faciliter la synthèse peptidique est née. Ainsi, en 1931, Bergmann et Zervas ont utilisé le groupe carboxybenzyle (Cbz),^{54,55} et le groupe *tert*-butyloxycarbonyle (Boc) en 1957 par Carpino, McKay et Albertson comme groupe protecteur.^{54,55,56,57}

En 1963, Merifield a introduit la synthèse sur support solide qui a complètement révolutionné la synthèse des peptides et des protéines. En effet, cette nouvelle stratégie lui a permis de

synthétiser un peptide en se servant d'un support solide à base de polystyrène et des acides aminés dont le côté *N*-terminale était protégé par le Cbz.⁵⁴

Cependant, cette méthode développée par Merrifield se limitait uniquement aux couplages des acides aminés qui ne possédaient pas de groupements fonctionnels sur leur chaîne latérale, puisqu'il utilisait un seul groupement protecteur. Il fut donc nécessaire d'imaginer la protection « orthogonale » qui permet de gérer différents groupements fonctionnels sur le même peptide.⁵⁸

La notion de protection orthogonale était déjà appliquée dans les synthèses peptidiques avant d'être appelée ainsi en 1977 par Barany *et al.*^{59, 60} En 1970, Pietta et Marshall ont synthétisé des acides aminés en protégeant différemment la fonction amine, acide carboxylique et la chaîne latérale des acides aminés avec des groupements protecteurs tels que le Boc, le paraméthoxybenzyle (Pmb) et le Cbz qui se déprotègent en milieu acide fort (comme par exemple l'acide trifluoracétique (TFA) et le chlorure d'hydrogène (HCl)), en présence de la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) ou par hydrogénéation.^{58,61} En plus d'introduire de nouvelles stratégies de protection des acides aminés, Pietta et Marshall ont synthétisé la résine benzhydrylamine (BHA), qui leur a permis de réaliser par la suite la synthèse automatisée d'un peptide.⁶¹

Malgré ces exploits dans la synthèse peptidique, il était nécessaire de développer des groupements protecteurs qui se clivent dans des conditions plus douces que ceux énumérés plus haut. Ainsi, en 1970, Carpino et Han ont synthétisé le fluorenylméthoxycarbonyle (Fmoc) comme groupement protecteur des amines en position alpha, clivable dans des conditions très douces.⁶² Cette nouvelle méthode de protection a apporté une grande amélioration à la synthèse peptidique. Il était dorénavant possible de synthétiser plus efficacement, et en peu de temps, de

chaînes peptidiques très longues. Après Merrifield, Pietta et Marshall, plusieurs autres chercheurs ont synthétisé d'autres types de résines. Nous pouvons citer par exemple la synthèse de la résine de Wang en 1973,⁶³ la résine de *para*-méthylbenzhydramine par Matsueda et Stewart en 1981,⁶⁴ la résine de Rink⁶⁵ et de Sieber en 1987.⁶⁶ Grâce à cette révolution, la synthèse des peptides et des mimes peptidiques a pris de l'ampleur en utilisant la synthèse en solution, sur support solide ou la combinaison des deux techniques.⁶⁷

1.4.2. Synthèse des azapeptides

Le premier azapeptide biologiquement actif a été synthétisé en 1963 par Hess et ses collègues.⁶⁸ Cet azapeptide s'est avéré être moins puissant, mais plus stable que le peptide naturel parent de l'angiotensine II.⁶⁸ Après Hess, le premier peptide uniquement constitué d'acides aza-aminés fut synthétisé en 1995 par Gante.⁶⁹ Successivement, plusieurs groupes de recherche se sont successivement intéressés à la synthèse des azapeptides.

Toutes les stratégies utilisées pour synthétiser les azapeptides sont des combinaisons de la chimie de l'hydrazine et la chimie des peptides. En effet, toutes ces stratégies visent à remplacer le C α par N α pour former le semi-carbamide.⁴¹ Ainsi, deux approches globales (consistant à synthétiser le peptide de l'extrémité *N*-terminale à l'extrémité C-terminale et de l'extrémité C-terminale à l'extrémité *N*-terminale) ont été explorées pour réaliser la synthèse (**Schéma 1.1**)

l'azapeptide désiré **(1.41)**. Bien que cette approche donne le produit désiré, le rendement de la réaction n'est pas toujours élevé à cause des produits secondaires formés au cours de la réaction. Par exemple, en faisant réagir le *tert*-butyl carbazate ou le fluorenylmethyl carbazate avec le phosgène ou du 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI), on peut former l'aza-glycine activé **(1.39)** instable (car le chlore du phosgène ou l'imidazole du CDI sont des très bons groupements partants) et peut donc subir une réaction de cyclisation intramoléculaire pour donner l'oxadiazoline **(1.42)**.⁷¹ De plus, en optant plutôt pour l'utilisation de la benzophénone hydrazone et du phosgène (ou autres équivalents du phosgène tel que le triphosgène ou CDI) **(1.38)** comme précurseur du carbonyle, nous courons le risque de former en plus de l'aza-glycine activé une urée symétrique **(1.43)** si jamais la benzophénone hydrazone n'est pas complètement consommée.^{72,73}

L'autre stratégie consiste à coupler la fonction amine d'un acide aminé ou d'un peptide **(1.40)** avec un donneur de carbonyle **(1.38)** (le phosgène ou son équivalent) pour former l'isocyanate **(1.45)** ou le carbamate activé **(1.44)** qui réagit ensuite avec l'hydrazine, l'hydrazide ou l'hydrazone **(37)** pour former le produit désiré. Cette méthode peut s'avérer être problématique pour les réactions effectuées sur un peptide ayant une fonction amide car après la formation de l'isocyanure **(1.45)** ou du carbamate activé **(1.44)**, l'azote de l'amide en position C-terminale du dernier acide aminé peut faire une cyclisation intramoléculaire pour donner l'hydantoin **(1.46)**.^{46,74,75}

Il faut également noter que, dans ces méthodes traditionnelles, des variétés de *N*-alkyle carbazates sont généralement synthétisées par condensation du carbazate avec un aldéhyde ou une cétone appropriée, suivi d'une réduction en utilisant, soit l'hydrogénation catalytique, soit

l'addition d'un hydrure comme le cyanoborohydrure de sodium. Les rendements des deux étapes de réactions sont généralement élevés.⁴² Cependant, la synthèse de *N*-alkyle carbazates en solution demande beaucoup d'efforts, particulièrement lors du couplage du résidu aza à la chaîne peptidique.

Face aux limitations des méthodes traditionnelles, il est évident que le choix du groupement partant est primordial pour limiter les risques de former des produits secondaires. Ainsi, Bourguet et *al.* ont développé une stratégie de synthèse qui consiste à faire réagir la benzophénone hydrazone (**1.47**) avec le 4-nitrophényle chloroformate (**1.48**) pour former le diphénylméthylidene carbazate (**1.50**) qui est stable comparativement aux intermédiaires formés à partir de phosgène ou de triphosgène. L'intermédiaire (**1.50**) peut être couplé à différents types d'acides aminés ou de peptides (**Schéma 1.2**).^{72, 73} De plus cette méthodologie appliquée sur support solide donne d'excellents rendements.^{76,77} Cependant, lors de la synthèse du peptide benzhydrylidene aza-glycine, le rendement de la réaction est réduit par la formation de l'urée symétrique (**1.43**) (**Schéma 1.1**).⁷⁰ Ainsi, Garcia-Ramos et *al.* ont remplacé le 4-nitrophényle chloroformate par le *N,N'*-disuccinimidyle carbonate (DSC) (**1.49**) pour augmenter les rendements des synthèses des peptides aza-glycine en solution et sur support solide.^{70,78} La seule exception est la réaction avec la proline qui donne un meilleur rendement en utilisant le *para*-nitrophénylchloroformate comme précurseur de carbonyle.⁷⁷⁻⁷⁸

En utilisant les stratégies optimisées par Bourguet et Garcia-Ramos, il est dorénavant possible de synthétiser différentes sortes de peptide aza-glycine protégées (**Schéma 1.2**).

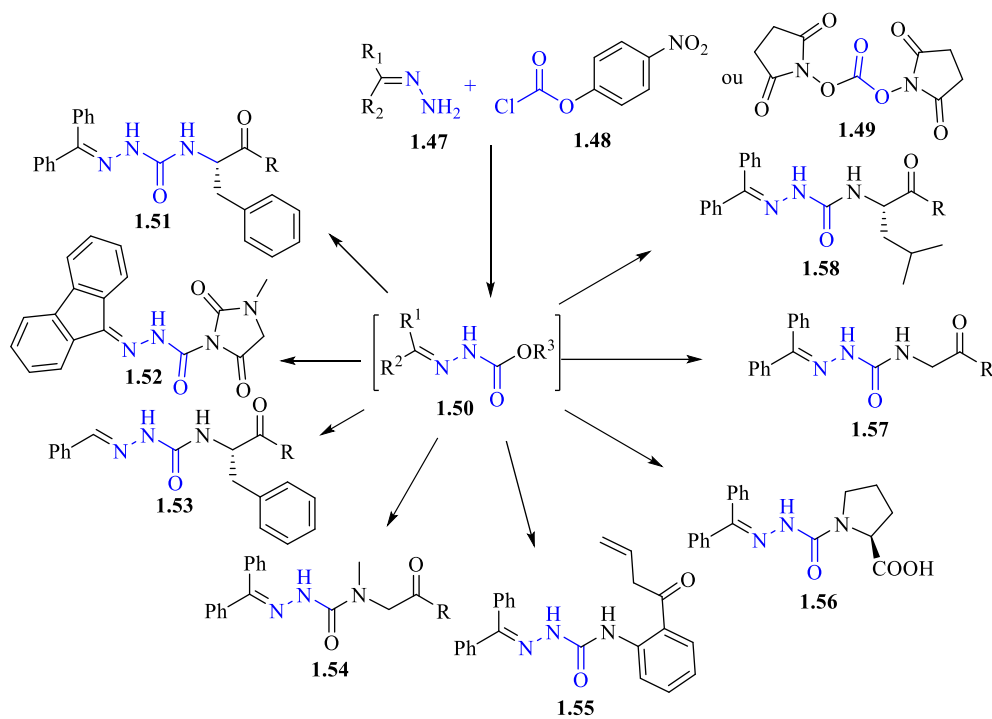


Schéma 1.2 : Synthèse des peptides aza-glycines.

Ces analogues ont été synthétisés en utilisant d'une part le 4-nitrophényle chloroformate (**1.48**) pour obtenir les composés (**1.51**)⁷², (**1.52**)^{79,80}, (**1.54**)⁸¹, (**1.55**)⁸², (**1.56**)⁷², (**1.57**)⁷² et (**1.58**)⁷². D'autre part, le *N,N'*-disuccinimidyle carbonate (**1.49**)⁷⁰ a été utilisé comme précurseur de carbonyle pour obtenir les composés (**1.51**)⁷⁰ et (**1.53**)⁷⁰.

L'azote α des aza-glycines protégées peut être alkylé régiosélectivement afin d'obtenir des différents analogues azapeptides qui permettraient d'étudier la relation entre leur structure et leur activité biologique. Pour cela, ils se sont inspirés de l'alkylation sélective du carbone α des acides aminés développé par O'Donnell *et al.*,^{83,84} Sabatino *et al.* ont développé une stratégie de synthèse sur support solide permettant d'alkyler l'azote α de la fonction urée du peptide aza-glycine (**Schéma 1.3**).^{76,77}

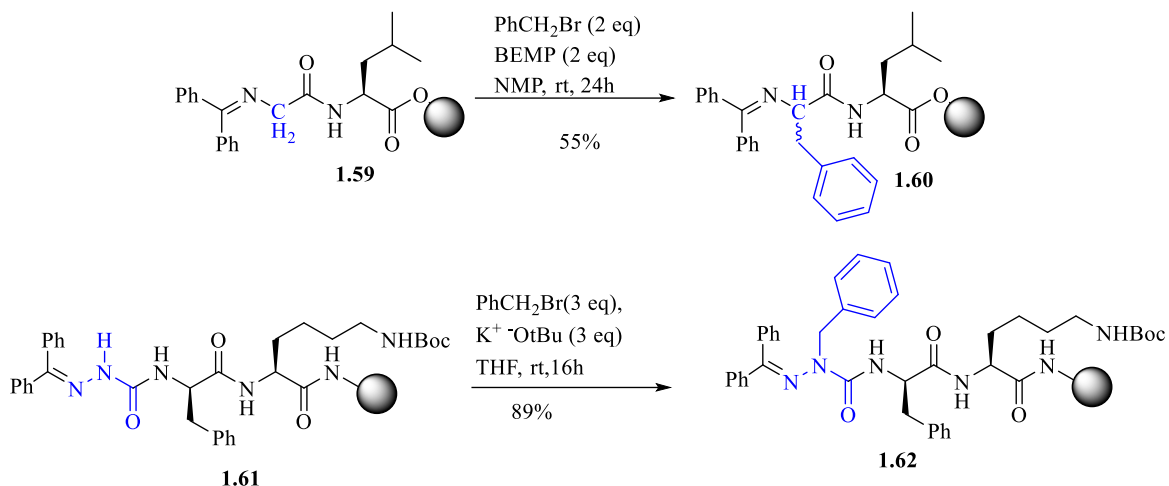


Schéma 1.3 : Alkylation régiosélective du dipeptide benzhydrylidène glycine et aza-glycine en phase solide.^{76,77}

O'Donnell *et al.* ont essayé infructueusement d'effectuer l'alkylation du bromure de benzyle au benzhydrylidène glycine (**1.59**) en utilisant un mélange fondu de bases : d'hydroxyde de potassium et de carbonate de potassium (KOH / K_2CO_3). Ils ont par la suite opté pour l'utilisation des bases beaucoup plus fortes telles un phosphazène (le 2-*tert*-butylimino-2-diéthylamino-1,3-diméthylperhydro-1,3,2-diazaphosphorine (BEMP), ou le 1-*tert*-butyl-4,4,4-tris(diméthylamino)-2,2-bis [tris(diméthylamino)-phosphoranylidénamino] - $2\lambda^5$, $4\lambda^5$ -catenadi (phosphazène) (P4-t-Bu)), a permis d'obtenir les produits désirés avec des rendements variant de 37 à 55%. Cependant, en laissant la réaction plus longtemps dans le but d'améliorer les rendements, ils ont noté une racémisation des produits désirés.⁸⁴

L'alkylation régiosélective de plus longs peptides benzhydrylidène aza-glycine ((**1.61**), Schéma 1.3) en phase solide a été rendue possible grâce à l'acidité de l'azote du semi-carbazone, par rapport aux protons des autres groupements fonctionnels tels que le carbamate, l'urée et l'amide du benzhydrylidène aza-glycine.⁷⁶ En utilisant des bases comme le *tert*-butoxyde de potassium

ou *tert*-butylaminotri(pyrrolidino) de phosphorane qui sont des bases plus douces que celles utilisées par O'Donnell *et al.*, l'alkylation sur support solide a donné les produits désirés avec de meilleurs rendements.^{77,84} Cette stratégie a également été employée en solution avec également de bons rendements.^{81,85} Cependant, en solution, la racémisation a été détectée lors de l'alkylation de l'ester aza-Gly-Phe-O-*t*-Bu à cause de l'énolisation compétitive de l'ester.^{85,73} Pour éviter cela, les auteurs ont démontré que l'hydroxyde du tétraéthylammonium aqueux (40% Et₄NOH dans H₂O) était une base assez douce et efficace pour cette réaction donnant des rendements similaires à ceux obtenus lors de l'utilisation du *tert*-butoxyde de potassium.^{70,85} L'utilisation de cette stratégie sur support solide a donné des résultats moyens à excellents, dépendamment des halogénures d'alkyle utilisés.^{86, 87} De plus, en réalisant la synthèse en utilisant des microondes, l'alkylation des halogénures d'alkyle sur le benzhydrylidène aza-glycine protégé dans 40% Et₄NOH dans H₂O a donné les produits désirés avec des rendements au-delà de 80%, sans aucune trace de racémisation.⁷⁰

Après l'obtention du peptide benzhydrylidène aza-glycine alkylé, la semicarbazone peut être sélectivement déprotégée en utilisant les conditions de trans-iminations, tel que l'utilisation de l'hydroxylamine hydrochlorique dans la pyridine chauffée à 60°C, pour donner les semicarbazides correspondants.⁷⁶ Une autre stratégie largement employée en solution nécessite l'utilisation du HCl en milieux aqueux. Cette méthodologie donne d'excellents résultats, cependant, elle est uniquement utilisée pour déprotéger les semi-carbazones qui ne possèdent pas d'autres groupements sensibles au milieu acide.⁷²

L'allongement de la séquence de l'azapeptide par acylation du semicarbazide est plus difficile à cause de la diminution de la réactivité du résidu aza en comparaison à l'acide aminé naturel.

Pour résoudre ce problème, plusieurs stratégies de couplage ont été développées en solution et en phase solide. Par exemple, le couplage du semi carbazide à l'acide aminé désiré préalablement activé avec le *N,N'*- diisopropyle carbodiimide (DIC) s'est montré efficace.³² En effet, cette méthode consiste à synthétiser in-situ l'anhydride de l'acide aminé, avant de le transférer dans le semi-carbazide couplé à la résine pour former l'azapeptide désiré.^{76,88}

Successivement, la séquence de l'azapeptide peut ensuite être allongée en utilisant l'une des techniques de couplages peptidiques standards (hexafluorophosphate d'hydroxy-benzotriazol-1-yle 1,1,3,3-tétraméthylamminium / diisopropyle éthyle amine (HBTU/DIEA); hexafluorophosphate d'hydroxy-azabenzotriazol-1-yle 1,1,3,3-tétraméthylamminium / hydroxybenzotriazole / diisopropyle éthyle amine (HAUT / HOAt / DIEA), etc.).⁸⁹ Ainsi, ces méthodes optimisées ont été utilisées pour la synthèse des bibliothèques d'azapeptides avec des rendements globaux atteignant 50%.^{76,78}

1.4.3 Synthèse des peptides aza-1,2,3-triazole-3-alanine.

Le 1,2,3-triazole est une fonction qui a prouvé son importance dans plusieurs domaines.⁹⁰ L'introduction de la fonction 1,2,3-triazole dans la structure peptidique a permis d'améliorer les propriétés physico-chimiques et d'augmenter la stabilité métabolique des peptides.⁹¹ De nos jours, plusieurs dérivés du 1,2,3-triazole bioactif ont été synthétisés pour les applications variées telles que l'inhibition de la protéase du VIH,⁹² pour développer des médicaments contre le cancer⁹³ et la maladie d'Alzheimer.⁹³

En effet, les 1,2,3-triazoles sont connus depuis très longtemps comme étant un mélange de régioisomères 1,4 (**1.65**) et 1,5 (**1.66**) formés thermiquement par une cycloaddition thermique de Huisgen de type 1,3 entre des alcynes terminaux et des azotures (**Schéma 1.4**).

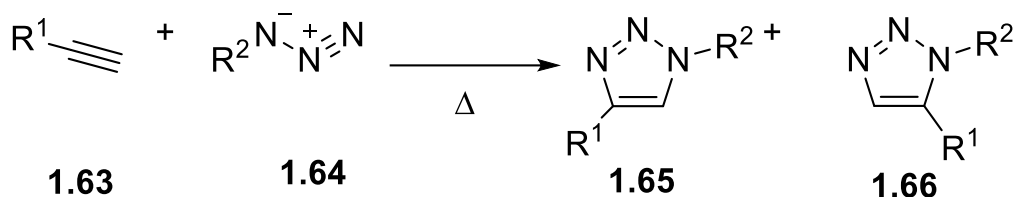


Schéma 1.4 : Cycloaddition thermique de Huisgen.^{91,92}

Grâce à l'utilisation des catalyseurs à base du cuivre (I),^{94, 95} plusieurs groupes de recherche ont pu synthétiser sélectivement la forme 1,4 disubstituée des 1,2,3-triazoles. La forme 1,5 disubstituée est synthétisée régio-sélectivement par les catalyseurs basés sur le ruthénium(II).^{96,97,98} Dans le mécanisme de cycloaddition 1,3 d'azoture-alkyne catalysée par un complexe cuivreux (**Schéma 1.5**),⁹⁴ le complexe de cuivre (I) (**1.67**), forme premièrement une liaison dative avec la triple liaison de l'alkyne (**1.68**). Par la suite, le proton de l'acyle (**1.69**) est substitué par un autre complexe de cuivre (I) (**1.67**) présent dans le milieu pour former l'acétylure de cuivre (**1.70**). L'azote le plus nucléophile de l'azoture (**1.71**) forme une liaison covalente avec le complexe d'acétylure de cuivre (**1.70**) suivi d'une cyclisation intramoléculaire pour former le complexe (**1.73**). La formation du produit désiré (**1.75**) et la libération du catalyseur se réalise par protonolyse.

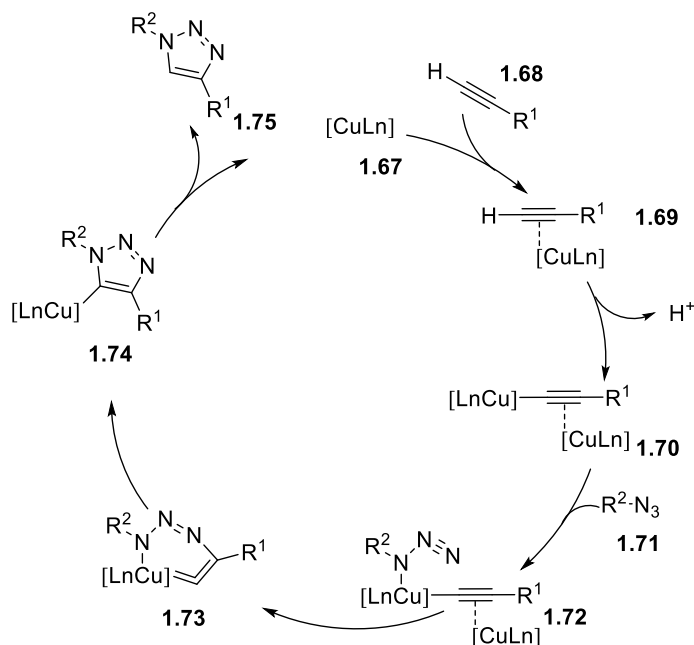


Schéma 1.5 : Mécanisme de synthèse des 1,2,3-triazole de type 1,4 catalysé par le cuivre (I).⁹⁵

En tenant compte de l'importance thérapeutique des triazoles et des azapeptides, Dr. Caroline Proulx a investigué la synthèse et les propriétés des [aza-1,2,3-triazole-3-alanine]-GHRP-6 comme potentiel modulateur du récepteur CD36.⁹⁹ En s'inspirant de la synthèse des oléfines 1,2-dihétérocycliques substituées (E) effectuée sur support solide,¹⁰⁰ elle a synthétisé une librairie de sept [aza-1,2,3-triazole-3-alanine]-GHRP-6 analogues (**1.77**) (**Schéma 1.6**). En effet, après avoir synthétisé le peptide de l'aza-propargyle glycine (**1.76**), en une seule étape, l'iodure d'aryle est converti en azoture d'aryle par l'azoture de sodium en présence de l'iodure de cuivre et la proline.¹⁰¹ L'alcyne à son tour est activé en douceur par le cuivre pour réagir avec l'azoture d'aryle formé dans le milieu à travers une cycloaddition..^{100,101} Les peptides aza-1,2,3-triazole-3-alanine obtenus ont été allongés et déprotégés en suivant les stratégies précédemment développées pour la synthèse des azapeptides.^{76, 100} Cependant, ces études effectuées par Dr. Proulx concernaient les [aza-1,2,3-triazole-3-alanine] substitués uniquement

par un groupement aryle. Pour ce faire, nous avons décidé d'explorer également la synthèses et l'activité biologique de l'analogue non substitué de [aza-1,2,3-triazole-3-alanine]-GHRP-6. Étant donné que le 1,2,3-triazole de l'[aza-1,2,3-triazole-3-alanine]-GHRP-6 est un analogue de l'imidazole, ce dernier pourrait former des ponts d'hydrogène avec le récepteur et apporter d'autres propriétés pharmacologiques liées à son analogie avec l'histidine.¹⁰²

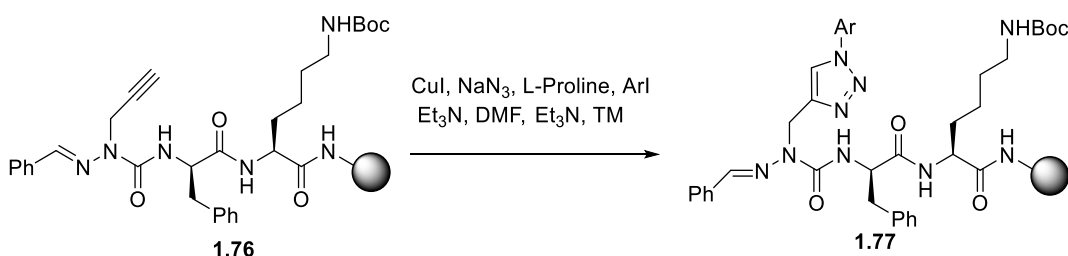


Schéma 1.6 : Stratégie développée pour synthétiser les [aza-1,2,3-triazole-3-alanine]-GHRP-6 analogues sur support solide.⁹⁹

1.5. Objectif du mémoire

Le récepteur CD36 (CD36) est une glycoprotéine exprimée dans la membrane de diverses cellules, y compris les globules rouges et les macrophages.^{103,104} Il appartient à la classe B des récepteurs éboueurs « scavenger » et agit en liant des ligands endogènes, des lipoprotéines à basse densité oxydées (LDLox) ou la thrombospondine.¹⁰⁵ De plus, le récepteur CD36 est coexprimé avec le complexe *toll like receptor 2-toll like receptor 6* (TLR-2 -TLR-6) qui joue un rôle significatif dans l'immunité innée. Le CD36 est une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement de diverses anomalies, notamment l'athérosclérose, l'angiogenèse rétinienne, la dégénérescence maculaire liée à l'âge et le diabète.¹⁰⁶

Le GHRP-6 (H-His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) est un ligand qui présente une affinité pour le récepteur CD36 et les récepteurs de *growth hormone secretagogue receptor 1a* (GHS-R1a).^{106,107} Afin d'accroître la sélectivité du GHRP-6 au récepteur CD36 (en vue de traiter les maladies d'ordre angiogénique telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)), les études effectuées précédemment ont démontré que les analogues azapeptides du ligand GHRP-6 présentaient une affinité prometteuse.^{32, 77}

Dans une étude de balayage du GHRP-6 par un résidu d'acide aza-aminé, plusieurs analogues ont montré une affinité pour le CD36 tout en perdant leur affinité pour le récepteur GHS-R1a. C'est le cas par exemple des analogues [azaF⁴]- (**1.80**) et [azaY⁴]-GHRP-6 (**1.79**) qui ont maintenu leur affinité pour le CD36, mais ont perdu leur affinité pour le GHS-R1a d'un facteur supérieur à 1000. De plus, l'analyse conformationnelle par spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD) a indiqué que des azapeptides [azaF⁴] (**1.80**), [A¹, azaF⁴] (**1.81**) et [azaY⁴]-GHRP-6 (**1.79**) adoptent un repliement de type β pouvant être responsables de leur sélectivité pour le récepteur CD36 (**Figure 1.10**).¹⁰⁶

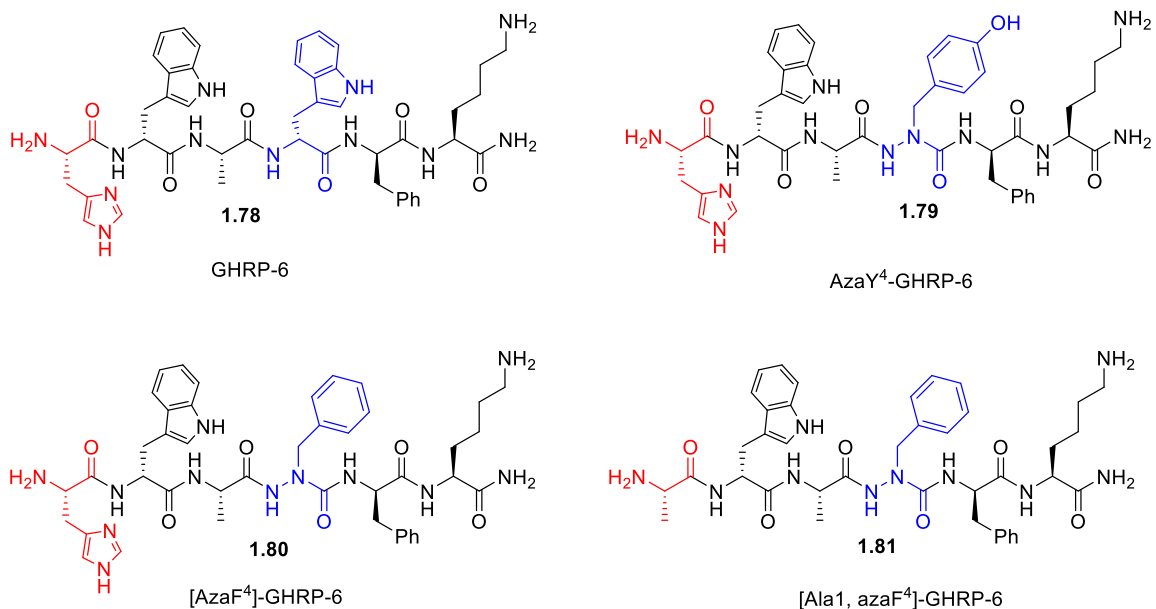


Figure 1.10 : Structure de l'hexapeptide synthétique GHRP-6 et de ses analogues [azaF⁴]-, [Ala¹, azaF⁴]- et [azaY⁴]-GHRP-6.¹⁰⁶

L'étude de l'effet des analogues d'azapeptide GHRP-6 sur la néovascularisation dans un test de germination microvasculaire sur des explants choroïdiens de souris a donné des résultats divergents. Par exemple, le composé [azaY⁴]-GHRP-6 (**1.79**) a réduit la néovascularisation à 17 % en comparaison au composé [Ala¹, azaF⁴]-GHRP-6 (**1.81**) qui a plutôt légèrement augmenté la néovascularisation à 105% par rapport au contrôle.¹⁰⁶

L'objectif des travaux présentés dans ce mémoire est donc de synthétiser des analogues du GHRP-6. Nous avons premièrement remplacé le tryptophane en position quatre du ligand GHRP-6 (**1.78**) par des analogues de l'aza- phénylalanine (25 analogues). Ensuite, nous avons substitué l'histidine en première position de certains azapeptides GHRP-6 synthétisés par l'alanine pour comparer leurs activités biologiques.

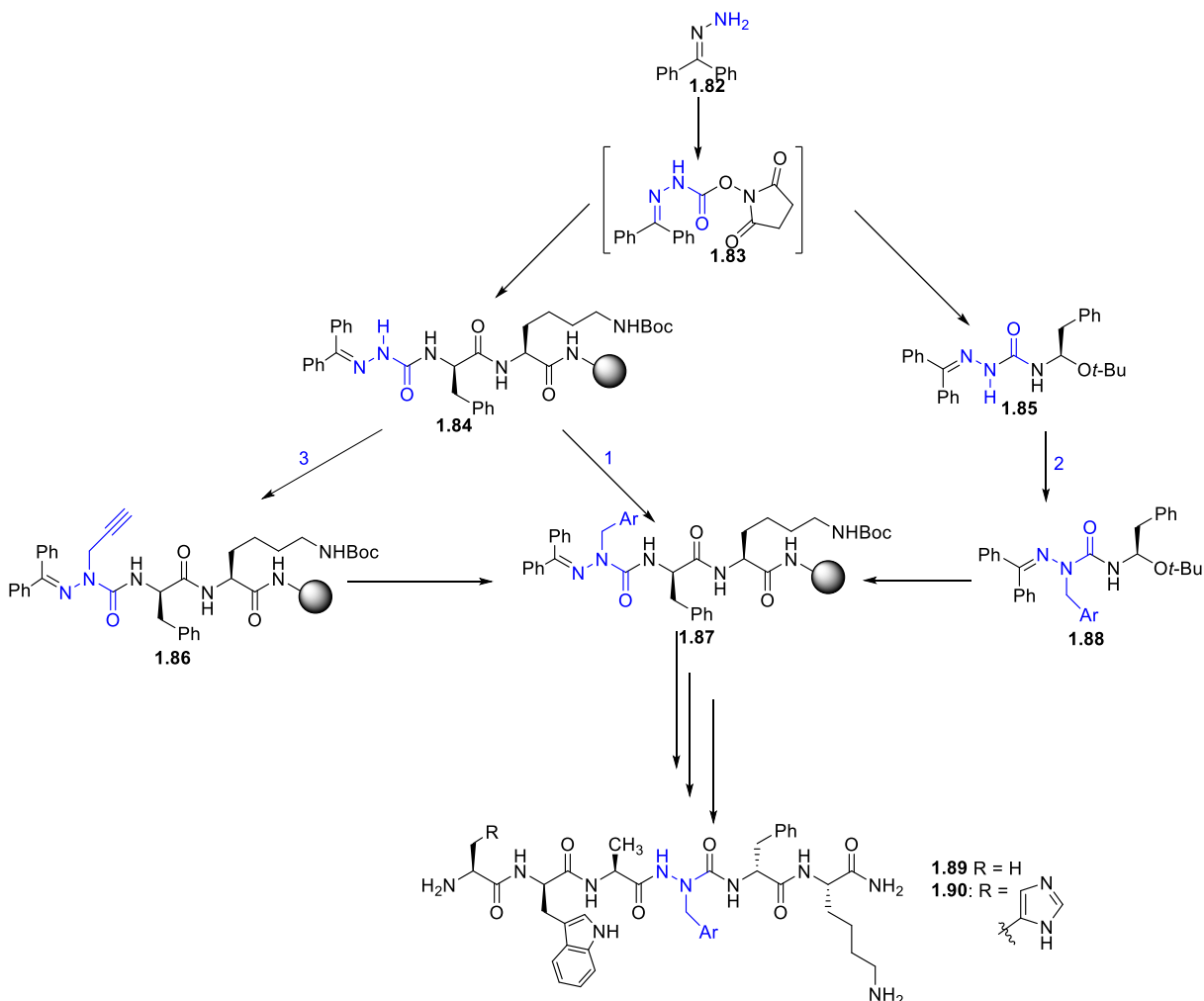


Schéma 1.7 : Résumé du mémoire : Stratégies utilisées pour synthétiser des analogues de l'aza-Phe⁴ [GHRP-6].

Pour y parvenir, nous avons utilisé trois stratégies de synthèse (**Schéma 1.7**). La stratégie **1** est complètement faite sur support solide. La stratégie **2** est une combinatoire des stratégies développées en solution et sur support solide où la sémicarbazone est synthétisée et alkylée en solution avant d'être acylé sur la chaîne peptidique sur support solide. La stratégie **3**, en plus d'être faite sur support solide, met en exergue la cycloaddition dipolaire 1,3.

En collaboration avec le Professeur Ong de la faculté de Pharmacie et le Professeur Chemtob du Département de Pédiatrie de Université de Montréal, les analogues aza-GHRP-6 synthétisés ont été testés premièrement pour leur capacité à réduire la quantité de monoxyde d'azote produite par les agonistes du TLR2, ensuite pour leur affinité avec le récepteur CD36 et enfin étudier l'activité angiogénique pour mieux comprendre la relation entre la structure et les activités (SAR) biologiques observées.

Chapitre 2 : Influence de l'histidine-1 et de l'azaphénylalanine-4 GHRP6 sur l'affinité, les activités anti-inflammatoires et les propriétés antiangiogéniques du récepteur CD36

2. Mise en contexte du chapitre 2

2.1. La dégénérescence maculaire liée à l'âge

2.1.1. Définition

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la cause majeure de la cécité visuelle chez les personnes âgées dans le monde entier.¹⁰⁸ Elle touche plus de 14 millions de personnes à travers le monde incluant environ 10 millions d'américains et plus de 2 millions de personnes au Canada.^{108,109} Elle existe sous deux formes (**Figure 2.1**). La forme sèche connue sous le nom de la forme atrophique, qui affecte 85% de patients et se caractérise par le dépôt jaunâtre de polysaccharides oxydés appelé drusen entre le pigment épithélial (PE) et la membrane Bruch (MB) de l'œil. Dans certains cas, cette forme peut progresser pour donner la forme néovasculaire qui se caractérise par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants. En effet, l'augmentation du drusen et la formation des vaisseaux sanguins entraînent la destruction des photorécepteurs et affectent la vue tout en évoluant pour donner la forme humide de la DMLA. Ce processus est également connu sous le nom de « l'angiogenèse oculaire ».¹¹⁰ La forme humide connue sous le nom de néovasculaire affecte seulement 15% de patients mais 90% de ces patients finissent par perdre complètement la vue.¹¹¹

Bien que la cause majeure de cette cécité soit l'âge avancé (40 ans et plus), une alimentation très riche en cholestérol (l'obésité), la cigarette, certaines carences alimentaires, les facteurs génétiques et les maladies cardiovasculaires sont aussi des risques non négligeables de cette anomalie.^{108,112}

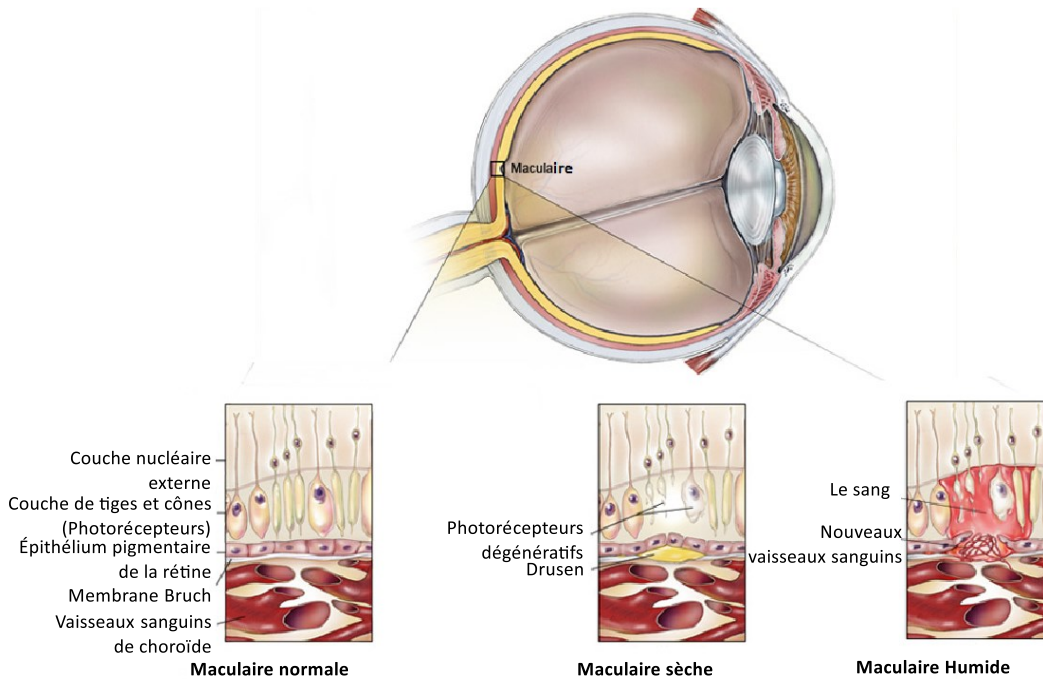


Figure 2.1: La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) ¹¹³

(Figure traduite de: Zhang, K.; Zhang, L.; Weinreb, R. N., Ophthalmic drug discovery: novel targets and mechanisms for retinal diseases and glaucoma. *Nature reviews Drug discovery* **2012**, *11* (7), 541-559).¹¹³

2.1.2. Développement de la maladie

Lorsque l'œil subit un stress oxydatif chronique, ceci occasionne l'accumulation d'une quantité importante de lipofuscine et entraîne la dégradation du pigment épithélial de la rétine (PER), des photorécepteurs, et la membrane bruch (MB). Suite à cette dégradation des cellules visuelles, la région de la MB et du PER subit une inflammation chronique entraînant ainsi un dépôt de débris intra-cellulaire (atrophique) ou / et extra cellulaire (néovasculaire). La progression du dépôt peut former le drusen en détruisant les photorécepteurs et le pigment épithélial de la rétine pour finir par donner l'une des deux formes de la DMLA.^{114,113}

Dans le but de soigner cette maladie, les chercheurs ont identifié des antioxydants, des inhibiteurs du cycle visuel, des anti-inflammatoires, des neuro-protecteurs et des agents anti-angiogéniques comme médicaments possibles intervenant à différentes étapes de la progression de cette maladie. (Figure 2.2).¹¹³

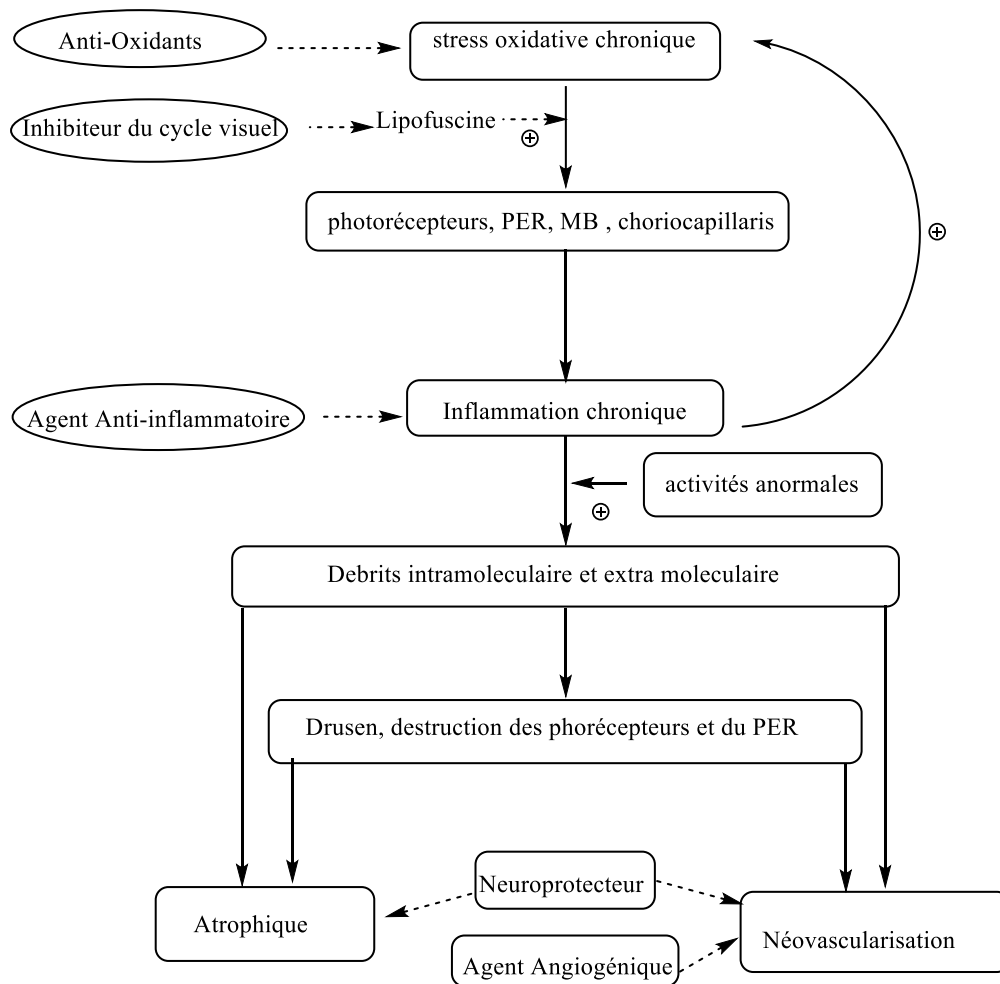


Figure 2.2: Cycle physiologique et potentiels lieux d'interventions pour lutter contre la DMLA.¹¹³

(Figure traduite de: Zhang, K.; Zhang, L.; Weinreb, R. N., Ophthalmic drug discovery: novel targets and mechanisms for retinal diseases and glaucoma. *Nature reviews Drug discovery* 2012, 11 (7), 541-559)

2.1.3. Traitements disponibles et limitations

Parmi les stratégies qui ont été mises sur le marché dans l'optique de soigner la DMLA, nous retrouvons les agents anti-inflammatoires, tels que les corticostéroïdes topiques et les anti-inflammatoires non-stéroïdiens, les thérapies photo-dynamiques, la photo-coagulation laser, la diathermie par aiguille, la greffe de membrane conjonctivale et l'amniotique.^{108,115} Ces traitements disponibles sur le marché ont une efficacité limitée, en plus de présenter des effets secondaires importants.¹¹⁶

Par exemple, les corticostéroïdes sont considérés comme les meilleurs traitements anti-inflammatoires de la DMLA et d'autres maladies oculaires.¹¹⁶ Par contre, ils occasionnent une augmentation de la pression intraoculaire, en plus de causer des cataractes capsulaires postérieures.¹¹⁵ Les anti-inflammatoires non stéroïdiens ont moins d'effets secondaires que les corticostéroïdes, mais, ils sont également moins efficaces. La photocoagulation laser quant à elle détruit les nouveaux vaisseaux caractéristiques de la DMLA et arrête le processus de néovascularisation. Malheureusement, le traitement au laser est douloureux et endommage définitivement la rétine à moyen et long terme.¹¹¹

Suite à ces limitations, plusieurs groupes de recherche se sont penchés sur la synthèse des médicaments d'ordre anti-angiogéniques. L'angiogénèse est la formation de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux préexistants. Ce processus se fait en plusieurs étapes. Elle comprend la stimulation des récepteurs du facteur de croissance angiogénique sur les cellules endothéliales vasculaires, la dégradation protéolytique de la membrane basale des cellules endothéliales, la prolifération et la migration des cellules endothéliales, la dégradation de la matrice extracellulaire environnante, la maturation des vaisseaux et finalement la fermeture de

nouvelles boucles artério-veineuses. Chacune de ces étapes est étroitement régulée par l'action des deux stimulants des facteurs angiogéniques et des molécules inhibitrices angiogéniques. À l'état normal, les vaisseaux ne réagissent pas, ce qui occasionne la domination de l'activité d'inhibition angiogénique. Mais lorsque survient des anomalies causant l'hypoxie ou l'inflammation, qui activent les facteurs angiogéniques, l'équilibre peut se déplacer en faveur de l'angiogenèse.¹¹⁷ Ainsi, la synthèse des médicaments à caractère anti-angiogéniques tel que les anti-facteurs de croissance endothélium vasculaire [en anglais anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF)] ont beaucoup amélioré les conditions de vie des patients ayant l'une des formes d'angiogenèses rétiniennes. Les anti-VEGF retrouvés sur le marché sont, le ranibizumab, le bevacizumab, l'aflibercept et le pegaptanib de sodium.^{118, 115} Par exemple l'injection du ranibizumab a empêché la perte de la vue chez 95% des patients à haut risque tout en améliorant la vue chez 40% des patients.¹⁰⁸ De plus, ces médicaments ont prouvé leur efficacité pour le traitement de toutes les maladies néovasculaires.¹¹⁵

Malgré ces progrès, il faut tenir compte du fait que les traitements actuels aident à retarder davantage la perte de la vue au lieu de la soigner,¹¹¹ d'où la nécessité de développer de nouveaux agents pharmacologiques qui, en plus d'avoir des propriétés anti-angiogéniques auraient d'autres mécanismes d'action, qui pourraient être administrés de façon moins invasive et à moindre coût.^{119,120,118}

Pour ce faire, l'étude du caractère angiogénique, anti-inflammatoire du récepteur CD36 a apporté une nouvelle orientation à cette étude.¹²¹

2.2. Relation entre la dégénérescence maculaire liée à l'âge et le récepteur CD36.

2.2.1. Définition

Le récepteur CD36 « Cluster of differentiation 36 receptor » est une glycoprotéine membranaire de 88 kD (**Figure 2.3**) appartenant à la classe B des récepteurs éboueurs qui contient une multitude de sites liaisons différents. Il a été premièrement identifié dans les monocytes des anticorps monoclonaux OKM5,¹²² et par la suite, il a été retrouvé dans des cellules telles que des plaquettes sanguines, des monocytes, des macrophages, des cellules endothéliales et des cellules des muscles lisses.^{123,124} En effet, le récepteur CD36 joue un rôle important dans l'athérosclérose, l'angiogenèse, l'homéostasie lipidique, l'inflammation, la défense immunitaire, le goût, la biologie plaquettaire et le diabète. Toutes ces fonctions lui sont conférées par son interaction avec différents espèces et d'autres récepteurs.¹²¹

Parmi les espèces qui interagissent avec le récepteur CD36, nous avons les LDLox et les acides gras à longues chaînes, les produits de glycation avancé [Advanced glycation end-product of LDL (AGE-LDL)], les peptides sécréteurs d'hormones de croissances (GHRPs) et l'héxareline.¹²⁴

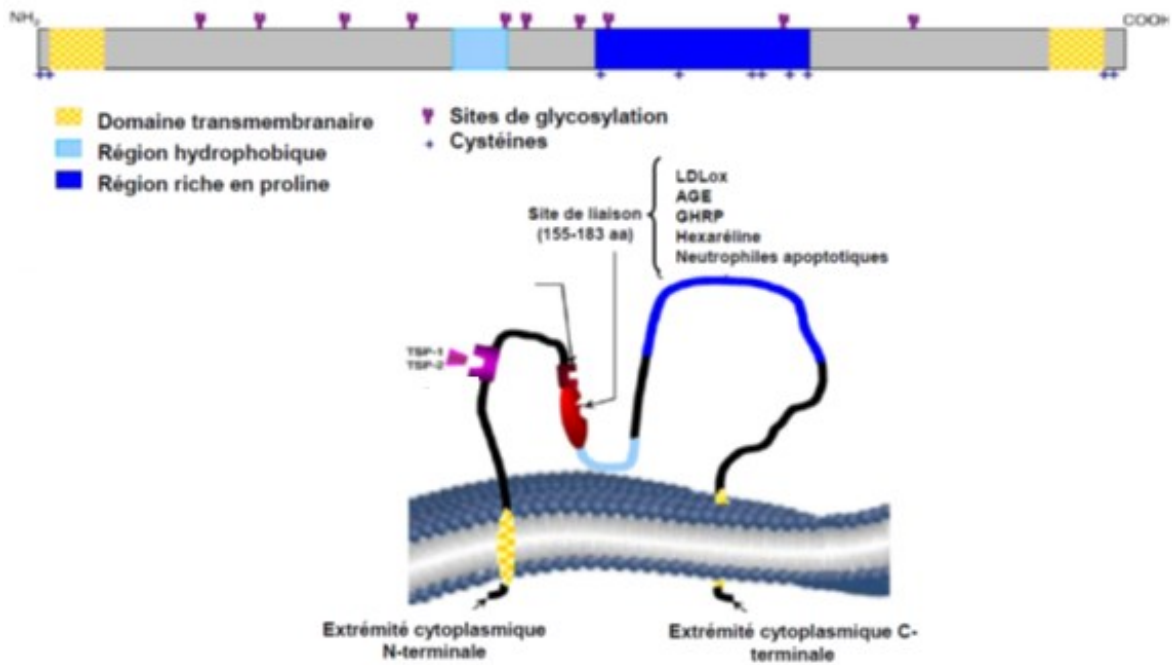


Figure 2.3: Représentation schématique de la protéine CD36.

(Figure traduite de Collot-Teixeira, S.; Martin, J.; McDermott-Roe, C.; Poston, R.; McGregor, J. L. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*. 2007, 75, 468–477).¹²⁴

Dans l'œil, le récepteur CD36 est exprimé dans le PER et cette expression est liée à la phagocytose des segments externes des photorécepteurs. De plus, l'inhibition de la cyclo-oxygénase (COX-2), qui est un produit génique pro-inflammatoire, supprime la néovascularisation pré-rétinienne via une nouvelle voie d'induction CD36/thrombospondine-1. Une carence en CD36 déclenche des lésions cornéennes spontanées et conduit à une involution choroïdienne par inhibition de la COX-2 dans le PER suivant une étude menée sur les souris.¹²⁵ Pour ces raisons, le récepteur CD36 représente une cible thérapeutique très importante pour le traitement de la DMLA.¹²⁵

2.2.2. Le CD36 et la DMLA

Lors du développement de la DMLA, les premiers symptômes observés sont le dépôt laminaire dans la MB et la formation du drusen contenant des LDLox.¹²⁵

De plus, le récepteur CD36 est le principal récepteur impliqué dans l'absorption de l'LDLox, et est exprimé dans le PER. Donc toute anomalie impliquant le CD36 affecterait directement le récepteur l'LDLox.¹²⁵ L'augmentation de la concentration des LDLox dans le plasma favorise le dépôt laminaire dans la MB et la formation du drusen entraîne la diminution de la perméabilité du PER. Malheureusement, un défaut de transport des nutriments du PER aux photorécepteurs entraîne la mort de ces derniers.^{125, 126}

Les études menées par notre laboratoire en collaboration avec le Professeur Ong de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Montréal ont montré que, chez les souris, le récepteur CD36 participe à l'absorption de l'LDLox dans le PER et, par conséquent, à la clairance des dépôts sous-rétiniens. De plus une carence en CD36 entraîne une accumulation de l'LDLox sous la rétine entraînant l'épaississement de la MB. Ils ont également montré que les souris âgées avaient une accumulation des débris (drusen) dans le PER et dans la MB ce qui n'était pas observé chez les souris plus jeunes.¹²⁶ Ceci confirme l'hypothèse suivant laquelle les débris s'accumulent dans le PER à un âge avancé. L'administration du EP80317 (**2.4**) (hexapeptide analogue du ligand GHRP-6 et agoniste du récepteur CD36) a permis de réduire le niveau de cholestérol plasmatique et a empêché l'accumulation de dépôts des débris sous le PER et l'épaississement de MB.¹²⁵ Dans la même lancée, l'hexaréline (**2.3**) également un analogue du ligand GHRP-6 supprime l'excès de lipides dans l'organisme des souris ayant reçu une alimentation riche en cholestérol.²⁸ Vu ces résultats, les Professeurs Ong et Lubell se sont

penchés sur la synthèse du ligand GHRP-6 et ses analogues afin d'étudier leur activité biologique et trouver un meilleur traitement pour la DMLA.

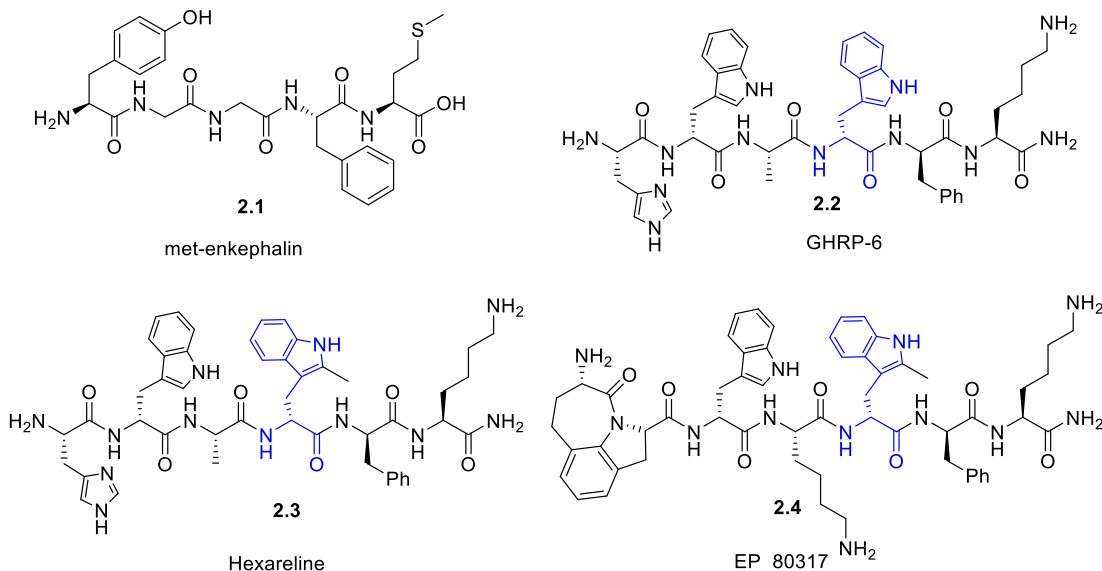


Figure 2.4: Structures chimiques du met-enkephalin, GHRP-6, l'héxareline et l'EP80317.^{118, 120, 121, 122}

2.3. Analogues du ligand GHRP-6 et l'aza-GHRP-6.

2.3.1. Les GHRP-6 et leurs potentiels thérapeutiques

Les sécrétines peptidiques de l'hormone des croissances (GHRPs) sont des peptides synthétiques agissant comme stimulateurs puissants de la sécrétion d'hormones de croissance (GH) par les récepteurs couplés à la protéine G principalement dans l'axe hypothalamo-hypophysaire.¹²⁷ Ils ont été découverts dans les années 1980 dans le cadre de la synthèse des analogues de la met-enképhaline (**2.1**).^{127,3, 128} L'optimisation successive des analogues de la met-enképhaline s'est faite à travers des calculs théoriques et des études de la relation entre la structure et l'activité biologique, qui a mené aux GHRPs.^{129,130,131,132} Les GHRPs et ses analogues comprennent

l'hexaréline, l'ipamoréline, l'lexéléléline, le GHRP-1, le GHRP-2, le GHRP-4, le GHRP-5 et le GHRP-6.^{133, 134} Tous ces analogues sont constitués de 4 à 7 acides aminés avec un amide à sa position C-terminale. Ils possèdent également des acides aminés non naturels « D » dans leur structure.^{133, 134} Ils ont été initialement conçus pour le traitement des anomalies liées au faible niveau d'hormones de croissance, mais sont également utilisés de nos jours pour augmenter les niveaux d'endogènes et le facteur de croissance analogue à l'insuline 1 (IGF-1) pour améliorer la performance des sportifs.^{135,136}

Bien que tous les GHRPs secrètent l'hormone de croissance de façon *in vitro* et *in vivo*, l'analogue GHRP-6 a la particularité de présenter une activité biologique deux fois plus élevée que tous les autres analogues du groupe GHRPs.¹³⁷ Il présente une faible affinité pour les récepteurs opioïdes. Il est également capable de stimuler la sécrétion de l'hormone de croissance sur les cellules de bovine isolée et dans les cellules hypophysaires des rats.¹³² De plus, l'hexaréline (**2.3**) (H-His-D-2-Me-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) est un analogue du GHRP-6 qui présente une activité biologique bien plus élevée que ce dernier, en plus d'être plus résistant à la dégradation. Dès lors, l'héxareline et le GHRP-6 ont attiré l'attention de plusieurs communautés scientifiques.¹³⁸

Le GHRP-6 (**2.3**, H-His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) est un peptide synthétique qui en plus d'avoir une affinité pour le récepteur CD36, interagit aussi avec le récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance 1a (GHS-R1a). L'affinité que le GHRP-6 a pour le GHS-R1a, qui est principalement exprimé dans l'axe hypothalamo-hypophysaire, provoque la sécrétion de l'hormone de croissance (GH) par une voie indépendante de celle régulée par la voie hormonale de libération de l'hormone de croissance (GHRH).¹³⁹

Les interactions entre le GHRP-6 et le récepteur GHS-R1a stimulent la sécrétion de l'hormone de croissance qui offre des potentiels thérapeutiques pour le traitement de la déficience sécrétoire de GH liée à des conditions telles que l'obésité,^{140,140} le vieillissement,^{141,142} le dysfonctionnement ischémique du cœur comme l'infarctus du myocarde,^{141, 143,144,140} et la cachexie.⁷

D'autre part, les interactions entre le récepteur CD36 et le ligand GHRP-6 jouent un rôle important dans la protection cardio-vasculaire, le piégeage des LDLox et la production des cellules souches. L'LDLox est associé à la production des lipides proactifs qui activent le récepteur CD36 par le macrophage, le PER, le plasma sanguin et la membrane bruch (MB).¹⁴⁵ En effet, le site de liaison des analogues du GHRP-6 au CD36 chevauche celle de l'LDLox, ce qui offre des potentiels thérapeutiques contre les maladies angiogéniques comme la DMLA, le diabète rétinopathie et l'athérosclérose.¹²⁵

2.3.2. Propriétés des aza-GHRP-6.

Bien que le GHRP-6, l'héxareline, et l'EP80317 soient d'une grande importance thérapeutique, la double affinité que ces derniers ont pour les récepteurs GHS-R1a et CD36 constitue un obstacle pour l'étude de leurs fonctions dans chacun de ces deux récepteurs.¹⁰⁶ Ainsi, les composés avec une sélectivité accrue pour le récepteur CD36, comparativement GHS-R1a, pourraient être plus efficaces pour le traitement des maladies d'ordre angiogénique. La synthèse des azapeptides s'est avérée être une option très encourageante pour le développement des agents thérapeutiques contre les maladies angiogéniques. Contrairement aux peptides naturels, les azapeptides induisent une rigidité conformationnelle qui leur confère le potentiel pour une

meilleure sélectivité, une activité biologique plus accrue, une durée d'action prolongée et une plus grande résistance à la dégradation chimique et enzymatique.¹²⁷

2.4. Description des tests biologiques utilisés pour évaluer la sélectivité au récepteur CD36 par rapport au récepteur GHS-R1a

Les propriétés biologiques des analogues du GHRP-6 incluant les azapeptides peuvent être évaluées en utilisant plusieurs méthodes analytiques et biologiques. Nous avons par exemple le test d'étiquetage par photo-affinité covalente au récepteur, méthode qui a été utilisé pour déterminer l'IC₅₀ (la concentration d'inhibiteur ou la réponse est réduite de moitié) des analogues du GHRP-6 au récepteur CD 36.^{106,146} Ensuite test de germination microvasculaire sur des explants choroïdiens de souris qui a été utilisé pour évaluer les propriétés antiangiogéniques du GHRP-6 et de ses analogues.^{106,147} Enfin le test de monoxyde d'azote (nitric oxyde (NO)) pour évaluer l'efficacité des agents thérapeutique à inhiber les activateurs du complexe TLR2-TLR6.^{106,148}

2.4.1. Le test de marquage par photo-affinité covalente compétitive du récepteur

La photo-sonde est un test utile dans la découverte des médicaments.^{149,150} L'étude par photo-sonde à deux étapes permet particulièrement de tirer avantage de la stabilité des éléments photo actifs tels que la 4-benzoylphénylalanine (Bpa) et les benzophénones (BPs) dans l'obscurité et de leur sensibilité à la lumière. En effet, cette technique consiste à coupler un groupement photo-actif à la molécule biologiquement active suivant un processus chimique. La molécule obtenue

est ensuite irradiée à des longueurs d'onde bien définies pour former une liaison covalente avec une autre molécule (protéine, sucre etc.) ou pour cliver une liaison spécifique.^{149,151}

La photo-marquage quant à lui permet de suivre l'évolution de l'activité biologique. Parmi toutes les méthodes de marquage utilisées pour suivre l'activité biologique des réactifs, le marquage radioisotopique à l'iode 125 [¹²⁵I] a la particularité d'être utilisé pour utiliser des quantités limitées de réactifs. De plus, la facilité avec laquelle [¹²⁵I] peut substituer la tyrosine et l'histidine justifie sa large utilisation pour l'étude des peptides et des protéines.¹⁵²

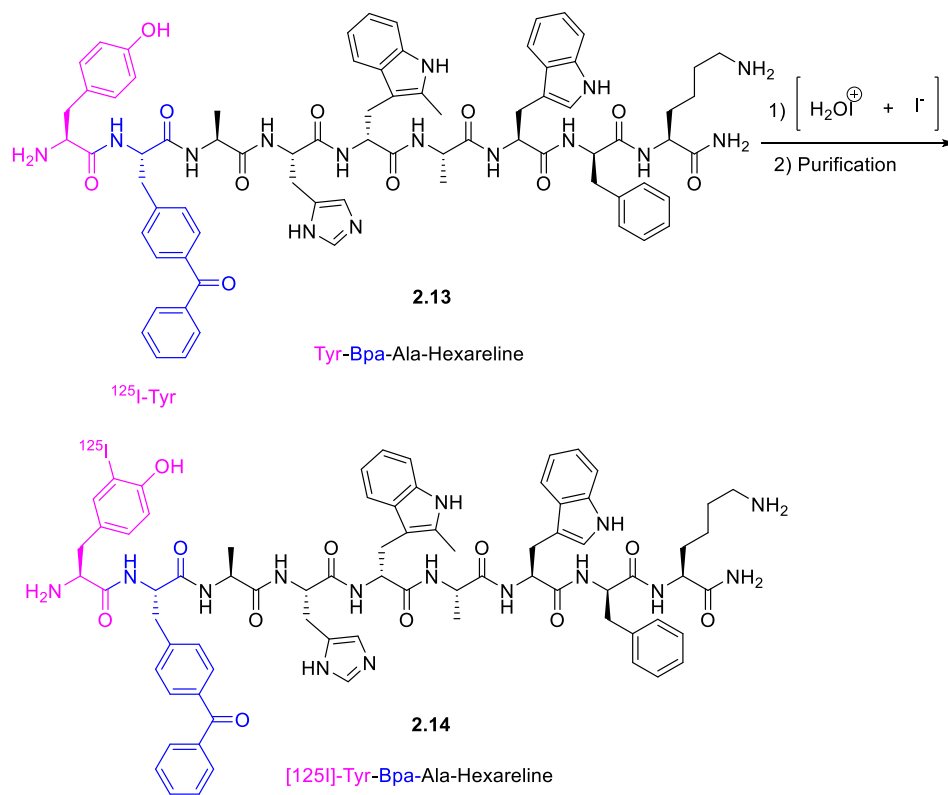
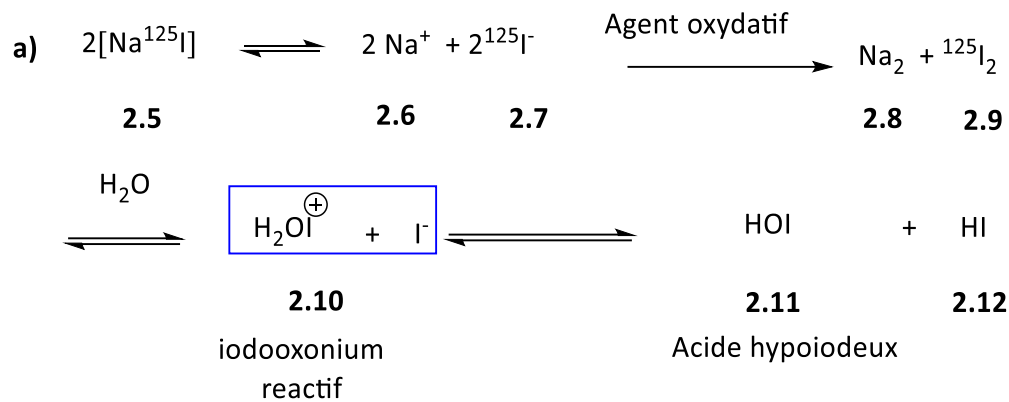


Schéma 2.1 : Iodation de l'héxareline.^{152,132,153}

L'iodation des peptides et des protéines (**Schéma 2.1**) se fait dans l'obscurité et très souvent en utilisant la méthode de la lactoperoxydase.¹⁵² C'est une méthode extrêmement douce qui consiste en l'utilisation du peroxyde d'hydrogène conjointement avec l'oxydoréductase lactoperoxydase.^{152,154} Cette méthode d'iodation est spécifique à la tyrosine lorsque le Na^{125}I

est utilisé pour former l'iodo-oxonium comme intermédiaire actif qui réagit avec la tyrosine pour former le mono-iodotyrosine.¹⁵²

En s'inspirant des tests de marquage au soufre 35 [³⁵S] pour identifier le site de liaison des hormones de croissance à la membrane collagène de porcine,^{155,156,128} le Professeur Ong a mis sur pied le test de marquage par photo-affinité covalente compétitive au récepteur dans le but d'étudier la liaison compétitive entre le ligand [¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexareline (**2.14**) et les analogues GHRP au récepteur (CD36 ou GHR-1a) (**2.16**) dans différents tissus.^{106, 132, 146}

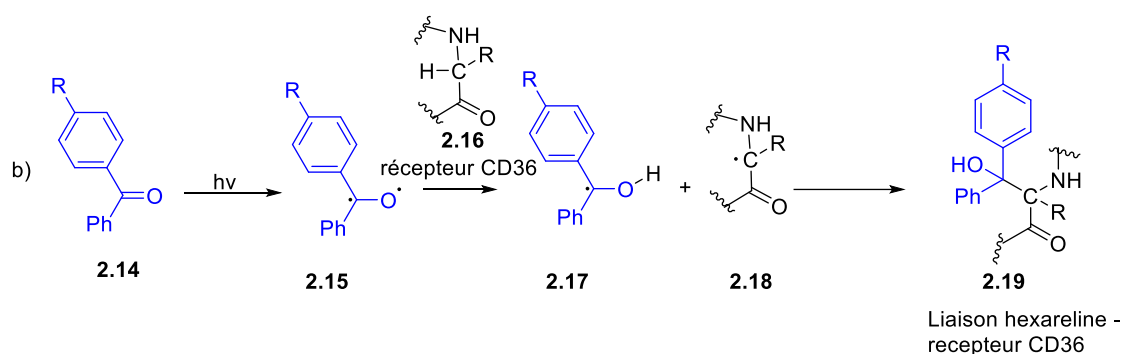
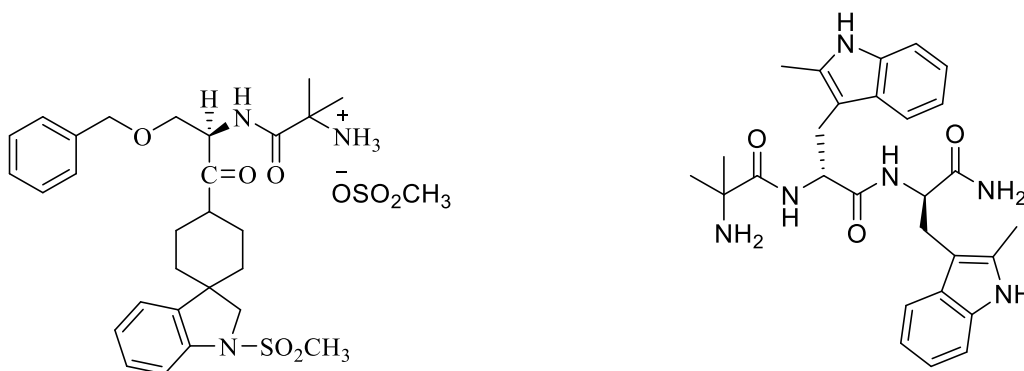


Schéma 2.2 : Synthèse du CD36-[¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexareline par l'irradiation ultraviolette à environ 350 nm.^{151,153,157}

Pour y parvenir, il a tout d'abord synthétisé la molécule photo activable qu'est le Tyr-Bpa-Ala-hexareline suivi de l'iodation de la tyrosine (Tyr) par le Na¹²⁵I (**2.5**) pour obtenir [¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexareline (**2.14**) (**Schéma 2.1**).¹³²

Après la préparation du récepteur CD36 (**2.16**) provenant de différentes membranes cellulaires,^{132,153} ce dernier est saturé de façon covalente avec [¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexareline en utilisant l'irradiation ultra-violette à 350 nm (**Schéma 2.2**). Le produit obtenu est purifié et utilisé comme contrôle pour faire l'étude de la liaison compétitive du [¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexareline au récepteur CD36 en présence de concentrations croissantes de ligands analogues

des GHRPs.^{106, 132, 158} Ainsi pour chaque quantité de compétiteur ajoutée, ils mesurent la quantité de complexe (CD36)-[¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexaréline (**2.19**) restante afin d'établir une courbe dose-réponse (**Figure 2.5**) et déterminer l'IC₅₀.^{106, 132, 153}



2.20 Structure du MK0677¹⁵⁹

2.21 Structure de l'EP51389¹⁶⁰

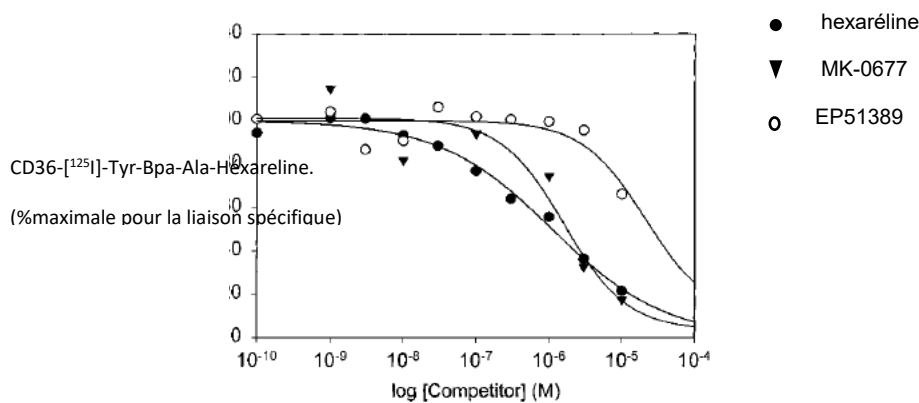


Figure 2.5: Représentation de la courbe dose-réponse.¹⁵⁸

À une concentration fixe de [¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexaréline incubée dans la membrane cardiaque (en ordonnée), une concentration croissante des compétiteurs (hexaréline, MK-0677 (**2.20**) ou l'EP 51389 (**2.21**)) a été ajoutée. La substitution de l'héxaréline (marqué par I¹²⁵) par les compétiteurs au récepteur CD36 entraîne la diminution de la concentration du complexe CD36)-

[¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexareline (**2.19**). Ces données obtenues leur ont permis de calculer la concentration d'inhibition (IC₅₀) de CD36-[¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexareline (**2.19**) en fonction de la concentration des compétiteurs ajoutée.¹⁵⁸

2.4.2. Le test de germination microvasculaire sur des explants choroïdiens de souris.

La choroïde est un lit vasculaire dans l'œil qui se situe sous le PER. Il a pour rôle principal de fournir l'oxygène et les nutriments à la rétine externe. La vascularité choroïdienne joue un rôle vital dans la vue. Ainsi, l'angiogenèse anormale dans la choroïde est associée à plusieurs maladies oculaires tels que la DMLA, la rétine pigmentaire etc. Pour ces faits, la choroïde représente une cible indispensable pour l'évaluation des propriétés angiogéniques et anti-angiogéniques rétiniens des médicaments.^{106,147}

Le test de germination microvasculaire sur des explants choroïdiens de souris a été développé¹⁴⁷ et utilisé pour évaluer les propriétés angiogéniques des ligands comme les azapeptides GRHP-6.^{106,161} Pour y parvenir des explants de choroïdes sont mis dans un milieu de culture en présence ou non des azapeptides afin d'observer l'apparition des micro-vaisseaux (**Figure 2.6**).

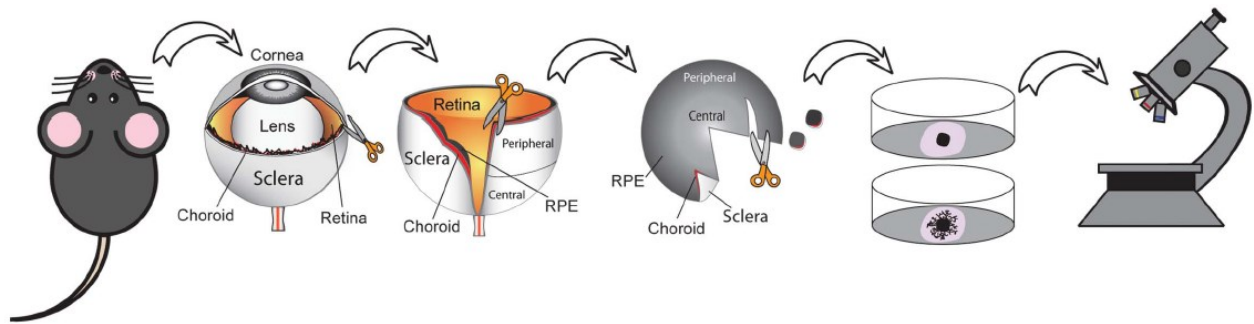


Figure 2.6: Illustration du test de germination microvasculaire sur des explants choroïdiens de souris.

(Figure provenant de Shao, Z.; Friedlander, M.; Hurst, C. G.; Cui, Z.; Pei, D. T.; Evans, L. P.; Juan, A. M.; Tahir, H.; Duhamel, F.; Chen, J., Choroid sprouting assay: an ex vivo model of microvascular angiogenesis. *PLoS One* **2013**, 8 (7), e69552.)¹⁶¹

En effet, les yeux des souris génétiquement modifiées pour produire la choroïde sont retirés de l'orbite des souris et incubées dans un mélange de 2% de dispase afin de pouvoir retirer le PER de la sclérotique choroïde après avoir préalablement enlevé le segment antérieur, la vitrite et la rétine neurosensorielle. La choroïde-sclère obtenue est coupée en plusieurs morceaux et placés dans des plaques de puits contenant un mélange de milieu basal des cellules endothéliales (MBCE) et un milieu de croissance des cellules endothéliales (MCCE) 0,4% de sérum sans hydrocortisone et un gel qui favorise la réduction du facteur de croissance. Les plaques sont ensuite incubées avec le dioxyde de carbone à température ambiante pendant 6 jours en absence d'un témoin, en présence d'un témoin ou en présence de différents peptides ayant une concentration fixe dans le MBCE sans sérum. Une fois la préparation terminée, les images des explants sont individuellement prises au jour zéro et après quatre jours à l'aide d'un microscope. L'image de la couverture de germination de chaque plaque est quantifiée afin de déterminer le pourcentage de germination du jour zéro par rapport au jour quatre en se servant d'un logiciel spécialisé.^{106,161}

2.4.3. Le test de monoxyde d'azote (NO).

Le récepteur CD36 est un récepteur éboueur « scavenger » donc l'activité n'est pas uniquement fonction des ligands avec lesquels il interagit mais aussi des corécepteurs.¹⁶² Les *toll-like receptors* (TLRs) sont des récepteurs transmembranaires qui jouent un rôle crucial dans la protection immunitaire et l'inflammation. Les TLRs sont impliqués dans des maladies immunitaires et le cancer, ce qui fait d'eux des cibles thérapeutiques importantes.^{162,163} Le complexe TLR2-TLR6 est co-exprimé avec le CD36 et est présent dans des cellules microvasculaires endothéliales et les macrophages (**Figure2.7**). En réponse à certains ligands pathogéniques tels que les LDLox, l'amyloïde β et les ox-phospholipides qui interagissent avec le récepteur CD36, le complexe TLR2-TLR6 peut interagir de façon allostérique avec le récepteur CD36 pour induire la pro-inflammation de la cytokine et la surproduction du NO à travers la protéine de réponse primaire de différenciation myéloïde 88 (MYD88) et le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B).^{163,164} Ainsi, l'efficacité d'un agent thérapeutique à réduire l'effet des agonistes (activateur) du complexe TLR2-TLR6 est évaluée à sa capacité à réduire la quantité de monoxyde d'azote produite par la cytokine.

Le test de monoxyde d'azote (NO) a été mis au point pour évaluer l'efficacité des agents thérapeutiques à inhiber l'effet des agonistes des TLRs. Cette stratégie utilise un agoniste du récepteur TLR2 pour stimuler la surproduction du NO en absence d'un agent thérapeutique afin de comparer les résultats avec ceux obtenus en présence des agents thérapeutiques. Pour ce faire, le meilleur agent d'une série est celui qui aura réduit au maximum la quantité de NO produite.^{106, 148}

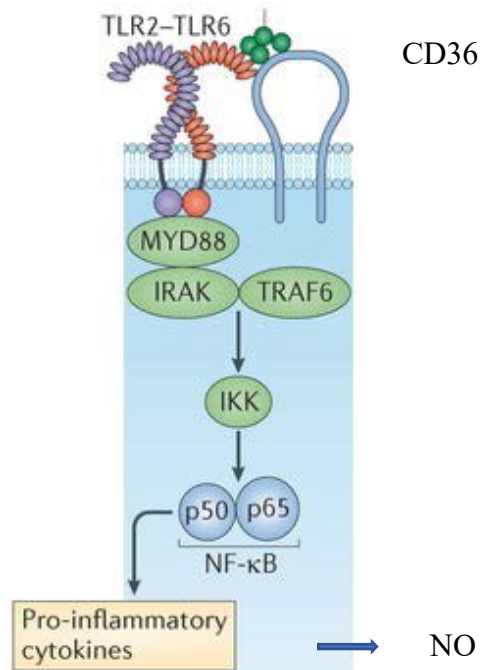


Figure 2.7: Production du NO induite par les interactions entre TLR2-TLR6 et le récepteur CD36

(Figure provenant de: Canton, J.; Neculai, D.; Grinstein, S., Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nature Reviews Immunology* **2013**, *13* (9), 621-634).¹⁶³

2.5. Problématique adressée dans l'article 1

Afin de rendre le GHRP-6 sélectif envers le récepteur CD36 et accroître son potentiel thérapeutique pour le traitement de la DMLA et d'autres maladies d'ordre angiogéniques, notre groupe de recherche s'est intéressé à la synthèse des azapeptides. Proulx, Sabatino *et al.* dans leurs travaux, ont tenté de rendre les ligands GHRP-6 sélectif pour le récepteur CD36.¹⁰⁶ En effet, l'incorporation d'un acide aza-aminé dans une séquence peptidique peut amener ce dernier à adopter un repliement de type β qui pourrait accroître sa sélectivité pour un récepteur précis.¹⁶¹ Pour y parvenir, ils ont scanné les acides aminés du GHRP-6 avec les acides aza-aminés, ce qui leur a permis d'obtenir des résultats très intéressants:

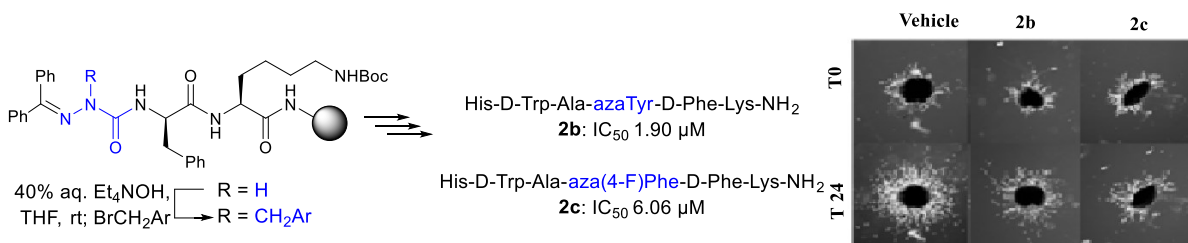
- les analogues [aza-F⁴]- et [aza-Y⁴]-GHRP-6) ont maintenu leur affinité pour le CD36 mais ont perdu leur affinité pour le GHS-R1a d'un facteur supérieur à 1000.¹⁰⁶
- l'[aza-Y⁴]-GHRP-6 présente un effet anti-angiogénique nécessaire pour le traitement de la DMLA, du diabète rétinopathie et de l'athérosclérose. L'analogue [Ala¹, azaF⁴] montre un effet contraire dans le test de germination microvasculaire à l'aide d'un explant choroïde.^{125, 106}
- Les [aza-Phe⁴]- et [aza-Tyr⁴]-GHRP-6 montrent la capacité de moduler la surproduction du NO induite par les agonistes des TLR2-TLR6.¹⁴⁸

Tous ces résultats montrent que les analogues du [azaY⁴]-GHRP-6 et l'[A¹, azaF⁴]-GHRP-6 ont des activités intéressantes qui nécessitent une étude plus approfondie. Pour ce faire, nous avons décidé de continuer ce projet en nous focalisant sur les analogues du [azaF⁴]-GHRP-6 et [A¹, azaF⁴]-GHRP-6.

En collaboration avec le Professeur Ong de la Faculté de Pharmacie et le Professeur Chemtob du Département de pédiatrie de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, Dr. Garcia-Ramos et moi avons synthétisé 25 analogues du [azaF⁴]-GHRP-6 et l'[A¹, azaF⁴]-GHRP-6 qui ont été testés pour leur capacité à moduler la surproduction du monoxyde d'azote (induite par les agonistes du complexe TLR2-TLR6), leur pour affinité au récepteur CD36 et leur activité angiogénique afin d'établir la relation entre leur structure et leur activité.

3. Article

Chignen Possi K.; Mulumba, M.; Omri, S.; Garcia-Ramos, Y.; Tahiri, H.; Chemtob, S.; Ong, H.; Lubell, W. D. Influences of Histidine-1 and Azaphenylalanine-4 on the Affinity, Anti-inflammatory and Antiangiogenic Activities of Azapeptide Cluster of Differentiation 36 Receptor Modulators. *J. Med. Chem.* **2017**, in press. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b01209).



3.1. Contribution des auteurs

L'article du chapitre 3, décrivant la synthèse et l'évaluation biologique de 25 analogues azapeptides de GHRP-6, a été rédigé par moi-même sous la supervision du Professeur William D. Lubell et la discussion de l'aspect biologique a été rédigée respectivement par le Dr. Mukandila Mulumba et le Dr. Samy Omri sous la supervision respective du Professeur Huy Ong et du Professeur Sylvain Chemtob. J'ai effectué la synthèse et la purification de 15 des 25 composés étudiés. Dr. Yésica Garcia-Ramos, une ancienne stagiaire postdoctorale du Professeur William D. Lubell, avait synthétisé dix de ces aza-GHRP-6. J'ai reproduit six de ces analogues pour compléter les études biologiques. Nos collaborateurs Dr. Mukandila Mulumba, le Dr. Samy Omri et le Dr. Houda Tahiri ont effectué les tests d'affinités, l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires et d'activité angiogénique des analogues synthétisés.

Influences of Histidine-1 and Azaphenylalanine-4 on the Affinity, Anti-inflammatory and Antiangiogenic Activities of Azapeptide Cluster of Differentiation 36 Receptor Modulators

Kelvine Chignen Possi[†], Mukandila Mulumba[§], Samy Omri[‡], Yesica Garcia-Ramos[†], Houda Tahiri[‡], Sylvain Chemtob[‡], Huy Ong[§], William D. Lubell^{†}*

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

3.2. ABSTRACT:

Azapeptide analogs of growth hormone releasing peptide-6 (GHRP-6) exhibit promising affinity, selectivity and modulator activity on the cluster of differentiation 36 receptor (CD36). For example, [A¹, azaF⁴]- and [azaY⁴]-GHRP-6 (**3.1a** and **3.2b**) were previously shown to bind selectively to CD36, and exhibited respectively significant antiangiogenic and slight angiogenic activities in a microvascular sprouting assay using choroid explants. The influences of the 1- and 4-position residues on the affinity, anti-inflammatory and antiangiogenic activity of these azapeptides have now been studied in detail by the synthesis and analysis of a set of 25 analogs featuring Ala¹ or His¹ and a variety aromatic side chains at the aza-amino acid residue in the 4-position. Although their binding affinities differed only by a factor of 17, the analogs exhibited significant differences in ability to modulate production of nitric oxide (NO) in macrophages and choroidal neovascularization.

3.3. INTRODUCTION

The cluster of differentiation 36 receptor (CD36) is a glycoprotein expressed in the membranes of various cells, including red blood cells and macrophages.^{103,105} Classified as a class B scavenger receptor, CD36 acts in normal cellular function by binding to a variety of endogenous ligands, including oxidized low-density lipoproteins and thrombospondin.¹⁰⁵ Moreover, CD36 is co-expressed with the Toll-like receptor-2 (TLR-2)–TLR-6 complex that plays a significant role in innate immunity.^{165,166} In the light of such interactions, CD36 is a promising therapeutic target for the treatment of various indications including atherosclerosis,¹⁶⁷ angiogenesis,¹⁶⁸ and age-related macular degeneration.^{121,169,170,}

Certain synthetic peptide ligands, such as growth hormone releasing peptide-6 (GHRP-6, H-His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂), exhibit binding affinity for CD36, and also serve as agonists of the growth hormone secretagogue receptor-1a (GHS-R1a) and elicit growth hormone release upon binding to this G-protein coupled receptor.^{106,107} To achieve selectivity towards CD36, we have found that introduction of semicarbazide residues within the GHRP-6 sequence can provide azapeptide analogs with similar binding affinity towards CD36 as the GHRP-6 prototype, but without binding affinity to the GHS-R1a receptor.^{106,77} Their ligand-receptor interaction has also been supported by photoaffinity¹⁷¹ and surface plasmon resonance studies.¹⁷² In particular, respective replacement of azaPhe and azaTyr for the Trp⁴ residue of GHRP-6 in [A¹, azaF⁴]- and [azaY⁴]-GHRP-6 (**3.1a** and **3.2b**) preserved binding affinity to CD36 and decreased by a thousand-fold binding affinity to GHS-R1a.⁸ Conformational analysis of aza-GHRP analogs, such as (**3.1a**) and (**3.2b**), using circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in solution indicated that in contrast to the random coil conformation presented by GHRP-6, the azapeptides exhibited curve shapes, solvent-shielded amide NHs, and through-space rotating frame nuclear Overhauser effects (ROE) indicative of turn conformations, which may be responsible for their selectivity and affinity.^{106,77} The turn geometry of the azapeptides is expected to

arise from the combination of urea planarity and lone pair-lone pair repulsion between the adjacent nitrogen of the diacylhydrazine in the semicarbazide residue.^{32,173}

Examination of the influence of azapeptide GHRP-6 analogs on neovascularization relative to control in a microvascular sprouting assay on mouse choroidal explants demonstrated that **(3.1a)** and **(3.2b)** exhibited divergent behavior.^{106,76} Relative to control, [A¹, azaF⁴]- and [azaY⁴]-GHRP-6 (**3.1a** and **3.2b**) caused respectively a slight increase and significant reduction in neovascularization. Considering the similar CD curve shapes for **(3.1a)** and **(3.2b)**, their common conformational preferences were inconsistent with their divergent behavior on angiogenesis. The combination of the CD36 selectivity and divergent activity on neovascularization in the microvascular sprouting assay made azapeptides **(3.1a)** and **(3.2b)** interesting leads for exploring the importance of the *N*-terminal and 4-position residues on azapeptide biological activity.

Here, we report the synthesis and the biological activity of twenty-five azapeptide GHRP-6 analogs in which alanine and histidine were respectively introduced at the first position and various aromatic side chains were installed on the aza-amino acid at the fourth position in the sequence. In addition to their CD36 binding affinity and their activities on vascular sprouting, the 25 aza-GHRP-6 analogs were first examined for potential to curb macrophage-driven inflammation. Capacity to modulate CD36 mediated overproduction of nitric oxide (NO) in macrophage cells was measured after treatment with the TLR-2-agonist fibroblast-stimulating lipopeptide (R-FSL-1). A mediator of inflammatory responses in macrophages, NO is used against pathogenic microbes, but may damage host tissues.¹⁷⁴ Nitric oxide can be effectively measured as nitrite as a marker of the modulation of the inflammatory pathway. Moreover, in studies of cyclic azapeptides,¹⁴⁸ reduction of nitrite production was correlated with binding affinity, as well as decreased production of pro-inflammatory cytokines and chemokines in macrophages. The important role of CD36 in the phagocytosis of debris (e.g., modified lipoproteins and drusen),¹⁷⁵ and in the activation of macrophages,^{176,177} indicate that targeting macrophage signaling pathways may offer promise for countering the chronic inflammation underlying diseases such as cancer, atherosclerosis and

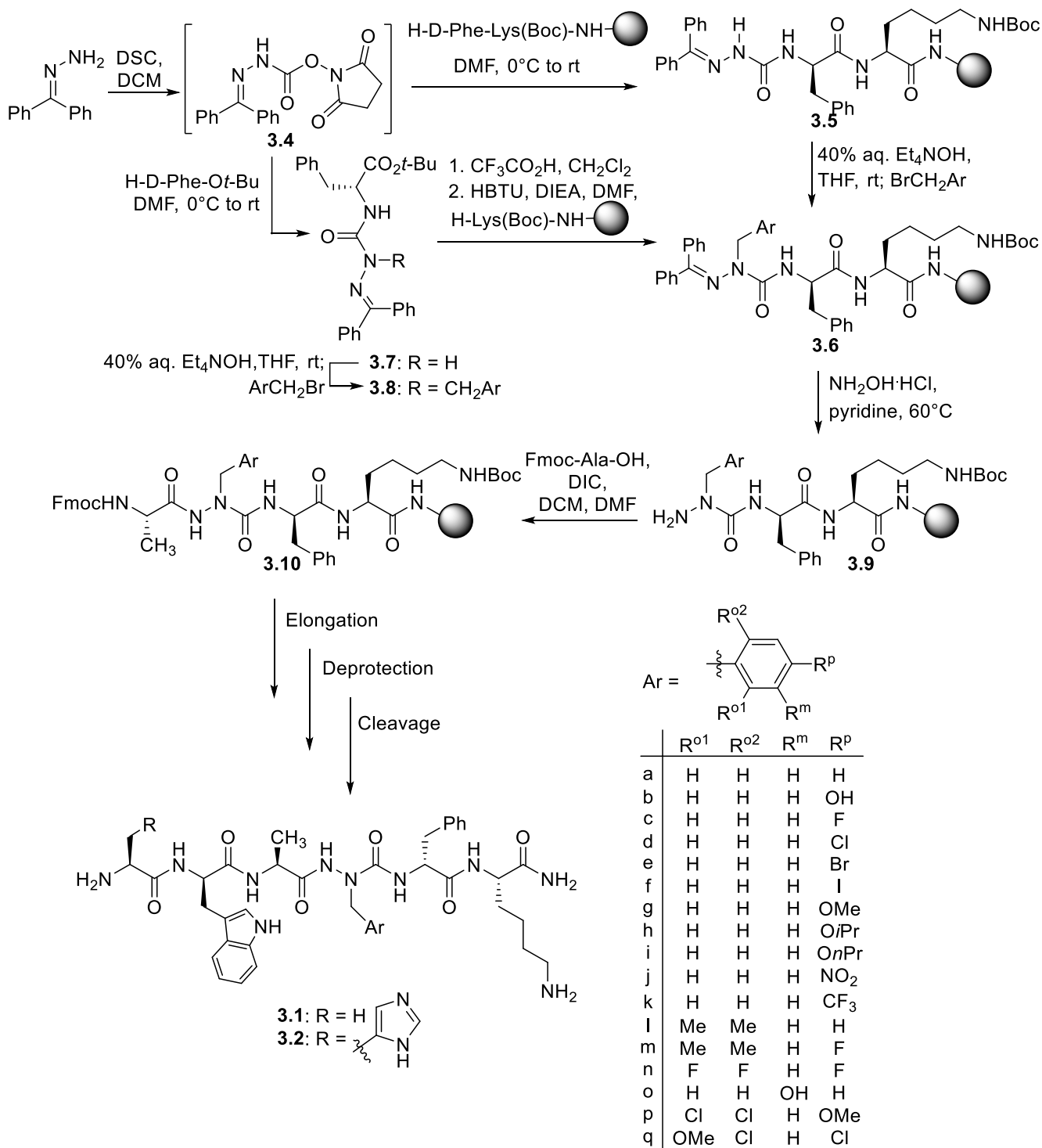
age-related macular degeneration.¹⁷⁸ Assessment of their ability to reduce NO overproduction was thus employed for selecting modulators that were subsequently examined for their binding affinity and their activity on neovascularization.

3.4. RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry. Replacement of the Trp⁴ residue in the GHRP-6 sequence for azaPhe derivatives was accomplished using two different approaches involving respectively the alkylation of a resin-bound aza-glycine semicarbazone with different aromatic alkyl halides, and the use of a solution-phase method in which aza-dipeptide building blocks were assembled prior to incorporation into the peptide sequence by solid-phase synthesis (Scheme 1).^{107,72} In addition, aza-1,2,3-triazole-3-alanine⁴-GHRP-6 (**3.3**) was prepared by a solid-phase route featuring copper-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition of trimethylsilylazide onto an aza-progargylglycine residue (**Scheme 2**).⁹⁹ Key for the introduction of the aza-residue in all of these sequences was the use of the so-called submonomer azapeptide synthesis in which an activated methyldiene carbazate was used to acylate an amino acid residue to provide a semicarbazone intermediate that could be selectively deprotonated and alkylated.¹⁷⁹ Subsequent removal of the hydrazone and acylation of the resulting semicarbazide was then used to elongate the azapeptide sequence. Benzhydrylidene carbazate (**3.4**) was synthesized by activating benzophenone hydrazone with *N,N'*-disuccinimidyl carbonate (DSC) and coupled respectively to D-phenylalaninyl-*N*^E-(Boc)lysineamide linked to Rink amide resin and *tert*-butyl D-phenylalaninate to obtain aza-glycine resin-bound tripeptide (**3.5**) and dipeptide (**3.7**) (Scheme 1).⁷⁸ As previously reported, application of DSC instead of phosgene or *para*-nitrophenyl chloroformate minimized

formation of side products such as symmetric urea to provide better yields of aza-glycinyll dipeptide.^{70,73}

Schéma 3.1: Synthesis of [A¹, azaF⁴]-GHRP-6 and [azaF⁴]-GHRP-6 analogs **(3.1)** and **(3.2)**.



Resin-bound aza-glycine (**3.5**) was treated with tetraethylammonium hydroxide (40% aq. solution) in THF using the respective alkyl halide: benzyl bromide, and 4-*tert*-butyldimethylsilyloxy-, 4-bromo-, 4-fluoro-, 4-chloro-, 4-iodo, 4-nitro-, 4-trifluoromethyl-, 4-methoxy-, 2,6-dimethyl-, 2,6-dimethyl-4-

fluoro-, 2,4,6-trifluoro- and 3-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-benzyl bromides or 4-methoxybenzyl chloride. The respective azatripeptides (**3.6**) were ascertained to be produced in 20-90% conversion by cleavage of a resin aliquot with a freshly made solution of TFA/H₂O/triethylsilane (TES; 95/2.5/2.5), removal of the resin by filtration, and analysis of the residue by LC-MS.⁷⁶

Alternatively, in solution, azadipeptide **7** was treated with tetraethylammonium hydroxide (40% aq. solution) in THF and alkylated with the respective benzyl bromide: 4-propoxy-, 4-isopropoxy-, 2,6-dichloro-4-methoxy- and 2,4-dichloro-6-methoxybenzyl bromides. 2,6-Dichloro-4-methoxy- and 2,4-dichloro-6-methoxybenzyl bromides were synthesized by chloromethylation of 5,5-dichloroanisole, followed by hydrolysis to provide separable benzyl alcohols,¹⁸⁰ and conversion to the respective bromides using phosphorus tribromide in dichloromethane [see supporting information (SI)].¹⁸¹ Aza-phenylalanine dipeptides (**3.8h**), (**3.8i**), (**3.8p**) and (**3.8q**) were isolated in 90-96% yields respectively after chromatography. The solution-phase approach facilitated monitoring of the alkylation and provided building blocks for incorporation onto the resin-bound peptide. In the cases of (**3.8h**) and (**3.8i**), the alkylation was subsequently performed on resin as described above.

Esters (**3.8p**) and (**3.8q**) were quantitatively converted to the corresponding acids with 50% trifluoroacetic acid in dichloromethane. Although benzhydrylidene-aza-4-ethoxy- and 2,6-dimethyl-4-methoxy-phenylalaninyl-D-phenylalanine *tert*-butyl esters were also synthesized in 99% and 96% yields respectively, ester solvolysis with TFA caused concomitant side chain removal to give the corresponding aza-glycinyl-phenylalanines.³² Aza-dipeptides were coupled onto *N*^ε-(Boc)-lysine resin using 2-(*1H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) and Hünig's base in DMF to furnish aza-tripeptides (**3.6p**) and (**3.6q**).

Semicarbazone resins (**3.6**) were converted to their respective semicarbazides (**3.9**) by sonication with hydroxylamine hydrochloride in pyridine at 60°C for 16h.⁷⁶ Acylation of semicarbazide resin (**3.9**) swollen in DMF was performed using the symmetric anhydride that was formed on treatment of *N*-

(Fmoc)-alanine with diisopropylcarbodiimide (DIC) in dichloromethane. Aza-tetrapeptides (**3.10**) were subsequently elongated by standard Fmoc-based solid-phase peptide synthesis.⁸⁹

Final peptides were cleaved from the resin on treatment with TFA: H₂O: TES (95: 2.5: 2.5 v/v/v) for 2h.

The resin was filtered and washed several times with TFA, and the combined filtration and washings were concentrated, and diluted with Et₂O to precipitate azapeptides, that were dissolved in 1:9 MeOH/H₂O, freeze-dried, and analyzed and purified by HPLC on a C₁₈ column (Table 1). Low yields of [*O*-*n*- and *i*-propyl-azaY⁴]-GHRP-6 analogs (**3.2h**) and (**3.2i**) were obtained likely because of loss of the respective 4-alkyloxybenzyl carbocations during resin cleavage.⁴²

Tableau 3.1: Purity, retention times and mass of [azaF4]-GHRP-6 analogues

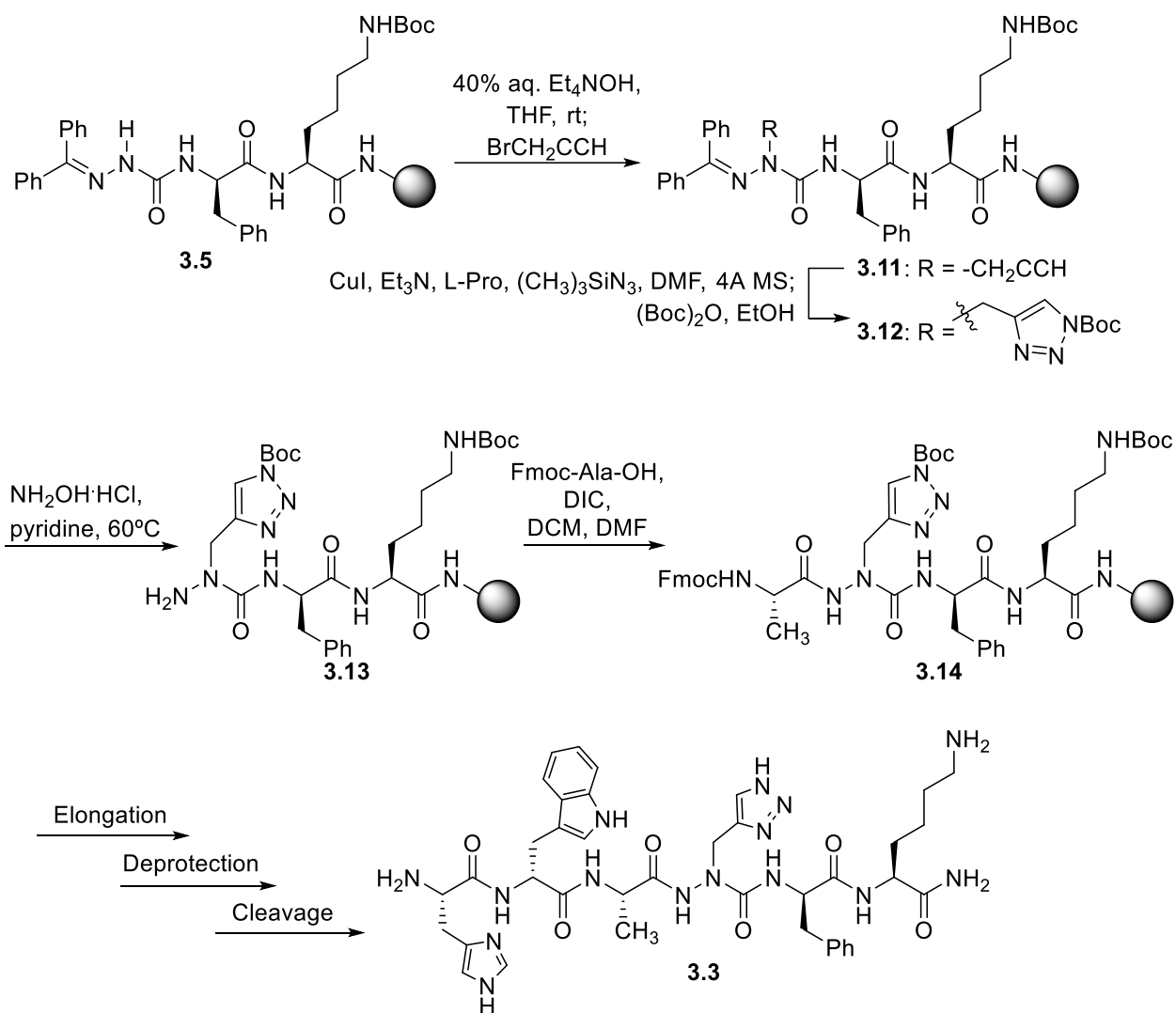
Compounds	RT (min) in		Purity at 214 nm	MS [M+1]	
	CH ₃ OH	CH ₃ CN		m/z (calc.)	m/z (obs.)
3.1a H-Ala-D-Trp-Ala-azaPhe-D-Phe-Lys-NH ₂	10.6	15.9	> 99	778.4	778.4 ¹⁰⁶
3.1b H-Ala-D-Trp-Ala-azaTyr-D-Phe-Lys-NH ₂	13.4 ^a	4.0 ^d	> 99	785.4093	785.4103
3.1d H-Ala-D-Trp-Ala-aza (4-chloro)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	7.3 ^b	7.0 ⁱ	> 99	825.3574	825.3584
3.1e H-Ala-D-Trp-Ala-aza(4-bromo)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	7.8 ^b	5.4 ^j	> 99	869.3069	869.3052
3.1f H-Ala-D-Trp-Ala-aza(4-iodo)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	7.8 ^m	8.2 ⁱ	> 99	895.3110	895.3105
3.1g H-Ala-D-Trp-Ala-aza(4-methoxy)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	13.4 ^p	9.0 ^j	> 99	821.4069	821.4052
3.1j H-Ala-D-Trp-Ala-aza(4-nitro)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	7.2 ^s	13.9 ^t	> 99	836.3814	836.3809
3.1k H-Ala-D-Trp-Ala-aza(4-trifluoromethyl)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	11.3	11.8 ^j	> 99	837.4018	837.4032
3.2a H-His-D-Trp-Ala-azaPhe-D-Phe-Lys-NH ₂	8.9 ^a	15.1 ^b	> 99	835.4362	835.4374
3.2b H-His-D-Trp-Ala-azaTyr-D-Phe-Lys-NH ₂	8.2 ^a	8.2 ^c	> 99	851.4311	851.4322
3.2c H-His-D-Trp-Ala-aza(4-fluoro)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	11.8 ^a	5.1 ^c	> 99	853.4268	853.4269
3.2d H-His-D-Trp-Ala-aza(4-chloro)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	6.7 ^f	4.8 ^g	> 99	869.3972	869.3967
3.2e H-His-D-Trp-Ala-aza(4-bromo)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	3.5 ^h	6.1 ^k	> 99	457.1770	457.1766
3.2f H-His-D-Trp-Ala-aza(4-iodo)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	8.4 ^l	5.7 ^d	> 95	983.3148	983.314 ^v
3.2g H-His-D-Trp-Ala-aza(4-methoxy)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	7.6 ⁿ	6.9 ^o	> 99	865.4468	865.4467

3.2h	H-His-D-Trp-Ala-aza(4-isopropoxy)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	5.3 ^f	3.8 ^g	> 95	893.4781	893.4764
3.2i	H-His-D-Trp-Ala-aza(4- <i>n</i> -propoxy)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	4.7 ^f	4.2 ^h	> 99	447.2427	447.2442 ^z
3.2j	H-His-D-Trp-Ala-aza(4-nitro)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	7.6 ^f	3.9 ^c	> 99	880.4213	880.4196
3.2k	H-His-D-Trp-Ala-aza(4-trifluoromethyl)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	14.0 ^p	4.9 ^d	> 99	903.4236	903.4238
3.2l	H-His-D-Trp-Ala-aza(2,6-methyl)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	5.3 ^u	6.2 ^v	> 99	885.4494	885.4489 ^y
3.2m	H-His-D-Trp-Ala-aza(4-fluoro-2,6-methyl)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	5.5 ^f	5.6 ^e	> 99	441.2327	441.2348
3.2n	H-His-D-Trp-Ala-aza(2,4,6-trifluoro)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	6.2 ^f	6.0 ^e	> 99	445.2076	445.2092 ^z
3.2o	H-His-D-Trp-Ala-aza(3-hydroxy)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	5.5 ^f	2.6 ^e	> 99	426.2192	426.2208 ^z
3.2p	H-His-D-Trp-Ala-aza(2,6-dichloro-4-methoxy)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	5.0 ^f	6.0 ^e	> 99	467.18881	467.1902 ^z
3.2q	H-His-D-Trp-Ala-aza(2,4-dichloro-6-methoxy)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	6.4 ^f	6.3 ^e	> 99	467.18881	467.1900 ^z
3.3	H-His-D-Trp-Ala-aza-1,2,3-triazole-3-Ala-D-Phe-Lys-NH ₂	7.7 ^w	8.8 ^x	> 99	826.4220	826.4211

Isolated purity ascertained by LC-MS using gradients of X-Y% A [H₂O (0.1% FA)/MeOH (0.1% FA)] or B [H₂O (0.1% FA)/MeCN (0.1% FA)] over Z min: ^a20-50% B/20; ^b15-30% B/20; ^c10-40% B/14; ^d10-50% B/14; ^e5-50% B/14; ^f10-80% A/14; ^g10-80% B/14; ^h25-50% A/14; ⁱ25-45% B/14; ^j20-40% B/14; ^k25-35% B/14; ^l30-50% A/20; ^m40-60% A/20; ⁿ25-45% A/14; ^o10-35% B/14 min; ^p10-50% A/20; ^q5-80% B/14; ^r10-30% A/14; ^s35-55% A/20; ^t20-30% A/14min ^u30-60% A/14 min, ^v15-40% B/12, ^w0-50% A/14; ^x0-30% B/14. ^y[M+Na]⁺; ^z[M+2H]²⁺/2.

[Aza-1,2,3-triazole-3-alanine⁴]-GHRP-6 (**3.3**) was synthesized by a route featuring propargylation of azapeptide resin (**3.5**) and copper catalyzed azide alkyne cycloaddition (Scheme 2).^{99,95} Benzhydrylidene aza-propargylglycine (**3.11**) was prepared by alkylation of resin (**3.5**) swollen in THF using tetraethylammonium hydroxide (40% aq. solution) and propargyl bromide.⁷⁰ Aza-1,2,3-triazole-3-alanine (**3.12**) was obtained by reacting aza-propargylglycine resin (**3.11**) with azidotrimethylsilane in the presence of copper iodide, L-proline and trimethylamine in DMF, followed by triazole protection with (Boc)₂O in THF.^{99,182-183} Aza-triazole-alanine⁴-GHRP-6 (**3.3**) was isolated after removal of the benzhydrylidene protection, acylation of the resulting semicarbazide (**3.13**), azapeptide elongation, cleavage and purification, all which were performed as discussed above for the synthesis of analogs (**2.3**). (Tableau 3.1).

Schéma 3.2 : Synthesis of [aza-1,2,3-triazole-3-alanine]-GHRP-6 (**3.3**)



Biological Results. The structure-activity relationships dictating the divergent behavior of [A¹, azaF⁴]- and [azaY⁴]-GHRP-6 (**3.1a** and **3.2b**) on angiogenesis were probed by the synthesis and evaluation of twenty-five azaPhe⁴-GHRP-6 analogs possessing respectively His¹ or Ala¹. In addition to the relevance of the imidazole at the one position, modifications of the azaPhe⁴ side chain were performed to explore the influence of location, size, electronegativity, polarizability and hydrogen bonding potential of the aromatic ring substituents. Moreover, analogs possessing 2,6-dimethyl substituents were prepared to study the influence of the χ -dihedral angle on activity.²² The scope of aza-residues with electron rich

aromatic rings was however limited due loss of the side chain as a stabilized carbocation under the acidic conditions employed for peptide cleavage.⁴²

Initially, the 25 analogues were first examined for their ability to modulate NO overproduction in macrophage cells elicited by the TLR-2 agonist R-FSL-1.¹⁴⁸ Based on their efficacy in reducing NO production, the top 15 analogs were then selected and their binding affinity for CD36 was examined using a competition binding assay against photoactivatable [¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexarelin (H-His-D-2-methyl-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) as radiotracer.^{106,148} The influence on angiogenesis of the top 15 analogues was finally examined to document specific structure-activity relationships (SAR) using a modified bioassay from that previously reported.¹⁰⁶ The sclera/choroid/RPE complex was employed in the bioassay to document their modulatory effect on angiogenic activity. This angiogenic bioassay that uses the total choroid/RPE complex is more physiologically relevant than that which employs the choroid alone, because the RPE/choroid interaction is essential for the regulation, maintenance and integrity of the choroid.^{184,185}

The ability of the [azaF⁴]-GHRP-6 analogs to inhibit NO production induced by the TLR-2 agonist R-FSL-1 was performed in both RAW and J774 macrophage cell lines (Figure 1). The [A¹, azaF⁴]-GHRP-6 analogs (**3.1**) exhibited an inhibitory effect over R-FSL-1-induced nitrite production in macrophages except for the 4-iodo and 4-trifluoromethyl analogs (**1f**) and (**1k**) (Figures 1A and 1B). Similarly, many of the [azaF⁴]-GHRP-6 analogs **2** exhibited noteworthy inhibition of R-FSL-1-induced NO production relative to the controls, except for the parent analog (**3.2a**), and its 4-iodo (**3.2f**), 4-*iso*-propoxy (**3.2h**), 4-nitro (**2j**), 4-trifluoromethyl (**3.2k**), 2,4,6-trifluoro (**3.2n**), and dichloro-methoxy (**3.2p** and **3.2q**) counterparts, which did not show significant inhibitory effect. In addition, aza-triazole-alanine⁴-GHRP-6 (**3.3**) had no influence on NO production.

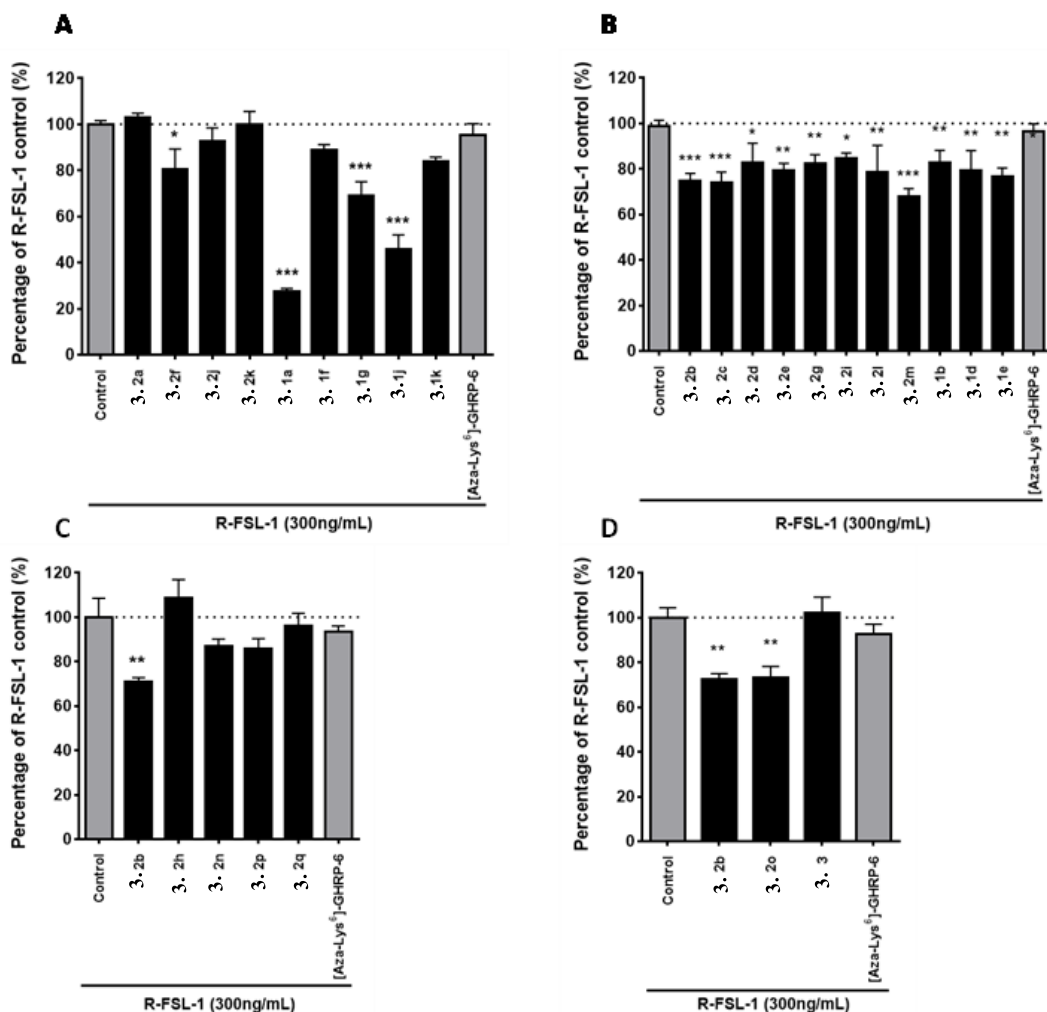


Figure 3.1 : Effects of [aza-F4]-GHRP-6 analogues on the overproduction of nitric oxide (NO) induced by the TLR-2 agonist R-FSL-1 in J774 (A) and RAW (B-D) macrophage cell line. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$ vs R-FSL-1 control

Analogues possessing Ala¹ and His¹ reduced NO production contingent on the azaPhe⁴ side chain, with a preference for small electronegative substituents. The location of the hydroxyl substituent in the *para*- or *meta*-position (e.g., **3.2b** and **3.2o**) did not influence ability to reduce NO production. Moreover, 2,6-dimethyl substituents, which may restrain χ -space favoured reduction of NO production (e.g., (**3.2l**) and (**3.2m**). Strikingly, the parent azaPhe⁴ analogues (**3.1a**) and (**3.2a**) exhibited divergent behavior: the former exhibited significant capacity to reduce NO production and the latter was without activity. In addition

to significantly active analogs, such as **1a**, the binding affinity and activity on vascularization of **2a** were thus further examined.

The ability of [azaF⁴]-GHRP-6 analogs to compete with the radiolabeled [¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexarelin for CD36 binding was tested on purified membranes from rat heart as source of CD36 (Figures 2 and 3). The binding affinity differed only by a factor of 17 among these analogs having relatively similar structures. Among the best CD36 binders, [azaY⁴]-GHRP-6 (**3.2b**) and its *O*-*n*-propyl counterpart (**3.2i**) displayed similar affinity as hexarelin, with IC₅₀ values of 1.93 and 1.65 μM, respectively (Table 2 and Figures 3.3A and 3.3 C).

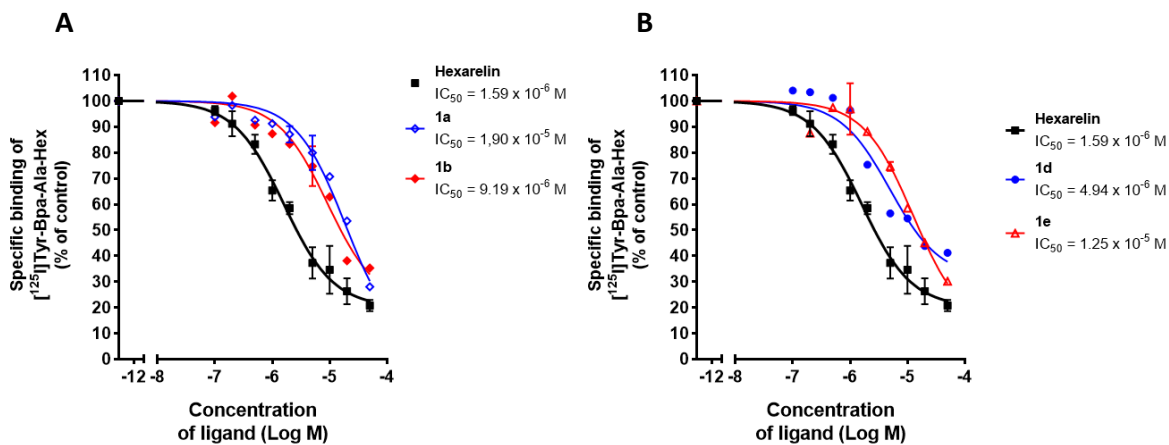


Figure 3.2 : Competition curves of [A1, aza-F4]-GHRP-6 analogs (**3.1**) for binding of photoactivable [¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexarelin in rat cardiac membrane

3.
3.

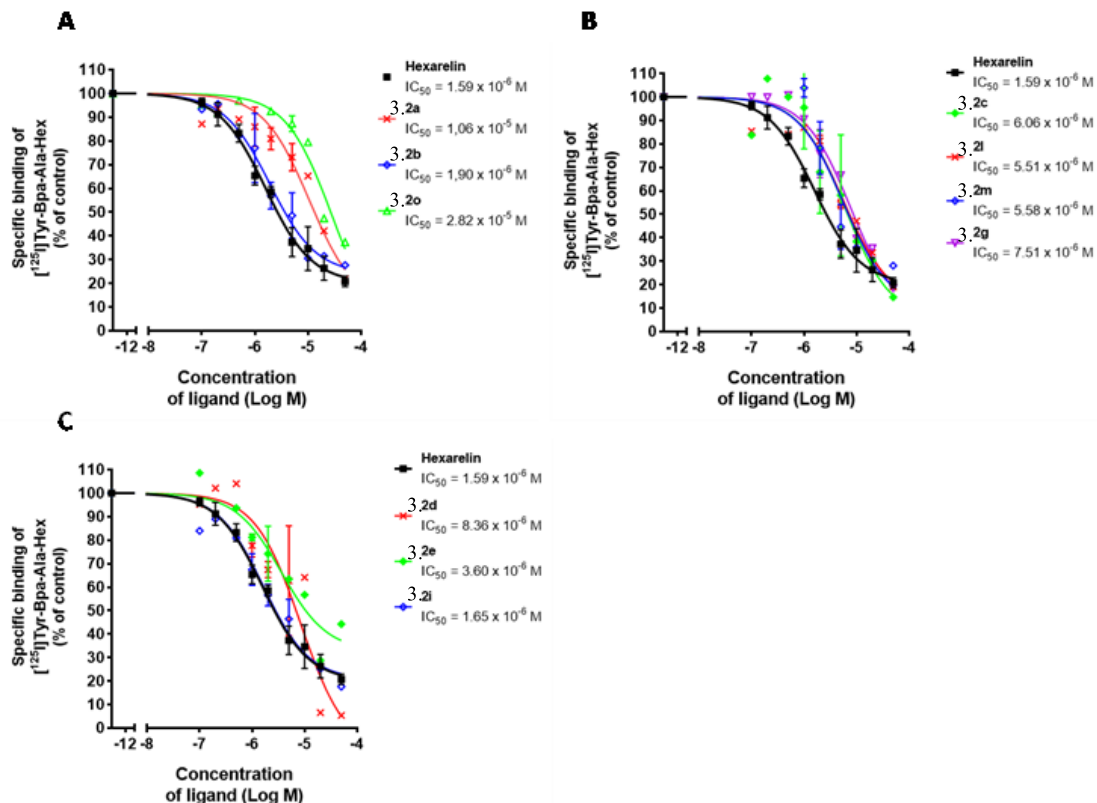


Figure 3.3 : Competition binding curves of [aza-F⁴]-GHRP-6 analogs (**3.2**) for binding of photoactivable [¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexarelin in rat cardiac membrane.

The imidazole at the 1-position enhanced typically CD36 affinity by a factor of 2-5 as shown in comparisons of the Ala¹ and His¹ analogs possessing azaPhe⁴, azaTyr⁴ and aza(*p*-Br)Phe⁴ residues **3.1a,b,e** and **3.2a,b,e** (Table 2). On the other hand, in the case of aza(*p*-Cl)Phe⁴, the Ala¹ analog (**3.1d**) exhibited 2-fold better affinity than its His¹ counterpart **2d**. The nature of the *para*-substituent influenced affinity differently in the Ala¹ (Cl > OH > Br > H) and His¹ (*On*-Pr > OH > Br > F > OMe > Cl > H) series, but typically improved binding affinity. Moreover, the ring position influenced dramatically affinity as observed in the nearly 15-fold difference in the affinities of the *para* and *meta* hydroxyl analogs (**3.2b**) and (**3.2o**) (IC₅₀ 1.9 vs 28.2 μM). Finally, the favourable impact on binding of the 2,6-

dimethyl substituents, which may restrict motion about the side chain χ -dihedral angles, was tempered by the presence of a *para*-substituent. Adding 2,6-dimethyl substituents gave a 2-fold enhancement in binding affinity in azaPhe⁴ analogs ((**3.2l**) vs (**3.2a**); IC₅₀ 5.51 vs 10.6 μ M), yet had little impact on the aza(*p*-F)Phe⁴ derivatives ((**3.2m**) vs (**3.2c**); IC₅₀ 5.58 vs 6.06 μ M).

Tableau 3.2: IC₅₀ binding values for CD36 receptors and angiogenic activity of selected analogues

Number	Aza-peptides	IC ₅₀ (μ M)	factor	Angiogenic activity
Reference	Hexarelin	1.56 \pm 0.25	18.1	
3.2i	H-His-D-Trp-Ala-aza(4- <i>n</i> -propoxy)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	1.65 \pm 0.33	17.1	(+)
3.2b	H-His-D-Trp-Ala-azaTyr-D-Phe-Lys-NH ₂	1.90 \pm 0.42	14.8	(-)
3.2e	H-His-D-Trp-Ala-aza(4-bromo)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	3.60 \pm 1.34	7.8	(t-)
3.1d	H-Ala-D-Trp-Ala-aza(4-chloro)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	4.94 \pm 1.64	5.7	(t-)
3.2l	H-His-D-Trp-Ala-aza(2,6-methyl)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	5.51 \pm 1.27	5.1	(na)
3.2m	H-His-D-Trp-Ala-aza(4-fluoro-2,6-methyl)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	5.58 \pm 2.99	5.0	(na)
3.2c	H-His-D-Trp-Ala-aza(4-fluoro)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	6.06 \pm 2.81	4.6	(-)
3.2g	H-His-D-Trp-Ala-aza(4-methoxy)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	7.51 \pm 1.42	3.7	(t-)
3.2d	H-His-D-Trp-Ala-aza(4-chloro)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	8.36 \pm 3.74	3.4	(t+)
3.1b	H-Ala-D-Trp-Ala-azaTyr-D-Phe-Lys-NH ₂	9.19 \pm 2.56	3.1	(na)
3.2a	H-His-D-Trp-Ala-azaPhe-D-Phe-Lys-NH ₂	10.06 \pm 3.32	2.8	(na)
3.1e	H-Ala-D-Trp-Ala-aza(4-bromo)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	12.5 \pm 4.53	2.2	(na)
3.1a	H-Ala-D-Trp-Ala-azaPhe-D-Phe-Lys-NH ₂	19.0 \pm 4.46	1.5	(na) ^d
3.2o	H-His-D-Trp-Ala-aza(3-hydroxy)Phe-D-Phe-Lys-NH ₂	28.2 \pm 11.3	1.0	(na)

(+) = pro-angiogenic; (-) = anti-angiogenic; (na) = did not affect chroidal vascular growing; (t+) = pro-angiogenic trend; (t-) = anti-angiogenic trend

Examination of the effect of aza-peptides on angiogenic activity on the sclera/choroid/RPE complex illustrated the importance of the combination of a small electronegative *para*-substituent on the azaPhe⁴ residue and a His¹ residue for reducing angiogenic sprouting (Figure 4, Table 2). For example, analogs without a small electronegative *para*-substituent (e.g., **3.1a**, **3.2a**, **3.2l** and **3.2o**) did not affect choroidal

vascular growth. Moreover, [A¹, azaY⁴]-GHRP-6 (**3.1b**) exhibited no influence on vascular sprouting, in sharp contrast to [azaY⁴]-GHRP-6 (**3.2b**) which exhibited significant antiangiogenic effect. Although [aza(*p*-F)⁴]-GHRP-6 (**3.2c**) reduced angiogenic sprouting, the related [A¹, aza(*p*-Cl)⁴]-GHRP-6 (**1d**), [aza(*p*-Br)⁴]-GHRP-6 (**3.2e**), and [aza(*p*-MeO)⁴]-GHRP-6 (**3.2g**) exhibited only trends to reduce vascular sprouting. The azapeptides [aza(*p*-Cl)⁴]-GHRP-6 (**3.2d**) and [aza(*p*-*n*PrO)⁴]-GHRP-6 (**3.2i**) demonstrated respectively a proangiogenic trend and a proangiogenic effect on vascular sprouting. The relatively larger chloride, bromide, methoxy and *n*-propoxy substituents were thus all found to perturb the antiangiogenic effect. Moreover, [A¹, aza(*p*-Br)⁴]-GHRP-6 (**3.1e**) and [aza(4-fluoro-2,6-dimethyl)⁴]-GHRP-6 (**3.2m**), both did not affect choroidal vascular growth suggesting that the larger bromide and the extra steric bulk of the dimethyl substituents also interfered respectively with antiangiogenic activity. Notably, [A¹, azaF⁴]-GHRP-6 (**3.1a**) had previously enhanced slightly angiogenesis in the sclera/choroid model,³ but showed no influence on vascular sprouting in the sclera/choroid/RPE complex likely due to the influence of angiogenic factors produced by the RPE.^{186,187,188,189}

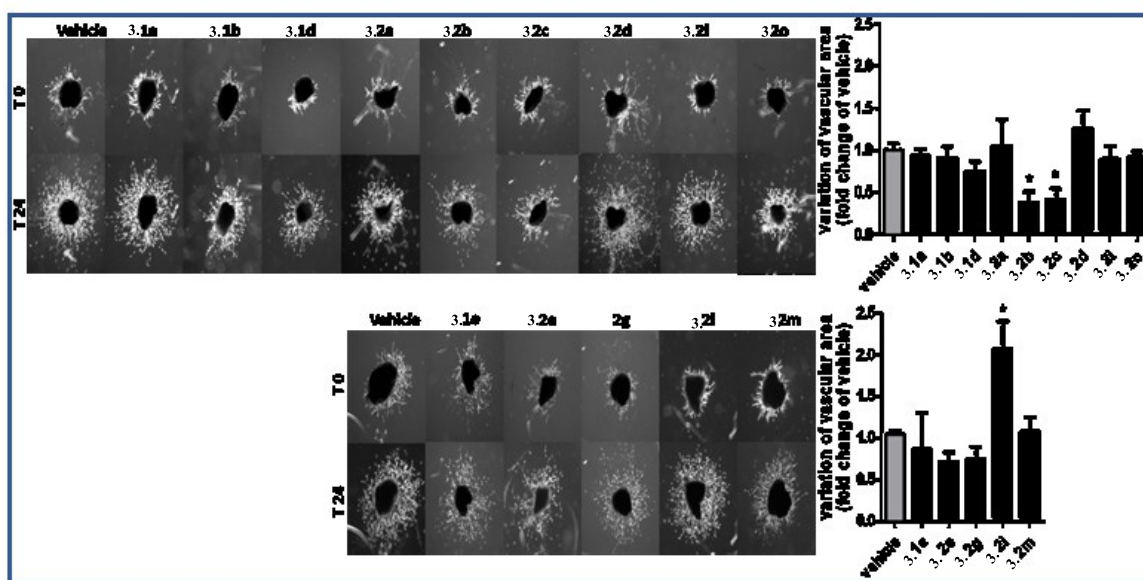


Figure 3.4 : Angiogenic effects of CD36 ligands in mouse choroidal explant model

Representative microvascular sprouting from Matrigel-embedded choroidal explants treated 24h with azapeptides (10^{-6} M). Histogram represents the quantification of the variation of choroidal sprouting areas according to the ratio (T24-T0)/T0. Values are mean \pm SEM *P < 0.05 compared to vehicle (n = 3-4).

3.5. CONCLUSION

In conclusion, submonomer synthesis has provided access to a series of azaPhe⁴-GHRP-6 analogs to examine the importance of the *N*-terminal residue and aromatic side chain of the aza-residue for binding affinity, and anti-inflammatory and anti-angiogenic activity. Although removal of the imidazole moiety by replacement of His¹ with Ala¹ gave analogs exhibiting capacity to reduce NO production in macrophages treated with a TLR-2 agonist as well as binding affinity towards CD36 (e.g., **3.1d**, IC₅₀ 4.94 μ M), their ability to inhibit neovascular sprouting was significantly impaired. Small electronegative substituents at the *para*-position of the aromatic side chain of the aza-residue tended to favour affinity and activity in both the [A¹, azaF⁴]- and [azaF⁴]-GHRP-6 series. Combining these positive benefits, the His¹ analogs [azaY⁴]-GHRP-6 (**3.2b**) and [aza(4-F)F⁴]-GHRP-6 (**3.2c**) exhibited high binding affinity to CD36 (IC₅₀ 1.90 and 6.06 μ M), as well as significant ability to reduce NO production in macrophages and to inhibit choroidal vascular sprouting. The potential for the hydroxyl group of the aza-tyrosine residue to form a hydrogen bond with the receptor may account for its greater binding affinity than the less polarizable fluoride of the *para*-fluorophenylalanine residue.¹⁹⁰ This study has thus provided fundamental insight into the structural requirements for CD36 modulation as well as two important lead compounds [azaY⁴]- and [aza(4-F)F⁴]-GHRP-6 (**3.2b** and **3.2c**) towards the search for therapeutics to target macrophage-driven inflammation and angiogenesis. The chemical-biology underlying the mechanism of action of these CD36 modulators as well as their therapeutic potential in animal models are currently under investigation and will be reported in due time.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials and Methods. Unless specified, all reactions in solution were run under argon at ambient atmosphere. Chromatography was on 230-400 mesh silica gel. 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. ^1H NMR spectra were measured in CDCl_3 at 400 MHz and referenced to CDCl_3 (7.26 ppm); ^{13}C NMR spectra were measured in CDCl_3 at 75 MHz and referenced to CDCl_3 (77.0 ppm). Coupling constants, J values were measured in Hertz (Hz) and chemical shift values in parts per million (ppm). Specific rotations, $[\alpha]_{\text{D}}$ were measured at 25°C at the specified concentrations (c in g/100 mL) using a 1 dm cell on a Perkin Elmer Polarimeter 589 and expressed using the general formula: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = (100 \times \alpha)/(d \times c)$. High resolution mass spectral analyses were obtained by the Centre régional de spectroscopie de masse de l'Université de Montréal. Either protonated molecular ions $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+2\text{H}]/2^+$ or sodium adducts $[\text{M}+\text{Na}]^+$ were used for empirical formula confirmation.

Polystyrene Rink Amide resin (0.5 mmol/g) was purchased from Advanced Chemtech™, and the manufacturer's reported loading of the resin was used in the calculation of the yields of the final products. Reagents such as benzophenone hydrazone, benzyl bromide, 4-bromobenzyl bromide, 4-fluorobenzyl bromide, 4-chlorobenzyl bromide, 4-iodobenzyl bromide, 4-nitrobenzyl bromide, 4-trifluoromethylbenzyl bromide, 4-methoxybenzyl bromide or 4-methoxybenzyl chloride, iodopropane, 2-iodopropane, 80% propargyl bromide in toluene, 2,6-benzylaldehyde, 3,5-dichlorophenol, 4-hydroxybenzaldehyde, 3-hydroxybenzaldehyde, 1-fluoro-3,5-dimethylbenzene, 2,4,6-trifluorobenzaldehyde, hydroxylamine hydrochloride,

pyridine, piperidine, formic acid (FA), *N,N*-diisopropylethylamine and *N,N'*-disuccinimidyl carbonate (DSC), all were purchased from Aldrich and used without further purification. 4-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)benzyl bromide,¹⁸¹ 2,4,6-trifluorobenzylbromide,¹⁹¹ 2,6-dimethylbenzyl bromide,¹⁹² 4-propoxybenzyl bromide,¹⁹³ ethoxybenzyl bromide,¹⁹³ 4-isopropoxybenzyl bromide¹⁹⁴ and 2,6-dimethyl-4-fluorobenzyl bromide,¹⁹⁵ all were synthesized according to the literature (see SI for representative examples).

Thin-layer chromatography was performed on silica gel 60 F254 plates from Merck™. All the amino acids and coupling reagents such as HBTU and diisopropylcarbodiimide (DIC) were purchased from GL Biochem™ and used as received. All solvents were obtained from VWR international. Anhydrous solvents (THF, DMF, CH₂Cl₂, and CH₃OH) were obtained by passage through solvent filtration systems (GlassContour, Irvine, CA).

Azapeptide purification and analysis. Azapeptides were purified on a semi-preparative column (C18 Gemini column™) using the appropriate gradient from pure water (0.1% FA) to mixtures with MeOH (0.1% FA) at a flow rate of 10mL/min. Purity of azapeptides (>95%) was assessed using analytical LC-MS on a 5 μM, 50 mm x 4.6 mm C18 Phenomenex Gemini column™ with a flow rate of 0.5 mL/min using the appropriate linear gradient in two different solvent systems: water (0.1% FA) with CH₃CN (0.1% FA) and water (0.1% FA) with MeOH (0.1% FA).

Fmoc deprotection and peptides analysis. Peptide synthesis was performed on an automated shaker using polystyrene Rink amide resin (0.5 mmol/g 75-100 mesh). Removal of Fmoc group was performed by treating the resin with 20% piperidine in DMF for 30 min. The resin was washed sequentially with DMF (3 x 10 mL), MeOH (3 x 10 mL), THF (3 x 10 mL), and DCM

(3 x 10 mL). The quality of the reaction was assessed with a Kaiser Test for the coupling of the first and second amino acids to provide D-Phe-Lys(Boc) Rink amide resin.⁹ Conversion in all remaining coupling reactions were ascertained by LC-MS analysis after dissolution of the dry peptide in methanol (0.5mL). To obtain sample of deprotected peptides for analysis, unless described otherwise, a 5mg aliquot of resin was treated with TFA/TES/H₂O (95:2.5:2.5, v/v/v, 0.5 mL) on the shaker for 30 min, filtered, and the filtrate was evaporated under reduced pressure dissolved in methanol and evaporated to dryness.

Representative deprotection, cleavage and purification of azapeptide: H-His-D-Trp-Ala-aza(2,6-dichloro-4-methoxy)Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.2p). In a plastic syringe tube equipped with Teflon™ filter, stopper and stopcock, *N*-Boc-His(Trt)-D-Trp(Boc)-Ala-aza(2,6-dichloro-4-methoxy)Phe-D-Phe-Lys(Boc)-NH-Rink amide resin (1618 mg, 0.53 mmol) was treated with a freshly made solution of TFA/H₂O/TES (95:2.5:2.5, v/v/v, 10 mL). The syringe was closed properly and shaken for 2 h at room temperature, and filtered. The filtrate was concentrated, dissolved in Et₂O, cooled to -30 °C and centrifuged (1200 RPM) for 10 min. The solution was decanted and the pellet was dissolved in water and freeze-dried to provide azapeptide, that was dissolved in a 10% H₂O/methanol solution and analyzed by LC-MS on a Gemini™ C18 reverse-phase column (150 × 4.60 mm, 5 μm) using a flow rate of 0.5 mL/min and gradient between 5-80% MeOH (0.1% FA) in water (0.1% FA). The azapeptide was purified on a Waters™ PrepLC instrument equipped with a reverse-phase Gemini™ C18 column (250 × 21.2 mm, 5 μm) using a binary solvent system consisting of [5-80% methanol (0.1% FA) in water (0.1% FA) over 60 min] at a flow rate of 10 mL/min with UV detection at 214 nm. The collected fractions were combined, and freeze-dried to a white powder and analyzed for purity (Table 1) by LC-MS on a Gemini™ C18 reverse-phase column (150 × 4.60 mm, 5 μm), using

a flow rate of 0.5 mL/min and a gradient of 0-95% CH₃CN (0.1% FA) or 10-80% MeOH (0.1% FA) in water (0.1% FA).

Benzhydrylidene-aza-glycinyl-D-phenylalaninyl-N^ε-(Boc)lysine Rink amide resin (3.5).

Benzophenone hydrazone (3.3 eq., 0.589 g, 3 mmol) in dichloromethane (4 mL) was cooled to 0°C, and treated dropwise over 15 min with a solution of *N,N*-disuccinimidyl carbonate (3 eq., 0.699 g, 2.73 mmol) in DMF (3.9 mL) and DCM (8 mL). After stirring for 30 min, the ice bath was removed and the reaction mixture was let warm to room temperature with stirring for 1h. The resulting solution of 1-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-*N'*-(diphenylmethyldiene) carbazate (**3.4**) was cooled to 0 °C, and treated with DIEA (6 eq., 0.901 mL, 5.45 mmol). The resulting suspension was quickly transferred to a plastic syringe tube equipped with Teflon™ filter, stopper and stopcock containing D-Phe-Lys(Boc) amide resin (1 eq., 2.4 g, 1 mmol, synthesized as previously described ⁷), and agitated on an automated shaker for 16 h at room temperature. The resin was filtered, washed with DMF (3 × 10 mL), MeOH (3 × 10 mL), THF (3 × 10 mL), and DCM (3 × 10 mL), dried under vacuum, and stored in the fridge. Complete reaction conversion was ascertained by LC-MS [20-80% MeOH (0.1 % FA)/H₂O (0.1 % FA), 14 min, RT 7.3 min] on a sample from evaporation of the filtrate after filtration of the cleavage product from treatment an aliquot (5 mg) using 1 mL of TFA/TES/H₂O (95:2.5:2.5, v/v/v).

Benzhydrylidene-aza-phenylalaninyl-D-phenylalaninyl-N^ε-(Boc)lysine Rink amide resin

(3.6a). Aza-glycine resin (**3.5**) (1 eq, 0.5 mmol) in a 40 mL syringe equipped with Teflon™ filter, stopcock and cap, was swollen in THF (10 mL), treated with a 40% aqueous solution of tetraethylammonium hydroxide (9 eq., 2.7 M, 0.6 mL, 4.5 mmol), and agitated for 30 min at 0°C. The resin mixture was treated with benzylbromide (9 eq, 4.5 mmol, 765 mg) and shaken

at room temperature overnight. The resin was filtered, washed and analyzed as described for resin **(3.5)** above, which indicated quantitative conversion to benzhydrylidene-aza-phenylalaninyl-D-phenylalaninyl-lysine amide **(3.6a)** [20-80% MeOH (0.1 % FA)/H₂O (0.1 % FA), 14 min, RT 8.3].

Benzhydrylidene-aza-4-(tert-butyldimethylsilyloxy)-phenylalaninyl-D-phenylalaninyl-N^ε-(Boc)lysine Rink amide resin (3.6b). Employing the protocol described above for the synthesis of resin **6a** using 4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-benzyl bromide (9 eq, 4.5 mmol, 1.35 g), azapeptide resin **(3.6b)** was analyzed by LC-MS: [20-80% MeOH (0.1 % FA)/H₂O (0.1 % FA), 14min, RT 7.22 min].

Benzhydrylidene-aza-4-fluorophenylalaninyl-D-phenylalaninyl-N^ε-(Boc)lysine Rink amide resin (3.6c). Employing the protocol described above for the synthesis of resin **(3.6a)** using 4-fluorobenzyl bromide (6 eq, 3 mmol, 564 mg), azapeptide resin **6c** was shown by LC-MS analysis [10-80% MeOH (0.1 % FA)/H₂O (0.1 % FA), 14 min, RT 8.99 min] to be quantitatively obtained.

Benzhydrylidene-aza-4-chlorophenylalaninyl-D-phenylalaninyl-N^ε-(Boc)lysine Rink amide resin (3.6d). Employing the protocol described above for the synthesis of resin **6a** using 4-chlorobenzylbromide (6 eq, 3 mmol, 609 mg), azapeptide resin **(3.6d)** was shown by LC-MS analysis [20-80% MeOH (0.1 % FA)/H₂O (0.1 % FA), 14 min, RT 8.27 min] to be quantitatively obtained.

Benzhydrylidene-aza-4-bromophenylalaninyl-D-phenylalaninyl-N^ε-(Boc)lysine Rink amide resin (3.6e). Employing the protocol described above for the synthesis of resin **(3.6a)** using 4-bromobenzyl bromide (6 eq, 3 mmol, 741 mg), azapeptide resin **(3.6e)** was shown

by LC-MS analysis [10-80% MeOH (0.1 % FA)/H₂O (0.1 % FA), 14 min, RT 8.79 min] to be quantitatively obtained.

Benzhydrylidene-aza-4-iodophenylalaninyl-D-phenylalaninyl-N^ε-(Boc)lysine Rink amide resin (3.6f). Employing the protocol described above for the synthesis of resin (3.6a) using 4-iodobenzyl bromide (6 eq, 0.92 mmol, 272 mg), azapeptide resin (3.6f) was shown by LC-MS analysis [10-90% MeOH (0.1 % FA)/H₂O (0.1 % FA), 20 min, RT 12.65 min] to be quantitatively obtained.

Benzhydrylidene-aza-4-methoxyphenylalaninyl-D-phenylalaninyl-N^ε-(Boc)lysine Rink amide resin (3.6g). Employing the protocol described above for the synthesis of resin (3.6a) using 4-methoxybenzyl bromide (9 eq, 4.5 mmol, 899 mg) azapeptide resin (3.6g) was analyzed by LC-MS [10-80% MeOH (0.1 % FA)/H₂O (0.1 % FA), 14 min, RT 8.80 min], which showed complete disappearance of aza-glycine resin (3.5) (RT 8.1 min).

Benzhydrylidene-aza-4-*iso*-propoxyphenylalaninyl-D-phenylalaninyl-N^ε-(Boc)lysine Rink amide resin (3.6h). Employing the protocol described above for the synthesis of resin (3.6a) using 4-*iso*-propoxybenzyl bromide (9 eq, 4.5 mmol, 1.03 g), azapeptide resin (3.6h) was analyzed by LC-MS [30-80% MeOH (0.1 % FA)/H₂O (0.1 % FA), 14 min, RT 7.04 min], which showed complete disappearance of aza-glycine resin (3.5) (RT 6.90 min).

Benzhydrylidene-aza-4-propoxyphenylalaninyl-D-phenylalaninyl-N^ε-(Boc)lysine Rink amide resin (3.6i). Employing the protocol described above for the synthesis of resin (3.6a) using 40% aqueous solution of tetraethylammonium hydroxide (9 eq., 2.7 M, 0.6 mL, 4.5 mmol) and 4-*n*-propoxybenzyl bromide (9 eq, 4.5 mmol, 1031 mg), azapeptide resin **6i** was analyzed by LC-MS [30-80% MeOH (0.1 % FA)/H₂O (0.1 % FA), 14 min, RT 9.77 min], which showed

complete disappearance of aza-glycine resin **5** [10-80% MeOH (0.1 % FA)/H₂O (0.1 % FA), 14 min, RT 8.01 min].

Benzhydrylidene-aza-4-(trifluoromethyl)phenylalaninyl-D-phenylalaninyl-N^ε-

(Boc)lysine Rink amide resin (3.6k). Employing the protocol described above for the synthesis of resin **6a** using 4-trifluoromethylbenzyl bromide (6 eq, 3 mmol, 710 mg), azapeptide resin **(3.6k)** was analyzed by LC-MS [20-90% MeOH (0.1 % FA)/H₂O (0.1 % FA), 20 min, RT 12.57 min], which showed quantitative conversion from aza-glycine resin **5** (RT 10.61 min).

Benzhydrylidene-aza-2,6-dimethylphenylalaninyl-D-phenylalaninyl-N^ε-(Boc)lysine Rink amide resin (3.6l). Employing the protocol described above for the synthesis of resin **(3.6a)** using 2,6-dimethylbenzyl bromide (6 eq, 3 mmol, 593 mg), azapeptide resin **(3.6l)** was analyzed by LC-MS [50-90% MeOH (0.1 % FA)/H₂O (0.1 % FA), 20 min, RT 8.66 min], which showed quantitative conversion from aza-glycine resin **(3.5)** (RT 2.82 min).

Benzhydrylidene-aza-4-fluoro-2,6-dimethylphenylalaninyl-D-phenylalaninyl-N^ε-

(Boc)lysine Rink amide resin (3.6m). Employing the protocol described above for the synthesis of resin **(3.6a)** using 4-fluoro-2,6-dimethylbenzyl bromide (6eq, 3 mmol, 645 mg), azapeptide resin **(3.6m)** was analyzed by LC-MS [20-80% MeOH (0.1 % FA)/H₂O (0.1 % FA), 14 min, RT 9.24 min], which showed quantitative conversion from aza-glycine resin **(3.5)** (RT 8.04 min).

Benzhydrylidene-aza-2,4,6-trifluorophenylalaninyl-D-phenylalaninyl-N^ε-(Boc)lysine

Rink amide resin (3.6n). Employing the protocol described above for the synthesis of resin **(3.6a)** using 2,4,6-trifluorobenzyl bromide (6 eq, 3 mmol, 671 mg), azapeptide resin **(3.6n)**

was analyzed by LC-MS [30-80% MeOH (0.1 % FA)/H₂O (0.1 % FA), 14 min, RT 7.97 min], which showed quantitative conversion from aza-glycine resin (**3.5**) (RT 6.90 min).

Benzhydrylidene-aza-3-(tert-butyldimethylsilyloxy)phenylalaninyl-D-phenylalaninyl-N^ε-(Boc)lysine Rink amide resin (3.6a). Employing the protocol described above for the synthesis of resin (**3.6a**) using 2,4,6-trifluorobenzyl bromide (9 eq, 4.5 mmol, 1.35 g), azapeptide resin (**3.6a**) was analyzed by LC-MS [10-80% MeOH (0.1 % FA)/H₂O (0.1 % FA), 14 min, RT 8.14 min], which showed quantitative conversion from aza-glycine resin (**3.5**) (RT 8.01 min).

Azadipeptide coupling onto N^ε-Boc-lysine Rink amide resin: benzhydrylidene-aza-(2,6-dichloro-4-methoxy)phenylalaninyl-D-phenylalaninyl-N^ε-Boc-lysine Rink amide resin (3.6p). Benzhydrylidene-aza-(2,6-dichloro-4-methoxy)phenylalaninyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (**3.8p**, 1 g, 1.58 mmol) was added to a solution of 20 mL of 1:1 TFA/DCM, stirred at room temperature for 2 h, and the volatiles were evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved and evaporated twice from DCM (20 mL). The recovered oil (911 mg; 1.58 mmol) was used without further purification, dissolved in DMF (3 mL), treated with DIEA (6 eq., 0.48 mL, 3.2 mmol), treated with a solution of HBTU (3 eq., 594.5 mg, 1.58 mmol) in DMF (3 mL) for 30 sec, and transferred as a yellow solution to a syringe containing N^ε-(Boc)lysine Rink amide resin (1 eq., 1010 mg, 0.53 mmol) swollen in DMF. The syringe was closed properly and shaken for 16 h, and as described for resin **5**, washed and analyzed by LC-MS [30-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA) over 14 min] which indicated complete conversion to benzhydrylidene-aza-2,6-dichloro-4-methoxyphenylalaninyl-D-phenylalaninyl-lysineamide **6p** (RT 9.3 min).

Benzhydrylidene-aza-(2,4-dichloro-6-methoxy)phenylalaninyl-D-phenylalaninyl-N^ε-(Boc)lysine Rink amide resin (6q). Employing the protocol described for the synthesis of resin (**3.6p**), ester (**3.8q**) (1 g, 1.58 mmol) was converted to the corresponding acid and coupled to N^ε-

Boc-lysine Rink amide resin to provide complete conversion to resin (**3.6q**), as ascertained by LC-MS analysis [30-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA) over 14 min, RT 8.75 min].

***tert*-Butyl benzhydrylidene-aza-2,6-dichloro-4-methoxyphenylalaninyl-D-phenylalanine (3.8p)** Benzhydrylidene aza-glyciny-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (**7**, 1 eq., 925 mg, 2.09 mmol, synthesized as previously described⁷⁰) was dissolved in THF (51.3 mL), cooled to 0°C, treated with 40% aqueous tetraethylammonium hydroxide (3 eq., 2.72 M, 2.3 mL, 6.26 mmol), stirred for 30 min, treated with 2,6-dichloro-4-methoxybenzyl bromide (3 eq., 6.26 mmol, 1.7 g) and stirred at the room temperature overnight. The volatiles were evaporated. The residue was partitioned between H₂O (50 mL) and EtOAc (50 mL). The phases were separated, and the aqueous phase was extracted twice with EtOAc. The organic phases were combined, dried with MgSO₄, filtered, and evaporated to a residue that was purified by flash chromatography using a gradient of 10-20% EtOAc in hexane. Evaporation of the collected fractions gave aza-dipeptide (**3.8p**) (1300 mg, 2.06 mmol, 96% yield): [α]_D²⁵ 6.1°; R_f 0.43 (8:2 hexane/EtOAc); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.55 – 7.41 (m, 3H), 7.40 – 7.30 (m, 3H), 7.29 – 7.10 (m, 6H), 6.95 (d, *J* = 14.5, 13.0 Hz, 2H), 6.63 (s, 2H), 6.19 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.91 – 4.66 (m, 3H), 3.81 (s, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.09 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 171.2, 168.2, 158.8, 157.5, 138.2, 136.9, 136.6, 134.8, 130.5, 129.5, 129.4, 129.3, 128.9, 128.3, 128.0, 126.7, 114.2, 81.6, 55.6, 54.6, 47.8, 38.8, 27.9. IR (neat) ν_{max} /cm⁻¹ 1671, 1494, 1148, 1061, 1038, 912, 731, 697. HRMS (ESI) calcd for C₃₅H₃₆N₃O₄ [M+H]⁺, 632.2077 found 632.2068.

Benzhydrylidene-aza-2,4-dichloro-6-methoxyphenylalaninyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (3.8q). Employing the protocol described above for the synthesis of aza-dipeptide ester

(3.8p) using aza-glycine **7** (1 eq., 925 mg, 2.09 mmol), aza-dipeptide ester **(3.8q)** (1292 mg, 2.04 mmol, 98 % yield) was isolated: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -56^{\circ}$; R_{f} 0.81 (7:3 hexane/EtOAc); $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.48 – 7.24 (m, 8H), 7.18 (s, 4H), 7.08 – 7.01 (m, 2H), 6.81 (dd, $J = 3.4, 2.0$ Hz, 1H), 6.53 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.38 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.80 – 4.63 (m, 3H), 3.88 (s, 1H), 3.58 (s, 3H), 3.22 – 2.94 (m, 2H), 1.39 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 171.3, 159.4, 157.8, 138.5, 136.7, 136.1, 134.8, 133.7, 130.3, 129.5, 129.3, 129.2, 129.1, 128.3, 128.0, 126.7, 121.6, 121.3, 109.5, 81.6, 55.8, 54.7, 44.1, 38.8, 28.0; IR (neat) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1569, 1497, 1399, 1219, 1148, 1101, 1045, 1011, 889, 731, 697. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 632.2077 found 632.2054.

Benzhydrylidene-aza-(1-Boc-1,2,3-triazolyl)-3-alanine-D-phenylalaninyl-N^ε-(Boc)lysine amide (3.12) In a syringe tube equipped with stopper, Teflon™ filter and stopcock, aza-propargylglycinylyl dipeptide resin **(3.11)** (1 eq., 195 mg, 0.3 mmol, prepared as previously reported⁸⁷) was swollen in a mixture of DMF (6961 μL) and MeOH (455 μL), treated sequentially with CuI (5 eq., 285 mg, 1.5 mmol), L-proline (5 eq., 172 mg, 1.5 mmol), trimethylsilyl azide (5 eq., 197 μL , 1.5 mmol), triethylamine (5 eq., 208 μL , 1.5 mmol) and molecular sieves (4A°, 500 mg). The syringe tube was flushed with argon, capped, sealed with parafilm, and heated in a water bath with sonication at 80°C for 24 h. The resin mixture was cooled, filtered and as described above for resin **(3.5)**, washed, and analyzed by LC-MS [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA) over 14 min] which indicated quantitative conversion of aza-propargylglycinylyl resin **(3.11)** (RT 8.44 min) into triazole resin (RT 7.04 min). Triazole resin (1 eq., 208 mg, 0.3 mmol) was swollen in THF (6 mL) treated with Et₃N (3 eq., 0.125 mL, 0.9 mmol) and Boc₂O (3 eq., 196 mg, 0.9 mmol), and stirred for 2 h at room temperature to give benzhydrylidene-aza-(1-Boc-1,2,3-triazolyl)-3-alanine-D-phenylalaninyl-N^ε-(Boc)lysine

amide (**3.12**). The resin was filtered and washed with DMF (3x10 mL), DMF/0.1 N HCl (3:1, 3x10 mL), H₂O (3x10 mL), MeOH (3x10 mL), THF (3x10 mL), and DCM (3x10 mL).

Semicarbazone deprotection, semicarbazide acylation, and azapeptide elongation, all were performed as previously described.⁷⁷

Modulatory effect of azapeptide on the overproduction of NO induced by the TLR-2 agonist R-FSL-1 in macrophage cell line

The murine RAW1 (Cat# TIB-71) and J774A.1 (Cat# TIB-67) macrophage cell lines were obtained from American Type Cell Collection macrophage cell line, seeded at 1.5 x 10⁵ cells/well in DMEM medium supplemented with penicillin and streptomycin on a 48-well plate, and incubated at 37 °C with 5% CO₂. After 2 h, the medium of adhered cells was changed to DMEM-Pen/Strep with 0.2% of bovine serum albumin (BSA), containing either azapeptides (**3.1a**, **3.1b**, **3.1d–3.1g**, **3.1j**, **3.1k**, **3.2a–3.2q** and **3.3**) or [azaLys⁶]-GHRP-6 as negative control at final concentration of 10⁻⁶ M. After a 1 h pre-incubation period, the cells were stimulated overnight with TLR-2 ligand fibroblast-stimulating lipopeptide (R-FSL-1, 300 ng/mL, Invivogen® #L7022). Supernatants were collected for nitrite determination by fluorescence using 2,3-diaminonaphthalene (DAN). Briefly, 25 µL of sample was incubated with 0.5 µg of DAN in a 100 µL final volume of phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) at room temperature in the dark. After 15 min, the reaction was stopped with 20 µL of NaOH (2.8N) and fluorescence was read using a fluorescence plate reader (TECAN® Safire, λ_{exc} 365 nm and λ_{em} 430 nm).

CD36 affinity studies of azapeptide analogs

Rat heart membrane preparation as source of CD36 for binding study

The hearts from Sprague Dawley rats (300g-325g, Charles River) were sliced into small pieces and homogenized with a Polytron at low speed in buffer A (10 mM NaHCO₃, 5 mM NaN₃, 10 μM Pefabloc, 0.1 μM Aprotinin, 1 μM Pepstatin A, 1 μM Leupeptin, pH 7.0). The homogenate was centrifuged at 8,700 x g for 10 min and the supernatant was collected on ice. The supernatant was centrifuged at 35,000 x g for 20 min to provide a pellet fraction, that was suspended in Buffer B (20 mM Tris-maleate, 0.6M KCl, pH 6.8) using a glass homogenizer with a Teflon pestle and centrifuged again at 35,000 x g for 60 min. The resulting pellet fraction was suspended in Buffer C (10 mM Tris/HCl buffer pH 7.4) and submitted to another centrifugation at 35,000 x g for 60 min. The collected pellet was suspended in 50 mM Tris/HCl buffer pH 7.4) containing 2 mM EGTA. The membrane preparation obtained was frozen at –80°C. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid (BCA) method, using BSA as standard.

Radioiodination of photoactivatable ligand tracer for receptor binding assay

The radiodination of Tyr-Bpa-Ala-hexarelin was performed as previously described.¹³² Briefly, 10 nmol of Tyr-Bpa-Ala-hexarelin was mixed with 100 ng of lactoperoxidase and 1mCi of Na¹²⁵I in a volume of 30 μL of 0.1M sodium acetate buffer pH 5.6. The reaction was started by adding 3 nmol of H₂O₂ for 5 min at room temperature. This step was repeated twice with a 5-min incubation period between each addition. The reaction was stopped by diluting the mixture with 1 mL of 0.1% TFA. The radiodinated peptide was purified by HPLC on reverse-phase Vydac C₁₈ column with a 60-min linear gradient from 20-50% of acetonitrile in water containing 0.1% TFA. The eluted radiolabelled tracer was collected, aliquoted and stored at –80°C.

Competition binding curves

The receptor binding assays of the photoactivatable ligand were performed as follows: Membranes (50µg / 25 µL) were incubated in the dark in Buffer A (175 µL of 50 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 2 mM EGTA) in the presence of a fixed concentration of [¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexarelin (250,000 cpm / 25 µL) in Buffer B (50 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 2 mM EGTA and 0.05% Bacitracin) and increasing concentrations from 0.1 to 50 µM of competing ligands: hexarelin (as reference standard), azapeptides **3.1a**, **3.1b**, **3.1d**, **3.1e**, **3.2a-3.2e**, **3.2g**, **3.2i**, **3.2l**, **3.2m** and **3.2o**. Competition binding studies were performed with increasing competitive ligands from 0.01 to 50 µM. Nonspecific binding was defined by 50 µM corresponding peptide. After an incubation period of 60 min at 22°C, membranes were submitted to irradiation with UV lamp (365 nm) for 15 min at 4°C. After centrifugation at 12,000 x g for 15 min, the pellets were suspended in Laemmli sample buffer, and boiled for 10 min prior to being subjected to electrophoresis. Proteins (50 µg/30 µL) were separated on precasted Novex™ 8% tris-Glycine SDS-PAGE mini gels (Invitrogen # XP00085BOX) mounted on Bio-Rad Mini-Protean electrophoresis system. The gels resulting from SDS-PAGE were fixed, colored in Coomassie Brilliant Blue R-250, dried, exposed to a storage phosphor intensifying screen (Amersham Biosciences), and analysed using a Typhoon PhosphorImager (GE Healthcare Life Sciences). Protein bands were quantified by densitometry and the covalent binding signal of 87 kDa was analyzed by densitometry and Image Lab 6.0™ software to set competition curves. The curves were analysed by using software package (Graphpad prism version 7.0).

Microvascular sprouting from choroidal explants

Enucleated eyes from mice with and without treatment with azapeptides were collected and dissected in DMEM containing 10% FBS, 1% penicillin and streptomycin. An incision was

made at the ora serrata level to remove the anterior pole. Following the removal of neuroretina from the posterior pole, the complex consisting of the retinal pigment epithelium (RPE)-choroid-sclera was collected, cut in 16 explant fragments and cultured in 20 μ L of Matrigel (BD biosciences) in 24-wells plates (Sarstedt). Explants growth was performed in EGM medium during 3 days, until the endothelial cells were found to proliferate around the explant. Phototographs of explants were taken under microscopy (T0). The explants were wash with EBM medium and incubated in EBM with NaCl or CD36 ligands at 10^{-6} M for 24 h. Photographs of the explants were taken (T24 h). The modulation of the sprouting surface was assessed by image analysis using imagen J software. Ratios (sprouting surface at T24 h – sprouting surface at T0)/ sprouting surface at T0 were determined. Numerical results were expressed as mean \pm SEM. Data were compared using one-way ANOVA with Dunnett’s post-test. $P < 0.05$ was considered statistically significant (Prism software version 5.01; graphpad Software, San Diego, CA).

3.6. AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* For W.D.L.: phone, 514-343-7339; fax, 514-343-7586; E-mail,

william.lubell@umontreal.ca. * For H.O.: phone, 514-343-6460; E-mail,

huy.ong@umontreal.ca.

ORCID

Wiliam D. Lubell: 0000-0002-3080-2712.

Huy Ong: 0000-0001-8459-2645.

Sylvain Chemtob: 0000-0001-7923-5221.

Kelvine Chignen Possi: 0000-0001-5328-5300.

Mukandila Mulumba: 0000-0001-7708-7480.

Samy Omri: 0000-0002-2054-8298.

Yesica Garcia-Ramos: 0000-0001-9578-540X.

Houda Tahiri: 0000-0001-9565-088X.

Author Contributions

Conceptualization: WDL, HO, SC, KCP, MM, SO, YG-R, HT,

Funding acquisition: WDL, HO, SC.

Investigation: KCP, MM, SO, YG-R, HT, WDL, HO, SC.

Methodology: KCP, MM, SO, YG-R, HT.

Project administration: WDL, HO, SC.

Resources: WDL, HO, SC.

Supervision: WDL, HO, SC.

Validation: WDL, HO, SC.

Visualization: WDL, HO, SC, KCP, MM, SO, YG-R, HT.

Writing ± original draft: KCP.

Funding Sources

We thank the NSERC of Canada, the CIHR, the Ministère du développement économique de l'innovation et de l'exportation du Québec (No. 878-2012), Amorchem and Mperia Therapeutics Inc. for support.

Notes

The authors declare no competing financial interest

3.7. ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Alexandra Furtos-Matei, Marie-Christine Tang, Louiza Mahrouche and Simon Comtois-Marotte for assistance in high resolution mass spectrometry analyses.

3.8. ABBREVIATIONS

Boc, *tert*-butyloxycarbonyl; CD, circular dichroism: CD36, cluster of differentiation 36; DSC, *N,N'*-disuccinimidyl carbonate; SI, supporting information; FA, formic acid; GHRP-6, growth hormone releasing peptide 6; GHS-R1a, growth hormone secretagogue receptor 1a; GH, growth hormone; GHRH, growth hormone releasing hormone; HBTU, 2-(*1H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate; IC₅₀ inhibitor concentration; NMR, Nuclear Magnetic Resonance; NO, nitric oxide; oxLDL, oxidized low density lipoproteins; TFA, trifluoroacetic acid; TLR, toll like receptor.

3.9. ASSOCIATED CONTENT:

Supporting information

The supporting information is available free of charge.

- Protocols and characterization for the synthesis of alkyl halides, deprotection and elongation of peptides on the resin, as well as NMR spectra (¹H and ¹³C) of all new compounds, analytical LC-MS chromatograms of azapeptides. (PDF)
- Molecular formula strings. (CSV)

4. Perspectives et conclusion

4.1. Perspectives

La synthèse de 25 azapeptides analogues l'[A¹, azaF⁴]-GHRP-6 et l'[azaF⁴]-GHRP-6 (**3.1a**) et (**3.2a**) suivi de l'évaluation de l'importance du résidu *N*-terminal de la chaîne peptidique et le groupement aromatique sur la chaîne latérale du résidu aza a été réalisée. L'activité de ces analogues a été évaluée par étude d'affinité avec le récepteur CD36, en étudiant leurs propriétés anti-inflammatoires et anti-angiogéniques.

De cette étude, il en ressort que l'[azaY⁴]-GHRP-6 (**3.2b**) et l'[aza(*p*-F)F⁴]-GHRP-6 (**3.2c**) sont les meilleurs de la série, ayant montré une activité anti-angiogénique, tandis que l'[aza(*p*-nOPr)F⁴]-GHRP-6 (**3.2i**) présente plutôt des propriétés pro-angiogéniques. Les analogues ayant des substituants volumineux sur leur cycle aromatique ([aza(2,6-diméthyl)F⁴]- **3.2l** et [aza(4-fluoro-2,6-diméthyl)F⁴]-GHRP-6 **3.2m**) n'ont pas présenté d'activité angiogénique malgré leur potentiel à inhiber la production du NO et leur affinité pour le récepteur CD36.

Grâce à ces résultats, pour les futurs travaux concernant ce projet, plusieurs analogues sont à envisager. Premièrement, des analogues tels que l'[aza(*p*-SH)F⁴]-GHRP-6 et l'[aza(*p*-NH₂)F⁴]-GHRP-6 seraient de très bons candidats thérapeutique, car tout comme l'[azaY⁴]-GHRP-6 (**3.2b**), ces analogues ont des substituants non volumineux qui sont capables de former des ponts hydrogène extra avec le récepteur CD36 et accroître leur potentiel thérapeutique. Cependant, la synthèse de ces analogues représente un grand défi à cause de leurs sensibilités au milieu acide. En effet, la synthèse de l'azatryptophane [azaW⁴]-GHRP-6 et les analogues de [azaY⁴]-GHRP-

6 ([aza(*p*-R)Y⁴]-GHRP-6, **Schéma 4.1**) est difficile et impossible pour certains à cause de la sensibilité de ces derniers au milieu acide.³² En effet, en milieu acide, on assiste à la migration intramoléculaire de la liaison double entre l'oxygène, l'azote ou le soufre de la chaîne alkyle vers le cycle benzylique pour se libérer de l'azapeptide non alkylé (**Schéma 4.1**).

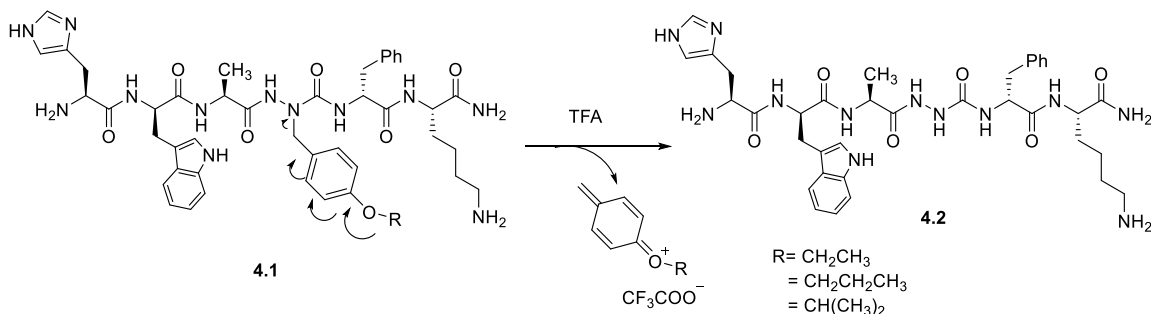


Schéma 4.1 : Sensibilité des [aza(*p*-R)Y⁴]-GHRP-6 au milieu acide.

De plus, en comparant les fonctions alcool, amine et thiol, il en découle que l'ordre de nucléophilicité est comme suit : $\text{NH}_2 > \text{SH} > \text{OH}$.¹⁹⁶ Ainsi, la synthèse de l'[aza(*p*-SH)F⁴]-GHRP-6 et l'[aza(*p*-NH₂)F⁴]-GHRP-6 serait à la limite impossible. Une solution pour surmonter la sensibilité au milieu acide serait d'introduire un ou deux atomes d'azote à l'intérieur du cycle benzylique de l'aza-tyrosine. Ce qui rendrait la fonction amine, hydroxyde ou thiol plus acide et pari cochet plus stable en milieu acide. (**4.3** et **4.4 Schéma 4.2**)

En résumé, les substituants en position *para* du cycle benzylique du résidu [aza-F⁴] des analogues GHRP-6 semblent dicter l'activité biologique observée. De plus, les substituants polaires, nucléophiles et de petite taille telle que les thiols, l'alcool et l'amine sont des candidats qui pourraient donner une meilleure affinité pour le récepteur CD36 grâce aux ponts hydrogène que les substituants peuvent former avec le récepteur. Cependant la synthèse de ces analogues représente un défi à cause de leur sensibilité au milieu acide. Pour cette raison l'incorporation d'un ou deux atomes d'azote en position *ortho* du cycle benzylique du résidu aza-phénylalanine (4.3 et 4.4) rendraient les substituants tels que la fonction amine, alcool, ou thiol moins nucléophile et pari cochet plus stable en milieu acide. Les analogues (4.3), (4.4) et (4.5) en plus de pouvoir former des ponts d'hydrogène (à partir de leur chaîne latérale) avec le récepteur CD36, ils ont une chaîne latérale moins flexible. Ce qui pourraient augmenter la rigidité de l'azapeptide.

4.2. Conclusion.

Les azapeptides sont des mimes peptidiques obtenus en substituant le carbone α par un atome d'azote. La substitution du carbone α par l'azote plus nucléophile diminue l'électrophilie du carbonyle, la répulsion électronique des paires isolées des deux azotes adjacents restreint les mouvements autour de l'angle dièdre et la planéité de la fraction urée amène le peptide à adopter un repliement de type β et le rend plus stable contre les dégradations par les protéases. Tous ces facteurs font des azapeptides des candidats thérapeutiques intéressants. Dans cette optique, nous avons utilisé des méthodes de synthèse optimisées pour construire une librairie de 25 analogues qui ont été évalués pour leurs propriétés anti-inflammatoires, angiogéniques et leurs affinités

pour le récepteur CD36 en vue de soigner les maladies d'ordre angiogénique, tel que l'athéromatose et la DMLA.

De cette étude il en ressort que, les analogues ayant de petits substituants en position *para* de l'aza-phénylamine tel que l'[azaY⁴]-GHRP-6 (**3.2b**) et l'[aza(4-F)F⁴]-GHRP-6 (**3.2c**) ont de meilleures propriétés anti-angiogéniques. D'autre part, la présence d'une chaîne alkyle en position *para* de l'azatyrosine tel que l'[aza(*p*-nOPr)F⁴]-GHRP-6 (**3.2i**) donne un effet contraire. Au vu des résultats obtenus très prometteurs, plusieurs analogues pourraient être envisagés pour les futures études pour améliorer l'affinité au CD36, l'activité anti inflammatoire ou anti-angiogénique.

Bibliographie

1. Sachdeva, S. Peptides as ‘Drugs’: The Journey so Far. *J. Pept. Res. Ther.* **2016**, 1-12.
2. Ibraheem, D.; Elaissari, A.; Fessi, H. Administration strategies for proteins and peptides. *Int. J. Pharm.* **2014**, *477* (1), 578-589.
3. 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* (6762), 656-660.
4. Kojima, M.; Kangawa, K. Ghrelin: Structure and Function. *Physiol. Rev.* **2005**, *85* (2), 495-522.
5. Baig, M.; Tariq, S.; Tariq, S., Homocysteine and leptin in the pathogenesis of osteoporosis-evidences, conflicts and expectations. In *Advances in Osteoporosis*, InTech: 2015, DOI: 10.5772/59869.
6. Nakazato, M.; Murakami, N.; Date, Y.; Kojima, M.; Matsuo, H.; Kangawa, K.; Matsukura, S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* **2001**, *409* (6817), 194-198.
7. Horvath, T. L.; Diano, S.; Sotonyi, P.; Heiman, M.; Tschöp, M. Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance—a hypothalamic perspective. *Endocrinology* **2001**, *142* (10), 4163-4169.
8. Prokop, J.; Duff, R.; Ball, H.; Copeland, D.; Londraville, R. Leptin and leptin receptor: analysis of a structure to function relationship in interaction and evolution from humans to fish. *Peptides* **2012**, *38* (2), 326-336.
9. Rodgers, R. J.; Tschöp, M. H.; Wilding, J. P. Anti-obesity drugs: past, present and future. *Dis. Models Mech.* **2012**, *5* (5), 621-626.
10. Ghosh, B.; Jones, L. H. Target validation using in-cell small molecule clickable imaging probes. *MedChemComm* **2014**, *5* (3), 247-254.

11. Thomsen, W. J.; Grottick, A. J.; Menzaghi, F.; Reyes-Saldana, H.; Espitia, S.; Yuskin, D.; Whelan, K.; Martin, M.; Morgan, M.; Chen, W. Lorcaserin, a novel selective human 5-hydroxytryptamine_{2C} agonist: in vitro and in vivo pharmacological characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *325* (2), 577-587.
12. Mercer, S. L., ACS chemical neuroscience molecule spotlight on Qnexa. *ACS Chem Neurosci.* **2011**, *2*(9), 484–486.
13. Niswender, K. D.; Morrison, C. D.; Clegg, D. J.; Olson, R.; Baskin, D. G.; Myers, M. G.; Seeley, R. J.; Schwartz, M. W. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus. *Diabetes* **2003**, *52* (2), 227-231.
14. Chou, K.; Perry, C. M. Metreleptin: first global approval. *Drugs* **2013**, *73* (9), 989-997.
15. <https://www.healthexpress.eu/de/images/insulin-struktur.jpg> **visité pour la dernière fois le 25 Avril 2017.**
16. <https://newdrugapprovals.org/2013/12/17/fda-panel-recommends-astrazeneca-and-bms-metreleptin-for-generalised-lipodystrophy/> **visité pour la dernière fois le 25 Avril 2017.**
17. Kovalainen, M.; Mönkäre, J.; Riikonen, J.; Pesonen, U.; Vlasova, M.; Salonen, J.; Lehto, V.-P.; Järvinen, K.; Herzig, K.-H. Novel delivery systems for improving the clinical use of peptides. *Pharmacol. Rev.* **2015**, *67* (3), 541-561.
18. Vieira-Pires, R. S.; Morais-Cabral, J. H. 3 10 helices in channels and other membrane proteins. *J. Gen. Physiol.* **2010**, *136* (6), 585-592.
19. Howland, J. In Biochemistry. D. Voet; Voet. J. G. Ed: *John Wiley and Sons: New York, Biochem. Educ* **1990**, *18*, pp1223.
20. Kabsch, W.; Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **1983**, *22* (12), 2577-2637.

21. http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/course/section8/ss_960531_AFrame_28.gif visité pour la dernière fois le 25 Avril 2017.
22. Hruby, V. J.; Li, G.; Haskell-Luevano, C.; Shenderovich, M. Design of peptides, proteins, and peptidomimetics in chi space. *Pept. Sci.* **1997**, *43* (3), 219-266.
23. Henchman, R. H.; McCammon, J. A. Protein Structural Flexibility: Molecular Motions. in *Encyclopedia of Life Sciences*, Wiley, New York, **2005**.
24. Vagner, J.; Qu, H.; Hruby, V. J. Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *12* (3), 292-296.
25. Avan, I.; Hall, C. D.; Katritzky, A. R. Peptidomimetics via modifications of amino acids and peptide bonds. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (10), 3575-3594.
26. Boutard, N.; Jamieson, A. G.; Ong, H.; Lubell, W. D. Structure–Activity Analysis of the Growth Hormone Secretagogue GHRP-6 by α - and β -Amino γ -Lactam Positional Scanning. *Chem. Biol. Drug Des.* **2010**, *75* (1), 40-50.
27. Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M. A revised set of potentials for β -turn formation in proteins. *Protein Sci.* **1994**, *3* (12), 2207-2216.
28. Rose, G. D.; Gierasch, L. M.; Smith, J. A. Turns in peptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 1-109.
29. 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.
30. Zega, A. Azapeptides as pharmacological agents. *Current medicinal chemistry* **2005**, *12* (5), 589-597.
31. Chingle, R.; Ratni, S.; Claing, A.; Lubell, W. D. Application of constrained aza-valine analogs for Smac mimicry. *Pep. Sci.* **2016**, *106* (3), 235-244.

32. 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.
33. Hata, M.; Marshall, G. R. Do benzodiazepines mimic reverse-turn structures? *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2006**, *20* (5), 321-331.
34. Atmuri, N. P.; Lubell, W. D. Insight into Transannular Cyclization Reactions To Synthesize Azabicyclo [XYZ] alkanone Amino Acid Derivatives from 8-, 9-, and 10-Membered Macrocyclic Dipeptide Lactams. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (10), 4904-4918.
35. Cluzeau, J.; Lubell, W. D. Design, synthesis, and application of azabicyclo [XY 0] alkanone amino acids as constrained dipeptide surrogates and peptide mimics. *Pep. Sci.* **2005**, *80* (2-3), 98-150.
36. Bourguet, C. B.; Claing, A.; Laporte, S. A.; Hébert, T. E.; Chemtob, S.; Lubell, W. D. Synthesis of azabicycloalkanone amino acid and azapeptide mimics and their application as modulators of the prostaglandin F₂ α receptor for delaying preterm birth. *Can. J. Chem.* **2014**, *92* (11), 1031-1040.
37. Bourguet, C. B.; Goupil, E.; Tassy, D.; Hou, X.; Thouin, E.; Polyak, F.; Hébert, T. E.; Claing, A.; Laporte, S. A.; Chemtob, S. Targeting the prostaglandin F₂ α receptor for preventing preterm labor with azapeptide tocolytics. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (17), 6085-6097.
38. Hanessian, S.; McNaughton-Smith, G.; Lombart, H.-G.; Lubell, W. D. Design and synthesis of conformationally constrained amino acids as versatile scaffolds and peptide mimetics. *Tetrahedron* **1997**, *53* (38), 12789-12854.
39. 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* (22), 7917-7927.

40. Febbraio, M.; Silverstein, R. L. CD36: implications in cardiovascular disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2007**, *39* (11), 2012-2030.
41. Gante, J. Azapeptides. *Synthesis* **1989**, *1989* (06), 405-413.
42. 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.
43. Lee, H.-J.; Lee, M.-H.; Choi, Y.-S.; Park, H.-M.; Lee, K.-B. NBO approach to evaluate origin of rotational barrier of diformylhydrazine. *J. Mol. Struct. Theochem* **2003**, *631* (1), 101-110.
44. 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. *Chem Biol Drug Des.* **1997**, *49* (6), 556-562.
45. 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* (39), 9395-9401.
46. Quibell, M.; Turnell, W. G.; Johnson, T. Synthesis of azapeptides by the Fmoc/tert-butyl/polyamide technique. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, (22), 2843-2849.
47. Havlir, D. V.; O'marro, S. D. Atazanavir: new option for treatment of HIV infection. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, *38* (11), 1599-1604.
48. Cotton, R.; Giles, M. B. Solid Phase Peptide Synthesis. GB, Patent EP0518655A2, Dec. 13, 1992.
49. Epinette, C.; Croix, C.; Jaquillard, L.; Marchand-Adam, S.; Kellenberger, C.; Lalmanach, G.; Cadene, M.; Viaud-Massuard, M.-C.; Gauthier, F.; Korkmaz, B. A selective reversible

azapeptide inhibitor of human neutrophil proteinase 3 derived from a high affinity FRET substrate. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *83* (6), 788-796.

50. 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* (7), 1005-1008.

51. Von Hentig, N. Atazanavir/ritonavir: a review of its use in HIV therapy. *Drugs Today (Barc)* **2008**, *44* (2), 103-132.

52. Lichtenthaler, F. W. Emil Fischer, his personality, his achievements, and his scientific progeny. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *2002* (24), 4095-4122.

53. Fischer, E.; Fourneau, E. Ueber einige derivate des glykocolls. *Eur. J. Inorg. Chem.* **1901**, *34* (2), 2868-2877.

54. Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149-2154.

55. Chandrudu, S.; Simerska, P.; Toth, I. Chemical methods for peptide and protein production. *Molecules* **2013**, *18* (4), 4373-4388.

56. Anderson, G. W.; McGregor, A. C. t-Butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (23), 6180-6183.

57. Grapsas, I.; Cho, Y. J.; Mobashery, S. N-(tert-butoxycarbonyloxy)-5-norbornene-endo-2, 3-dicarboximide, a reagent for the regioselective introduction of the tert-butoxycarbonyl (boc) protective group at unhindered amines: Application to amino glycoside chemistry. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (7), 1918-1922.

58. Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F. Amino acid-protecting groups. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (6), 2455-2504.

59. Barany, G.; Albericio, F. Three-dimensional orthogonal protection scheme for solid-phase peptide synthesis under mild conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107* (17), 4936-4942.
60. Barany, G.; Merrifield, R. A new amino protecting group removable by reduction. Chemistry of the dithiasuccinoyl (Dts) function. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (22), 7363-7365.
61. Pietta, P.; Marshall, G. R. Amide protection and amide supports in solid-phase peptide synthesis. *Chem. Commun.* **1970**, (11), 650-651.
62. Carpino, L. A.; Han, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (19), 5748-5749.
63. Wang, S.-S. p-Alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95* (4), 1328-1333.
64. Matsueda, G. R.; Stewart, J. M. A p-methylbenzhydrylamine resin for improved solid-phase synthesis of peptide amides. *Peptides* **1981**, *2* (1), 45-50.
65. Rink, H. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (33), 3787-3790.
66. Sieber, P. A new acid-labile anchor group for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides by the Fmoc method. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (19), 2107-2110.
67. Gentilucci, L.; Tolomelli, A.; Squassabia, F. Peptides and peptidomimetics in medicine, surgery and biotechnology. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13* (20), 2449-2466.
68. Hess, H.-J.; Moreland, W. T.; Laubach, G. D. N-[2-Isopropyl-3-(L-aspartyl-L-arginyl)-carbazoyl]-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanine, 1 an Isostere of Bovine Angiotensin II. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (24), 4040-4041.

69. Gante, J.; Krug, M.; Lauterbach, G.; Weitzel, R.; Hiller, W. Synthesis and properties of the first all-aza analogue of a biologically active peptide. *J. Pept. Sci.* **1995**, *1* (3), 201-206.
70. Garcia-Ramos, Y.; Lubell, W. D. Synthesis and alkylation of aza-glyciny dipeptide building blocks. *J. Pept. Sci.* **2013**, *19* (12), 725-729.
71. 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* (20), 7388-7394.
72. Bourguet, C. B.; Sabatino, D.; Lubell, W. D. Benzophenone semicarbazone protection strategy for synthesis of aza-glycine containing aza-peptides. *Biopolymers* **2008**, *90* (6), 824-831.
73. 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* (6), 284-296.
74. Chong, P. Y.; Petillo, P. A. Solid phase urea synthesis: An efficient and direct conversion of Fmoc-protected amines to ureas. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (24), 4501-4504.
75. Limal, D.; Semetey, V.; Dalbon, P.; Jolivet, M.; Briand, J.-P. Solid-phase synthesis of N, N'-unsymmetrically substituted ureas: application to the synthesis of carbaza peptides. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (14), 2749-2752.
76. 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* (16), 3650-3653.

77. 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* (32), 12493-12506.
78. Zhang, J.; Proulx, C.; Tomberg, A.; Lubell, W. D. Multicomponent diversity-oriented synthesis of aza-lysine-peptide mimics. *Org. Lett.* **2013**, *16* (1), 298-301.
79. Vincent-Rocan, J. F.; Clavette, C.; Leckett, K.; Beauchemin, A. M. A Cascade Synthesis of Aminohydantoins Using In Situ-Generated N-Substituted Isocyanates. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (10), 3886-3890.
80. Vincent-Rocan, J.-F.; Ivanovich, R. A.; Clavette, C.; Leckett, K.; Bejjani, J.; Beauchemin, A. M. Cascade reactions of nitrogen-substituted isocyanates: a new tool in heterocyclic chemistry. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (1), 315-328.
81. Chingle, R.; Lubell, W. D. Azopeptides: Synthesis and Pericyclic Chemistry. *Org. Lett.* **2015**, *17* (21), 5400-5403.
82. Douchez, A.; Lubell, W. D. Chemoselective alkylation for diversity-oriented synthesis of 1, 3, 4-benzotriazepin-2-ones and pyrrolo [1, 2][1, 3, 4] benzotriazepin-6-ones, potential turn surrogates. *Org. Lett.* **2015**, *17* (24), 6046-6049.
83. Brondani, D. J.; de Magalhães Moreira, D. R.; de Farias, M. P. A.; Souza, F. R. d. S.; Barbosa, F. F.; Leite, A. C. L. A new and efficient N-alkylation procedure for semicarbazides/semicarbazones derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (22), 3919-3923.
84. O'Donnell, M. J.; Zhou, C.; Scott, W. L. Solid-phase unnatural peptide synthesis (UPS). *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (25), 6070-6071.

85. Garcia-Ramos, Y.; Proulx, C.; Lubell, W. D. Synthesis of hydrazine and azapeptide derivatives by alkylation of carbazates and semicarbazones. *Can. J. Chem.* **2012**, *90* (11), 985-993.
86. Traoré, M.; Doan, N.-D.; Lubell, W. D. Diversity-oriented synthesis of azapeptides with basic amino acid residues: aza-lysine, aza-ornithine, and aza-arginine. *Org. Lett.* **2014**, *16* (13), 3588-3591.
87. Doan, N. D.; Zhang, J.; Traoré, M.; Kamdem, W.; Lubell, W. D. Solid-phase synthesis of C-terminal azapeptides. *J. Pept. Sci.* **2015**, *21* (5), 387-391.
88. Heimer, E. P.; Chang, C. D.; Lambros, T.; Meienhofer, J. Stable isolated symmetrical anhydrides of *N* α -fluorenylmethyloxycarbonylamino acids in solid-phase peptide synthesis. *Biol. Drug Des.* **1981**, *18* (3), 237-241.
89. Lubell, W. D.; Blankenship, J. W.; Fridkin, G.; Kaul, R. Peptides. In *Three Carbon-Heteroatom Bonds: Amides and Derivatives; Peptides; Lactams, Science of Synthesis* 21.11; Weinreb, S. M. Ed.; Thieme: Stuttgart, Germany, 2005; pp 713–809.
90. Diness, F.; Schoffelen, S.; Meldal, M. In Advances in merging triazoles with peptides and proteins.; *Heterocyclic Chemistry*: Ch 7, Lubell W. D. Ed. Springer, Berlin, **2015**, pp 267-304.
91. Ackermann, L.; Potukuchi, H. K. Regioselective syntheses of fully-substituted 1, 2, 3-triazoles: the CuAAC/C–H bond functionalization nexus. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (20), 4503-4513.
92. Brik, A.; Muldoon, J.; Lin, Y. C.; Elder, J. H.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Wong, C. H. Rapid Diversity-Oriented Synthesis in Microtiter Plates for In Situ Screening of HIV Protease Inhibitors. *ChemBioChem* **2003**, *4* (11), 1246-1248.

93. Soltis, M. J.; Yeh, H. J.; Cole, K. A.; Whittaker, N.; Wersto, R. P.; Kohn, E. C. Identification and characterization of human metabolites of CAI [5-amino-1-(4'-chlorobenzoyl-3, 5-dichlorobenzyl)-1, 2, 3-triazole-4-carboxamide. *Drug Metab. Dispos.* **1996**, *24* (7), 799-806.
94. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem.* **2002**, *114* (14), 2708-2711.
95. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1, 2, 3]-triazoles by regiospecific copper (I)-catalyzed 1, 3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057-3064.
96. Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. Ruthenium-catalyzed cycloaddition of alkynes and organic azides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (46), 15998-15999.
97. 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* (28), 8923-8930.
98. Boz, E.; Tüzün, N. Ş. Reaction mechanism of ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction: A DFT study. *J. Organomet. Chem.* **2013**, *724*, 167-176.
99. 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.
100. 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* (5), 726-733.
101. Zhu, W.; Ma, D. Synthesis of aryl azides and vinyl azides via proline-promoted CuI-catalyzed coupling reactions. *Chem. Commun.* **2004**, (7), 888-889.

102. Buysse, K.; Farard, J.; Nikolaou, A.; Vanderheyden, P.; Vauquelin, G.; Sejer Pedersen, D.; Tourwé, D.; Ballet, S. Amino triazolo diazepines (Ata) as constrained histidine mimics. *Org. Lett.* **2011**, *13* (24), 6468-6471.
103. Konieczna, J.; Sánchez, J.; Palou, M.; Picó, C.; Palou, A. Blood cell transcriptomic-based early biomarkers of adverse programming effects of gestational calorie restriction and their reversibility by leptin supplementation. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9088.
104. Wang, D.; Li, W.; Zhang, Y. Association of CD36 expression and polymorphism with serum biochemical indices in Cherry Valley duck. *Genet Mol. Res.* **2016**, *15* (2) DOI: 10.4238/gmr.15027994.
105. Bujold, K.; Mellal, K.; Zoccal, K. F.; Rhains, D.; Brissette, L.; Febbraio, M.; Marleau, S.; Ong, H. EP 80317, a CD36 selective ligand, promotes reverse cholesterol transport in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* **2013**, *229* (2), 408-414.
106. Proulx, C.; Picard, E. m.; Boeglin, D.; Pohankova, P.; Chemtob, S.; Ong, H.; Lubell, W. D. Azapeptide analogues 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.
107. Biagini, G.; Torsello, A.; Marinelli, C.; Gualtieri, F.; Vezzali, R.; Coco, S.; Bresciani, E.; Locatelli, V. Beneficial effects of desacyl-ghrelin, hexarelin and EP-80317 in models of status epilepticus. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *670* (1), 130-136.
108. Lim, L. S.; Mitchell, P.; Seddon, J. M.; Holz, F. G.; Wong, T. Y. Age-related macular degeneration. *The Lancet* **2012**, *379* (9827), 1728-1738.
109. Chappelow, A. V.; Kaiser, P. K. Neovascular age-related macular degeneration. *Drugs* **2008**, *68* (8), 1029-1036.

110. Witmer, A.; Vrensen, G.; Van Noorden, C.; Schlingemann, R. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog. Retin. Eye Res.* **2003**, *22* (1), 1-29.
111. Amadio, M.; Govoni, S.; Pascale, A. Targeting VEGF in eye neovascularization: what's new?: a comprehensive review on current therapies and oligonucleotide-based interventions under development. *Pharmacol. Res.* **2016**, *103*, 253-269.
112. Klein, R.; Peto, T.; Bird, A.; Vannewkirk, M. R. The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J. Ophthalmol.* **2004**, *137* (3), 486-495.
113. Zhang, K.; Zhang, L.; Weinreb, R. N. Ophthalmic drug discovery: novel targets and mechanisms for retinal diseases and glaucoma. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11* (7), 541-559.
114. Zarbin, M. A.; Rosenfeld, P. J. Pathway-based therapies for age-related macular degeneration: an integrated survey of emerging treatment alternatives. *Retina* **2010**, *30* (9), 1350-1367.
115. Chang, J.-H.; Garg, N. K.; Lunde, E.; Han, K.-Y.; Jain, S.; Azar, D. T. Corneal neovascularization: an anti-VEGF therapy review. *Surv. Ophthalmol.* **2012**, *57* (5), 415-429.
116. K Suresh, P.; K Sah, A. Patent perspectives for corticosteroids based ophthalmic therapeutics. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **2014**, *8* (3), 206-223.
117. Kvanta, A. Ocular angiogenesis: the role of growth factors. *Acta Ophthalmol. Scand.* **2006**, *84* (3), 282-288.
118. Bradley, J.; Ju, M.; Robinson, G. S. Combination therapy for the treatment of ocular neovascularization. *Angiogenesis* **2007**, *10* (2), 141-148.
119. Afzal, A.; Shaw, L.; Ljubimov, A.; Boulton, M.; Segal, M.; Grant, M. Retinal and choroidal microangiopathies: therapeutic opportunities. *Microvasc. Res.* **2007**, *74* (2), 131-144.

120. Agrahari, V.; Agrahari, V.; Mandal, A.; Pal, D.; Mitra, A. K. How are we improving the delivery to back of the eye? Advances and challenges of novel therapeutic approaches. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2017**, *14*(10), 1145-1162.
121. Mwaikambo, B.; Yang, C.; Ong, H.; Chemtob, S.; Hardy, P. Emerging roles for the CD36 scavenger receptor as a potential therapeutic target for corneal neovascularization. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* **2008**, *8* (4), 255-272.
122. Talle, M.; Rao, P.; Westberg, E.; Allegar, N.; Makowski, M.; Mittler, R.; Goldstein, G. Patterns of antigenic expression on human monocytes as defined by monoclonal antibodies. *Cell. Immunol.* **1983**, *78* (1), 83-99.
123. Febbraio, M.; Hajjar, D. P.; Silverstein, R. L. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest.* **2001**, *108* (6), 785-791.
124. Collot-Teixeira, S.; Martin, J.; McDermott-Roe, C.; Poston, R.; McGregor, J. L. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* **2007**, *75* (3), 468-477.
125. Picard, E.; Houssier, M.; Bujold, K.; Sapieha, P.; Lubell, W.; Dorfman, A.; Racine, J.; Hardy, P.; Febbraio, M.; Lachapelle, P. CD36 plays an important role in the clearance of oxLDL and associated age-dependent sub-retinal deposits. *Aging (Albany NY)* **2010**, *2* (12), 981-989.
126. Marleau, S.; Harb, D.; Bujold, K.; Avallone, R.; Iken, K.; Wang, Y.; Demers, A.; Sirois, M. G.; Febbraio, M.; Silverstein, R. L. EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *The FASEB journal* **2005**, *19* (13), 1869-1871.

127. Bowers, C.; Momany, F.; Reynolds, G.; Hong, A. On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology* **1984**, *114* (5), 1537-1545.
128. Howard, A. D.; Feighner, S. D.; Cully, D. F.; Arena, J. P. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* **1996**, *273* (5277), 974.
129. Momany, F.; Bowers, C.; Reynolds, G.; Chang, D.; Hong, A.; Newlander, K. Design, synthesis, and biological activity of peptides which release growth hormone in vitro. *Endocrinology* **1981**, *108* (1), 31-39.
130. Bowers, C.; Chang, J.; Momany, F.; Folkers, K. Effect of the enkephalins and enkephalin analogs on release of pituitary hormones in vitro. *Mol. Endocrinol.* **1977**, 287-292.
131. Bowers, C.; Momany, F.; Reynolds, G.; Chang, D.; Hong, A.; Chang, K. Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology* **1980**, *106* (3), 663-667.
132. Ong, H.; McNicoll, N.; Escher, E.; Collu, R.; Deghenghi, R.; Locatelli, V.; Ghigo, E.; Muccioli, G.; Boghen, M.; Nilsson, M. Identification of a pituitary growth hormone-releasing peptide (GHRP) receptor subtype by photoaffinity labeling. *Endocrinology* **1998**, *139* (1), 432-435.
133. Bowers, C. Y. Growth Hormone-Releasing Peptides. *Comprehensive Physiology* **1998**, DOI: 10.1002/cphy.cp070510.
134. Bowers, C. Y.; Granda, R.; Mohan, S.; Kuipers, J.; Baylink, D.; Veldhuis, J. D. Sustained elevation of pulsatile growth hormone (GH) secretion and insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-5 concentrations during 30-day continuous

- subcutaneous infusion of GH-releasing peptide-2 in older men and women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *89* (5), 2290-2300.
135. Birzniece, V.; Nelson, A. E.; Ho, K. K. Growth hormone and physical performance. *Trends Endocrin. Met.* **2011**, *22* (5), 171-178.
136. Timms, M.; Hall, N.; Levina, V.; Vine, J.; Steel, R. A high-throughput LC-MS/MS screen for GHRP in equine and human urine, featuring peptide derivatization for improved chromatography. *Drug Test. Anal.* **2014**, *6* (10), 985-995.
137. Momany, F.; Bowers, C.; Reynolds, G.; Hong, A.; Newlander, K. Conformational energy studies and in vitro and in vivo activity data on growth hormone-releasing peptides. *Endocrinology* **1984**, *114* (5), 1531-1536.
138. Ghigo, E.; Arvat, E.; Gianotti, L.; Imbimbo, B.; 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.
139. Popovic, V.; Damjanovic, S.; Micic, D.; Djurovic, M.; Dieguez, C.; Casanueva, 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.
140. Beck, B.; Richy, S.; Stricker-Krongrad, A. Feeding response to ghrelin agonist and antagonist in lean and obese Zucker rats. *Life Sci.* **2004**, *76* (4), 473-478.

141. Rossoni, G.; Colonna, V. D. G.; Bernareggi, M.; Polvani, G. L.; Müller, E. E.; Berti, F. Protectant activity of hexarelin or growth hormone against postischemic ventricular dysfunction in hearts from aged rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1998**, *32* (2), 260-265.
142. Deghenghi, R.; Cananzi, M. M.; Torsello, A.; Battisti, C.; Muller, E. E.; Locatelli, V. GH-releasing activity of hexarelin, a new growth hormone releasing peptide, in infant and adult rats. *Life Sci.* **1994**, *54* (18), 1321-1328.
143. Colonna, V. D. G.; Rossoni, G.; Bernareggi, M.; Müller, E. E.; Berti, F. Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from GH-deficient rats: protection by hexarelin. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *334* (2), 201-207.
144. Locatelli, V.; Rossoni, G.; Schweiger, F.; Torsello, A.; De Gennaro Colonna, V.; Bernareggi, M.; Deghenghi, R.; Müller, E. E.; Berti, F. Growth Hormone-Independent Cardioprotective Effects of Hexarelin in the Rat 1. *Endocrinology* **1999**, *140* (9), 4024-4031.
145. Giustina, A.; Bresciani, E.; Bugari, G.; Bussi, A. R.; Deghenghi, R.; Imbimbo, B.; Giustina, G. Hexarelin, a novel GHRP-6 analog, counteracts the inhibitory effect of hydrocortisone on growth hormone secretion in acromegaly. *Endocr. Res.* **1995**, *21* (3), 569-582.
146. Bodart, V.; Febbraio, M.; Demers, A.; McNicoll, N.; Pohankova, P.; Perreault, A.; Sejlitz, T.; Escher, E.; Silverstein, R.; Lamontagne, D. CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ. Res.* **2002**, *90* (8), 844-849.
147. 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.* **2001**, *78* (4), 471-478.

148. Zhang, J.; Mulumba, M.; Ong, H.; Lubell, W. D. Diversity-Oriented Synthesis of Cyclic Azapeptides by A3-Macrocyclization Provides High-Affinity CD36-Modulating Peptidomimetics. *Angew. Chem.* **2017**, *129* (22), 6381-6385.
149. Dormán, G.; Prestwich, G. D. Using photolabile ligands in drug discovery and development. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18* (2), 64-77.
150. Brunner, J. New photolabeling and crosslinking methods. *Annu. Rev. Biochem* **1993**, *62* (1), 483-514.
151. Dorman, G.; Prestwich, G. D. Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry* **1994**, *33* (19), 5661-5673.
152. Chapman, R. S. In vitro radionuclide techniques in medical diagnosis. *IAEA* **1998**, *8*, 39-55.
153. Ong, H.; Bodart, V.; McNicoll, N.; Lamontagne, D.; Bouchard, J. Binding sites for growth hormone-releasing peptide. *Growth Horm. IGF Res.* **1998**, *8*, 137-140.
154. Thorell, J.; Johansson, B. Enzymatic iodination of polypeptides with ¹²⁵I to high specific activity. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)- Proteins Struct. Mol.* **1971**, *251* (3), 363-369.
155. Pong, S.-S.; Chaung, L.; Dean, D. C.; Nargund, R. P.; Patchett, A. A.; Smith, R. G. Identification of a new G-protein-linked receptor for growth hormone secretagogues. *Mol. Endocrinol.* **1996**, *10* (1), 57-61.
156. McKee, K. K.; Palyha, O. C.; Feighner, S. D.; Hreniuk, D. L.; Tan, C. P.; Phillips, M. S.; Smith, R. G.; Van der Ploeg, L. H.; Howard, A. D. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol. Endocrinol.* **1997**, *11* (4), 415-423.
157. Shao, Z.; Friedlander, M.; Hurst, C. G.; Cui, Z.; Pei, D. T.; Evans, L. P.; Juan, A. M.; Tahiri, H.; Duhamel, F.; Chen, J. Correction: Choroid Sprouting Assay: An Ex Vivo Model of

Microvascular Angiogenesis. *PLoS one* **2013**, *8* (8), DOI:10.1371/annotation/c6b85ec4-996d-4daf-863a-44260a888470.

158. Bodart, V.; Bouchard, J.; McNicoll, N.; Escher, E.; Carriere, P.; Ghigo, E.; Sejlitz, T.; Sirois, M.; Lamontagne, D.; Ong, H. Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. *Circ. Res.* **1999**, *85* (9), 796-802.

159. Jacks, T.; Smith, R.; Judith, F.; Schleim, K.; Frazier, E.; Chen, H.; Krupa, D.; Hora Jr, D.; Nargund, R.; Patchett, A. MK-0677, a potent, novel, orally active growth hormone (GH) secretagogue: GH, insulin-like growth factor I, and other hormonal responses in beagles. *Endocrinology* **1996**, *137* (12), 5284-5289.

160. Fraser, G. L.; Hoveyda, H. R.; Peterson, M. L., Methods of Using Macrocyclic Modulators of the Ghrelin Receptor. US Patent 8450268 B2, May 28, 2013.

161. Shao, Z.; Friedlander, M.; Hurst, C. G.; Cui, Z.; Pei, D. T.; Evans, L. P.; Juan, A. M.; Tahir, H.; Duhamel, F.; Chen, J. Choroid sprouting assay: an ex vivo model of microvascular angiogenesis. *PLoS One* **2013**, *8* (7), e69552, DOI:10.1371/journal.pone.0069552.

162. Connolly, D. J.; O'Neill, L. A. New developments in Toll-like receptor targeted therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2012**, *12* (4), 510-518.

163. Canton, J.; Neculai, D.; Grinstein, S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13* (9), 621-634.

164. Kawai, T.; Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunol.* **2010**, *11* (5), 373-384.

165. Triantafilou, M.; Gamper, F. G.; Haston, R. M.; Mouratis, M. A.; Morath, S.; Hartung, T.; Triantafilou, K. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at

- the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (41), 31002-31011.
166. Yu, L.; Wang, L.; Chen, S. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14* (11), 2592-2603.
167. Park, Y. M. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp. Mol. Med.* **2014**, *46* (6), e99, DOI:10.1038/emm.2014.38.
168. Silverstein, R. L.; Febbraio, M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci. Signal.* **2009**, *2* (72), DOI:10.1126/scisignal.272re3.
169. Stephen, S. L.; Freestone, K.; Dunn, S.; Twigg, M. W.; Homer-Vanniasinkam, S.; Walker, J. H.; Wheatcroft, S. B.; Ponnambalam, S. Scavenger receptors and their potential as therapeutic targets in the treatment of cardiovascular disease. *Int. J. Hypertens.* **2010**, *2010*, article ID 646929.
170. Cho, S. CD36 as a therapeutic target for endothelial dysfunction in stroke. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18* (25), 3721-3730.
171. Demers, A.; McNicoll, N.; Febbraio, M.; Servant, M.; Marleau, S.; Silverstein, R.; Huy, O. Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem. J.* **2004**, *382* (2), 417-424.
172. 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. Modified peptide monolayer binding His-tagged biomolecules for small ligand screening with SPR biosensors. *Analyst* **2011**, *136* (15), 3142-3148.

173. Ottersbach, P. A.; Schnakenburg, G.; Gütschow, M. Induction of chirality: experimental evidence of atropisomerism in azapeptides. *Chem. Commun.* **2012**, 48 (46), 5772-5774.
174. Korhonen, R.; Lahti, A.; Kankaanranta, H.; Moilanen, E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* **2005**, 4 (4), 471-479.
175. Picard, E.; Houssier, M.; Bujold, K.; Sapieha, P.; Lubell, W.; Dorfman, A.; Racine, J.; Hardy, P.; Febbraio, M.; Lachapelle, P. CD36 plays an important role in the clearance of oxLDL and associated age-dependent sub-retinal deposits. *Aging* **2010**, 2 (12), 981.
176. Tan, H.-Y.; Wang, N.; Li, S.; Hong, M.; Wang, X.; Feng, Y. The reactive oxygen species in macrophage polarization: reflecting its dual role in progression and treatment of human diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 2016, article ID 2795090.
177. Huang, S. C.-C.; Everts, B.; Ivanova, Y.; O'sullivan, D.; Nascimento, M.; Smith, A. M.; Beatty, W.; Love-Gregory, L.; Lam, W. Y.; O'Neill, C. M. Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nature Immunol.* **2014**, 15 (9), 846-855.
178. Geeraerts, X.; Bolli, E.; Fendt, S.-M.; Van Genderachter, J. A. Macrophage Metabolism As Therapeutic Target for Cancer, Atherosclerosis, and Obesity. *Front. Immunol.* **2017**, 8, DOI: 10.3389/fimmu.2017.00289.
179. Chingle, R.; Proulx, C.; Lubell, W. D. Azapeptide Synthesis Methods for Expanding Side-Chain Diversity for Biomedical Applications. *Acc. Chem. Res.* **2017**, 50, 1541-1556.
180. Karl, J.; Gust, R.; Spruss, T.; Schneider, M. R.; Schoenenberger, H.; Engel, J.; Wrobel, K. H.; Lux, F.; Haeberlin, S. T. Ring-substituted [1, 2-bis (4-hydroxyphenyl) ethylenediamine] dichloroplatinum (II) complexes: compounds with a selective effect on the hormone-dependent mammary carcinoma. *J. Med. Chem.* **1988**, 31 (1), 72-83.

181. Lubell, W. D.; Ong, H.; Turcotte, S.; Mellal, K.; Mulumba, M.; Dif Yaiche, L.; Chemtob, S.; Omri, S. Azasulfurylpeptide-based CD36 modulators and uses. CA Patent WO2016029324A1, March 3 2016.
182. Singh, J.; Fox, R.; Wong, M.; Kissick, T. P.; Moniot, J. L.; Gougoutas, J. Z.; Malley, M. F.; Kocy, O. The structures of alkoxy carbonyl, acyl, and sulfonate derivatives of 1-hydroxybenzotriazole: nitrogen-vs oxygen-substitution. *J. Org. Chem.* **1988**, *53* (1), 205-208.
183. Sengupta, S.; Duan, H.; Lu, W.; Petersen, J. L.; Shi, X. One step cascade synthesis of 4, 5-disubstituted-1, 2, 3-(NH)-triazoles. *Org. Lett.* **2008**, *10* (7), 1493-1496.
184. Gao, J.; Liu, R. T.; Cao, S.; Cui, J. Z.; Wang, A.; To, E.; Matsubara, J. A. NLRP3 inflammasome: activation and regulation in age-related macular degeneration. *Mediators Inflamm.* **2015**, *2015*, article ID 690243.
185. Araki, M. Regeneration of the amphibian retina: role of tissue interaction and related signaling molecules on RPE transdifferentiation. *Dev. Growth Differ.* **2007**, *49* (2), 109-120.
186. Korte, G. E.; Reppucci, V.; Henkind, P. RPE destruction causes choriocapillary atrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1984**, *25* (10), 1135-1145.
187. Liu, X.; Ye, X.; Yanoff, M.; Li, W. Extracellular matrix of retinal pigment epithelium regulates choriocapillaris endothelial survival in vitro. *Exp. Eye Res.* **1997**, *65* (1), 117-126.
188. McLeod, D. S.; Grebe, R.; Bhutto, I.; Merges, C.; Baba, T.; Lutty, G. A. Relationship between RPE and choriocapillaris in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2009**, *50* (10), 4982-4991.
189. Tahiri, H.; Yang, C.; Duhamel, F.; Omri, S.; Picard, E.; Chemtob, S.; Hardy, P. p75 Neurotrophin Receptor Participates in the Choroidal Antiangiogenic and Apoptotic Effects of

T-Lymphocyte-Derived Microparticles LMPs Inhibit Choroidal Angiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**, *54* (9), 6084-6092.

190. Dalvit, C.; Vulpetti, A. Weak Intermolecular Hydrogen Bonds with Fluorine: Detection and Implications for Enzymatic/Chemical Reactions, Chemical Properties, and Ligand/Protein Fluorine NMR Screening. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22* (22), 7592-7601.

191. Bollini, M.; Gallardo-Macias, R.; Spasov, K. A.; Tirado-Rives, J.; Anderson, K. S.; Jorgensen, W. L. Optimization of benzyloxazoles as non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase to enhance Y181C potency. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (4), 1110-1113.

192. Sagan, S.; Josien, H.; Karoyan, P.; Brunissen, A.; Chassaing, G.; Lavielle, S. Tachykinin NK-1 receptor probed with constrained analogues of substance P. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4* (12), 2167-2178.

193. Eleftheriadis, N.; Thee, S.; te Biesebeek, J.; van der Wouden, P.; Baas, B.-J.; Dekker, F. J. Identification of 6-benzyloxysalicylates as a novel class of inhibitors of 15-lipoxygenase-1. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *94*, 265-275.

194. Kelley, J. L.; Linn, J. A.; Selway, J. Synthesis and antirhinovirus activity of 6-(dimethylamino)-2-(trifluoromethyl)-9-(substituted benzyl)-9H-purines. *J. Med. Chem.* **1989**, *32* (8), 1757-1763.

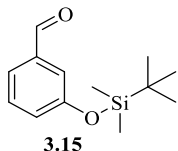
195. Zeng, Q. F., M.; Mollard, A.; Warner, S. L.; Flynn, G.A Preparation of heteroarylamino naphthyridinone derivatives for use as multiple kinase pathway inhibitors. US Patent WO2014052365 (A1), April, 3 2014.

196. Kollman, P.; Nelson, S.; Rothenberg, S. The structure and relative energies of C₂H₂X⁺ isomers (X= fluoro, hydroxyl, amino, chloro, and mercapto). *J. Phys. Chem.* **1978**, *82* (12), 1403-1406.

197. 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.

Annexe 1: Partie expérimentale du chapitre 2

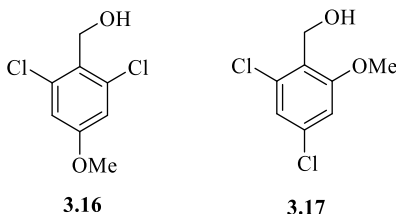
1) 3-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)benzylaldehyde **3.15** ¹⁸¹



In a 1L flamed dried flask containing dry DCM (370 mL) at 0°C, imidazole (1.83 eq., 7.55 g, 110 mmol), 3-hydroxybenzaldehyde (1 eq., 7.4 g, 60.6 mmol) and *tert*-butyldimethylsilyl chloride (1.1 eq., 10 g, 11.5 mL, 66.7 mmol) were introduced successively, and stirred for 15 min. The ice bath was removed, and the mixture was stirred for 18h at room temperature. The reaction mixture was transferred into a separatory funnel, and partitioned between water (100 mL) and DCM (100 mL), and the organic layer was washed with water (2 x 100 mL). The organic phase was dried (MgSO₄), filtered and evaporated. The residue was purified by silica gel chromatography using 19:1 hexane/EtOAc as eluent. Evaporation of the collected fractions provided 3-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)benzaldehyde (**3.15**) (14.4 g, 60.8 mmol, 100 %) as yellow oil: *R_f* 0.68 (4:1 hexane/EtOAc); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.6 (s, 1H), 7.6 – 7.2 (m, 3H), 7.0 (ddd, *J* = 8.0, 2.5, 1.1 Hz, 1H), 1.0 (s, 9H), 0.3 (s, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 192.1, 156.4, 137.9, 130.1, 126.5, 123.6, 119.8, 25.7, 18.2, 4.5; IR (neat) *v*_{max}/cm⁻¹ 2930, 2857, 1703, 1276, 836, 780; C₁₃H₂₁O₂Si [M+H]⁺ calcd 237.1305 found 237.1301.

2) Synthesis of aryl alcohol

a) 2,6-Dichloro-4-methoxybenzyl alcohol (**3.16**) and 2,4-dichloro-6-methoxybenzyl alcohol (**3.17**)¹⁸⁰



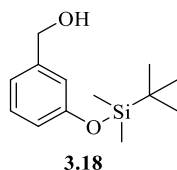
3,5-Dichloroanisole (1 eq., 17.2 g, 97.2 mmol) and paraformaldehyde (0.6 eq., 5.25 g, 4.49 mL, 58.3 mmol) in 258 mL of concentrated HCl (87.4 eq., 309 g, 258 mL, 8.5 mol) and 2.6 mL of concentrated H₂SO₄ were stirred at 60 °C for 7 h in a 1L flask, cooled, and diluted with H₂O (100 mL). The reaction mixture was transferred to a separatory funnel and extracted with DCM (250 mL). The organic layer was washed with water (2 x 100 mL), dried (MgSO₄), and evaporated to an oily residue, that was dissolved in 250 mL of dioxane, treated with 250 mL of 1 N aqueous NaOH, and heated at reflux for 4 h. After cooling, the volatiles were evaporated. The reduced volume was extracted with DCM (3 x 250 mL). The combined organic layers were dried (MgSO₄), and evaporated to a residue that was purified by chromatography on silica gel eluting with 10% EtOAc in hexanes. First to elute was 2,6-dichloro-4-methoxybenzyl alcohol followed by 2,4-dichloro-6-methoxybenzyl alcohol.

2,6-Dichloro-4-methoxybenzyl alcohol (**3.16**) was isolated as a white solid (4.98 g, 24.1 mmol, 25 %): mp 90 °C; R_f 0.51 (8:2 hexane/EtOAc); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 3.8 (s, 3 H), 4.7 (s, 2 H), 6.9 (s, 2 H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.4, 136.4, 128.0, 114.2, 59.5, 55.7;

IR (neat) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1568, 1395, 1308, 1232, 1100, 1045, 1007, 890, 823, 596. HRMS (ESI) for $\text{C}_8\text{H}_7\text{Cl}_2\text{O}$, $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ calculated 188.9869 found 188.9860.

2,4-Dichloro-6-methoxybenzyl alcohol (**3.17**) was isolated as a white solid (3.02 g, 14.6 mmol, 15 %): mp 129 °C; R_f 0.31 (8/2 hexane/EtOAc); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.0 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 6.80 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 4.8 (s, 2H), 3.9 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 159.1, 135.4, 134.7, 125.6, 121.7, 110.2, 57.1, 56.2. IR (neat) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1555., 1060. 1035, 1014, 974, 909, 868, 855; HRMS (ESI) for $\text{C}_8\text{H}_7\text{Cl}_2\text{O}$, $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ calcd 188.9869, found 188.9864.

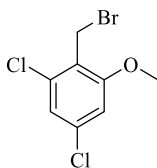
b) 3-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)benzyl alcohol (3.18**)**¹⁸¹



3-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)benzaldehyde (**3.15**) (1 eq., 8 g, 33.8 mmol) in EtOH (60.2 mL) at 0 °C was treated with sodium borohydride (2 eq., 2.56 g, 67.7 mmol), stirred at 0 °C for 15 min, and at room temperature for 50 min. The mixture was concentrated to a residue that was dissolved in EtOAc (100 mL) and washed with distilled water (3 x 100 mL). The organic phase was dried with MgSO_4 , and concentrated to a residue that was purified by chromatography on silica gel using 1:9 EtOAc/hexane. Evaporation of the collected fractions gave 3-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)benzyl alcohol (**3.18**) (6.78 g, 28.4 mmol, 84 %) as yellow oil: R_f 0.4 (9:1 hexane/EtOAc); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.3 (s, 6 H), 1.1 (s, 9 H), 4.6 (s, 2 H), 6.8 (d, 1 H, $J = 8.1$), 6.9 (s, 1 H), 6.95 (d, 1 H, $J = 7.6$), 7.2 (t, 1 H, $J = 7.5$). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ -4.3, 18.2, 25.7, 30.4, 120.2, 120.8, 122.0, 129.7, 139.2, 155.9. IR (neat) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1566, 1397, 1260, 1216, 1038, 904.9, 868, 830, 601; HRMS (ESI) for $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd 239.1462, found 239.1466.

3) Representative synthesis of benzylbromide: ¹⁸¹

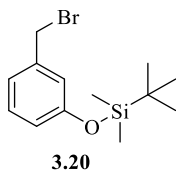
a) 2,4-dichloro-6-methoxybenzylbromide (**3.19**)



3.19

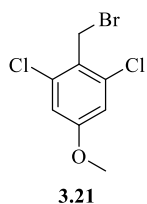
(2,4-Dichloro-6-methoxyphenyl)methanol (**3.17**) (1.84 g, 8.89 mmol) was dissolved in dichloromethane (113 mL), placed under nitrogen atmosphere, cooled to 0°C, treated dropwise with phosphorus tribromide (1.2 g, 0.42 mL, 4.44 mmol), and stirred for 2 h at room temperature. The mixture was transfer into separatory funnel and washed with water (3×100 mL) follow by brine (300 mL). The organic layer was dried with MgSO₄, and filtered. The volatiles were removed under reduced pressure to give a residue that was purified by chromatography on silica gel using 9:1 hexane/EtOAc. Evaporation of the collected fractions gave 2-(bromomethyl)-1,5-dichloro-3-methoxybenzene as solid (**3.19**) (1.79 g, 6.6 mmol, 75%): mp 74 °C; R_f 0.82 (9:1 hexane/EtOAc); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.0 (s, 3 H), 4.7 (s, 2 H), 6.8 (s, 1 H), 7.1 (s, 1 H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.7, 136.0, 135.5, 123.3, 121.8, 110.4, 56.4, 24.4. IR (neat) ν_{max}/cm⁻¹ 1565, 1397, 1216, 1037, 904, 868, 831, 601. HRMS (ESI) for C₈H₇BrCl₂O [M+H]⁺ calcd 268.91350 found 268.91580.

b) 3-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)benzyl bromide (3.20)



Employing the protocol described above for the synthesis of 2,4-dichloro-6-methoxybenzylbromide (**3.19**), 3-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)benzyl bromide (**3.20**) was synthesized from 3-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)benzyl alcohol (**3.18**) (2g, 8.39 mmol) and obtained as clear oil (1.89, 6.23 mmol, 75% yield): R_f 0.84 (9:1 hexane/EtOAc); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.3 (s, 6 H), 1.0 (s, 9 H), 4.5 (s, 2 H), 6.8 (d, 1 H, $J = 7.8$) 6.9 (t, 1 H $J = 1.97$) 7.0 (d, 1 H, $J = 7.59$) 7.2 (t, 1 H, $J = 7.6$). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 155.9, 139.2, 129.7, 122.0, 120.8, 120.2, 33.4, 25.7, 18.2, - 4.4, (neat) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1158, 1061, 1034, 978, 912, 694; HRMS $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{BrOSi}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd 164.9556 found 164.9561

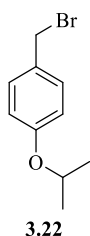
c) 2,6-Dichloro-4-methoxybenzyl bromide (3.21)



Employing the protocol described above for the synthesis of 2,4-dichloro-6-methoxybenzylbromide (**3.19**), 2,6-dichloro-4-methoxybenzylbromide (**3.21**) was synthesized from 2,6-dichloro-4-methoxybenzyl alcohol (**3.16**) (3.67g, 17.72mmol) and isolated as white powder (4.65 g, 17.23 mmol, 97% yield): 94-96 °C; R_f 0.92 (9:1 hexane/EtOAc); $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 3.8 (s, 3 H), 4.9 (s, 2 H), 6.9 (s, 2 H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 55.8, 59.8,

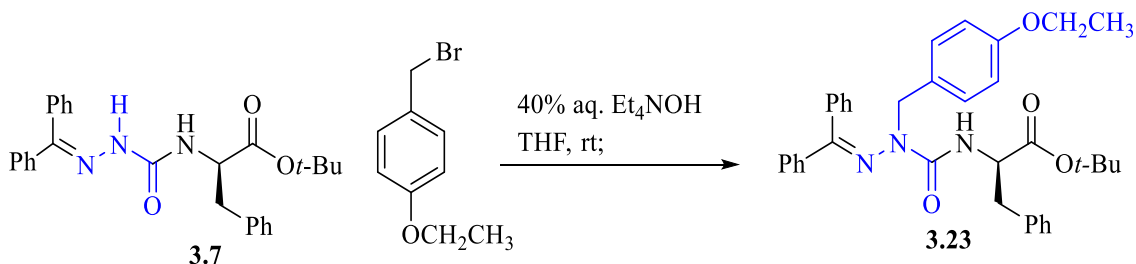
114.4, 128.0, 136.4, 159.6. IR (neat) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1184, 978, 861, 851, 575. HRMS (ESI) for $\text{C}_8\text{H}_7\text{BrCl}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd 268.91350 found 268.91730

d) 4-*iso*-propoxybenzyl bromide (3.22)



Employing the protocol described above for the synthesis of 2,4-dichloro-6-methoxybenzylbromide (**3.19**), 4-*iso*-propoxybenzyl bromide (**3.22**) was synthesized from 4-*iso*-propoxybenzyl alcohol (4.5 g, 27.67 mmol) to give a clear oil (6.09 g, 26.57 mmol, 96% yield): R_f : 053 (9:1 hexane/EtOAc); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.33 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.87 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.58 (dd, $J = 12.1, 6.1$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H), 1.36 (d, $J = 6.1$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 158.1, 130.5, 129.6, 115.9, 69.9, 34.2, 22.0. IR (neat) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1507, 1298, 1227, 1180, 1113, 595.

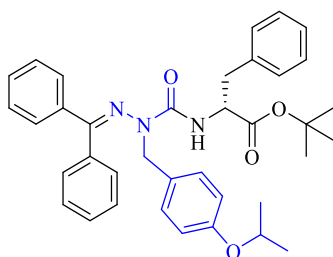
4) Benzhydrylidene-aza-4-ethoxyphenylalaninyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester (3.23)⁷⁸



Employing the protocol described above for the synthesis of aza-dipeptide ester (**3.8p**)³ using aza-glycine (**3.7**) (1 eq., 925 mg, 2.09 mmol) and 4-ethoxybenzyl bromide (3 eq., 1.34 g, 6.26 mmol), aza-dipeptide ester (**3.8r**) (1.2 g, 2.07 mmol, 99 %) was prepared, purified by chromatography on silica gel using an eluent of 10-20% of ethyl acetate in hexane and isolated as yellow oil: $[\alpha]_D^{25}$ 56.4°; R_f 0.81 (7:3 hexane/EtOAc); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.52 – 7.32 (m, 4H), 7.32 – 7.21 (m, 9H), 7.20 – 7.13 (m, 2H), 7.05 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.71 (s, 3H), 4.83 (dt, J = 8.4, 6.3 Hz, 1H), 4.59 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 4.36 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 3.98 (q, J = 7.0 Hz, 3H), 3.29 – 3.08 (m, 2H), 1.43 (d, J = 5.4 Hz, 12H), ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 171.2, 158.4, 157.8, 157.4, 138.9, 136.7, 135.8, 129.8, 129.6, 129.3, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.0, 126.8, 114.0, 81.7, 63.3, 54.9, 48.5, 38.6, 28.0, 14.8. IR (neat) ν_{max}/cm^{-1} 1671, 1494, 1148, 1062, 1038, 912, 731, 697. HRMS (ESI) calcd for C₃₆H₄₀N₃O₄ [M+H]⁺, 578.3013 found 578.3024.

a) Benzhydrylidene-aza-4-isopropoxyphenylalaninyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester

(3.8h)



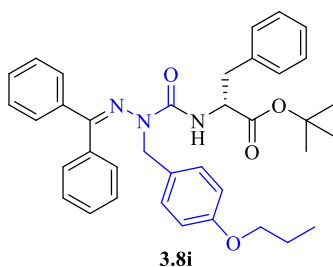
3.8h

Employing the protocol for the synthesis of aza-dipeptide ester (**3.8p**), aza-glycine **7** (1 eq., 925 mg, 2.09 mmol) was reacted with 4-isopropoxybenzyl bromide (3eq., 1.43 g, 6.27mmol) to

provide aza-phenylalanine (**3.8h**) (1160 mg, 1.96 mmol, 94 % yield) as yellow oil: $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 38°; R_{f} 0.5 (7:3 hexane/EtOAc); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.49 – 7.33 (m, 4H), 7.31 – 7.20 (m, 9H), 7.16 (dd, J = 8.0, 1.4 Hz, 2H), 7.03 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.70 (s, 4H), 4.83 (dt, J = 8.4, 6.3 Hz, 1H), 4.59 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 4.47 (dt, J = 12.1, 6.1 Hz, 1H), 4.35 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 3.26 – 3.10 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.30 (d, J = 6.1 Hz, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 171.2, 158.4, 157.3, 156.7, 139.0, 136.7, 135.8, 129.6, 129.6, 129.3, 128.5, 128.5, 128.4, 128.3, 128.0, 126.7, 115.5, 81.7, 69.9, 54.9, 48.5, 38.6, 28.0, 22.0. IR (neat) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1676, 1494, 1367, 1238, 1147, 1108, 919, 753, 697. HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 592.3170 found 592.3176.

b) Benzhydrylidene-aza-4-propoxyphenylalaninyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester

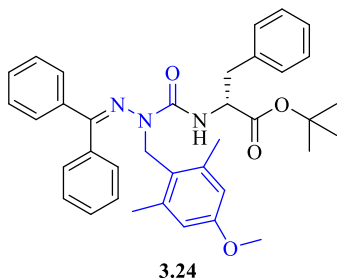
(3.8i)



Employing the protocol for the synthesis of aza-dipeptide ester (**3.8p**), aza-glycine (**3.7**) (1 eq., 925 mg, 2.09 mmol) was reacted with 4-*n*-propoxybenzyl bromide (3 eq., 1.43mg, 6.27 mmol) to provide aza-phenylalanine (**3.8i**) (1.18 g, 2 mmol, 96 %) as yellow oil: $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 34.8° (CHCl_3 , c 1.00); R_{f} 0.76 (7:3 hexane/EtOAc); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.50 – 7.32 (m, 4H), 7.32 – 7.20 (m, 8H), 7.16 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 2H), 7.06 – 7.01 (m, 1H), 6.97 – 6.84 (m, 1H), 6.71 (s, 3H), 4.83 (dt, J = 8.4, 6.3 Hz, 1H), 4.59 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 4.36 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 4.00 – 3.90 (m, 1H), 3.86 (dd, J = 8.2, 5.0 Hz, 2H), 3.27 – 3.11 (m, 2H), 1.82 – 1.75 (m, 2H), 1.44

(s, 9H), 1.02 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 171.2, 158.4, 158.0, 157.3, 138.9, 136.7, 135.8, 129.7, 129.6, 129.3, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.0, 126.7, 114.0, 81.7, 69.4, 54.9, 48.5, 38.6, 28.7, 22.6, 10.5; IR (neat) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1676, 1495, 1238, 1174, 1147, 1110, 916, 741, 699.46. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 592.3170 found 592.3171.

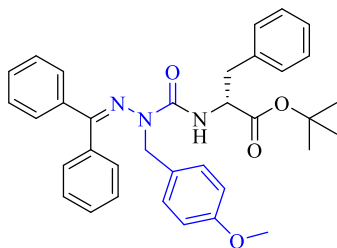
**c) Benzhydrylidene-aza-(2,6-dimethyl-4-methoxy)phenylalaninyl-D-phenylalanine
tert-butyl ester (3.24)**



Employing the protocol for the synthesis of aza-dipeptide ester (**3.8p**), aza-glycine **7** (1 eq., 925 mg, 2.09 mmol) was reacted with 2,6-dimethyl-4-methoxybenzyl bromide (3 eq., 1.43, 6.27 mmol) to provide aza-phenylalanine (**3.24**) (1.18 g, 2 mmol, 96 % yield) as yellow oil: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 39.4^\circ$ (CHCl_3 , c 1.00); R_f 0.58 (8:2 hexane/EtOAc); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.53 – 7.42 (m, 3H), 7.41 – 7.23 (m, 4H), 7.19 – 7.07 (m, 6H), 6.62 – 6.53 (m, 2H), 6.32 (s, 2H), 5.81 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.70 (ddd, $J = 39.1, 20.1, 10.7$ Hz, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.18 – 3.02 (m, 2H), 2.01 (s, 6H), 1.41 (s, 9H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 173.6, 171.3, 158.3, 140.0, 137.3, 136.6, 131.0, 129.4, 129.3, 128.7, 128.4, 128.2, 128.1, 127.5, 126.8, 124.9, 113.3, 81.7, 55.0, 54.7, 47.0, 38.7, 28.0, 20.1; IR (neat) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1494, 1142, 1064, 904, 752, 696. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 592.3173 found 592.3170.

d) Benzhydrylidene-aza-4-methoxyphenylalaninyl-D-phenylalanine *tert*-butyl ester

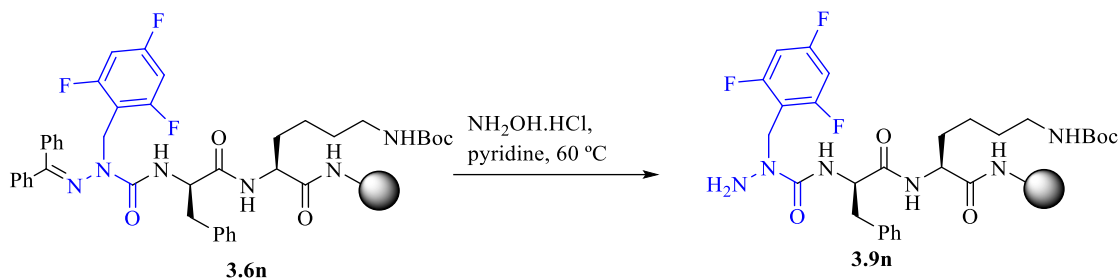
(3.8g)



(3.8g)

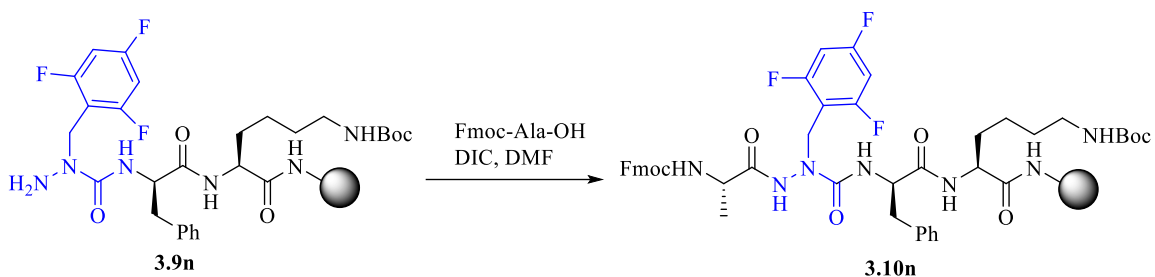
Employing the protocol for the synthesis of aza-dipeptide ester ((**3.8p**), aza-glycine (**3.7**) (1 eq., 925 mg, 2.09 mmol) was reacted with 4-methoxybenzyl bromide (3 eq, 1.25g, 6.27 mmol) to provide aza-phenylalanine (**3.8g**) (1.18 g, 2.09 mmol, 100 % yield) as yellow oil: $[\alpha]_D^{25} -14.4^\circ$ (CHCl_3 , c 1.00); R_f 0.33 (9:1 hexane/EtOAc); $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.50 – 7.33 (m, 4H), 7.32 – 7.22 (m, 9H), 7.21 – 7.15 (m, 2H), 7.06 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.83 – 6.66 (m, 4H), 4.85 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.60 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 4.38 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.30 – 3.11 (m, 2H), 1.45 (s, 9H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 171.2, 158.4, 158.4, 157.1, 138.9, 136.7, 135.8, 129.8, 129.6, 129.6, 129.3, 128.6, 128.4, 128.3, 128.0, 126.8, 113.4, 81.7, 55.2, 54.9, 48.5, 38.6, 28.0. IR (neat) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1675, 1486, 1443, 1366, 1243, 1149, 767, 695, 551. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 564.2857 found 564.2871.

5) Representative protocol for deprotection of the semi-carbazone on solid support: aza-2,4,6-trifluorophenylalaninyl-D-phenylalaninyl-*N*^ε-(Boc)lysine Rink amide resin (**3.9n**)⁷⁶



A solution of 1.5 M of $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ in pyridine (10 mL) was added to a 20 mL microwave vial containing benzhydrylidene-aza-2,4,6-trifluorophenylalaninyl-D-phenylalaninyl-*N*^ε-(Boc)lysine Rink amide resin (**3.6n**, 1 eq, 0.5 mmol). The vial was closed properly and subjected to sonication at 60°C for 16 h. The resin was filtered, washed with DMF (3×10 mL), MeOH (3×10 mL), THF (3×10 mL), and DCM (3×10 mL), dried under vacuum, and stored in the fridge. The reaction was monitored by LCMS after filtration of the product from cleavage of a resin aliquot (5 mg) using 1 mL of TFA/TES/ H_2O (95:2.5:2.5, v/v/v). The LCMS analysis indicated 80% conversion of semicarbazone (**3.6n**) [20-80 % MeOH (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 14 min, RT 8.3 min] into semicarbazide (**3.9n**) (RT 4.48 min).

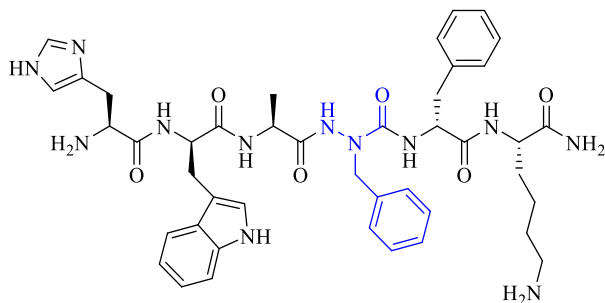
6) Representative acylation of aza-peptide Rink amide resin with Fmoc-Ala-OH: Fmoc-alaninyl-2,4,6-trifluorophenylalaninyl-D-phenylalaninyl-*N*^E-(Boc)lysine Rink amide resin (**3.10n**)⁷⁶



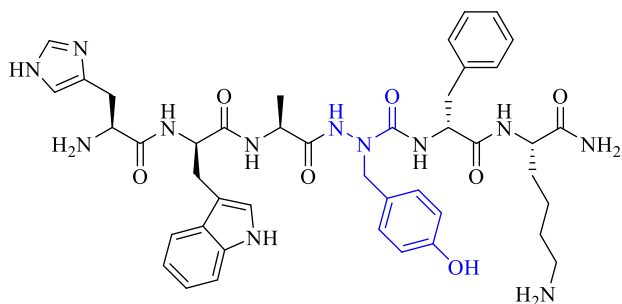
Fmoc-L-Alanine (10 eq., 1.49 g, 5 mmol) was treated with DIC (5 eq., 0.32g, 0.39 mL, 2.5 mmol) in DCM (10 mL) for 30 sec. The volatiles were evaporated to a residue that was dissolved in DMF (10 ml) and transferred to a syringe containing aza-2,4,6-trifluoro phenylalanine resin (**3.9n**) (1 eq., 1.2g., 0.5 mmol). The syringe was closed properly, and agitated on an automatic shaker for 16 h. As described for resin (**3.9n**), the resin was washed and a 5 mg aliquot of resin was cleaved for analysis by LC-MS. The LC-MS indicated 85% conversion of semicarbazide (**3.9n**) [20-80 % MeOH (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 14 min, RT 4.48 min] into Fmoc-alaninyl-2,4,6-trifluorophenylalaninyl-glycinyl-D-phenylalaninyl-lysine amide (**3.10n**) (RT 8.17 min).

I. Caractérisation des données

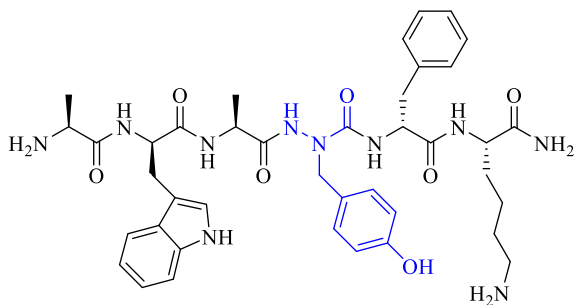
1) Azapeptides



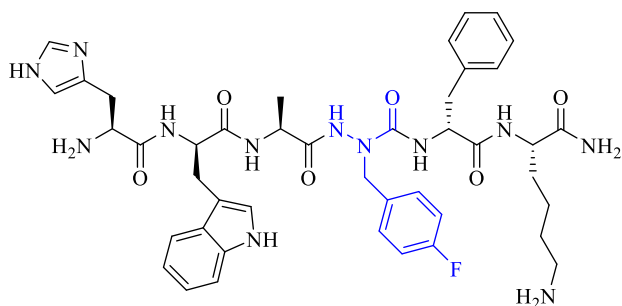
H-His-D-Trp-Ala-aza-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.2a): yield 3%; LCMS [20-50 % MeOH (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 20 min, RT 8.9 min] and [15-30 % MeCN (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 20 min, RT 15.1 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₅N₁₂O₆ [M+H]⁺, 835.4362 found 835.4374; LC-MS (ESI) calcd for C₄₃H₅₅N₁₂O₆ [M+H]⁺, 835.4 found 835.4



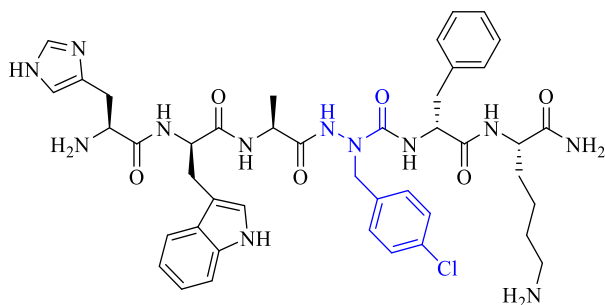
H-His-D-Trp-Ala-aza-Tyr-D-Phe-Lys-NH₂ (3.2b): yield 10%; LCMS [10-50 % MeOH (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 20 min, RT 8.2 min] and [10-40 % MeCN (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 14 min, RT 8.2 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₄N₁₂O₇ [M+H]⁺, 851.4311 found 851.4322; LC-MS (ESI) calcd for C₄₀H₅₃N₁₀O₇ [M+H]⁺, 851.4 found 851.4



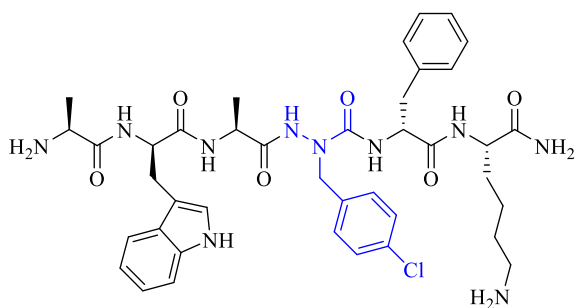
H-Ala-D-Trp-Ala-aza-Tyr-D-Phe-Lys-NH₂ (3.1b): yield 13%; LCMS [10-50 % MeOH (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 20 min, RT 13.4 min] and [10-50% MeCN (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 14 min, RT 4.0 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₀H₅₃N₁₀O₇ [M+H]⁺, 785.4093 found 785.4103; LC-MS (ESI) calcd for C₄₀H₅₃N₁₀O₇ [M+H]⁺, 785.4 found 785.4



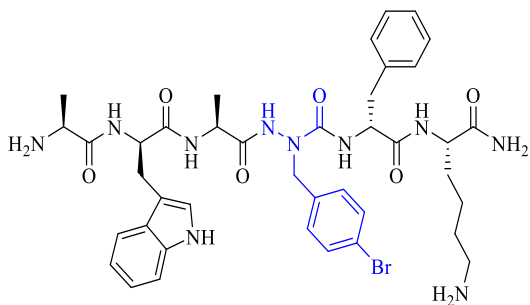
H-His-D-Trp-Ala-aza-(4-fluoro)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.2c): yield 6%; LCMS [10-50 % MeOH (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 20 min, RT 11.8 min] and [5-50% MeCN (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 14 min, RT 5.1 min]; HRMS Calcd *m/z* for C₄₃H₅₄FN₁₂O₆ [M+H]⁺ 853.4268 found 853.4269. LCMS (ESI) calcd *m/z* for C₄₃H₅₄FN₁₂O₆ [M+H]⁺, 853.4 found *m/z* 853.4.



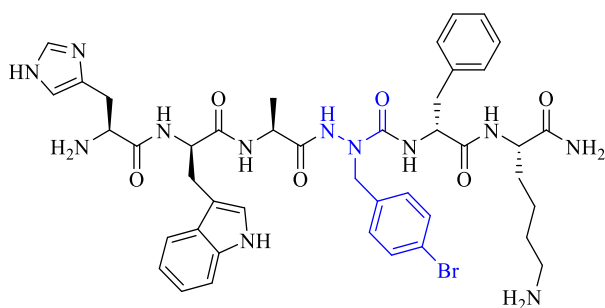
H-His-D-Trp-Ala-aza(4-chloro)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.2d): yield 2%; LCMS [10-80 % MeOH (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 14 min, RT 6.7 min] and [10-80% MeCN (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 14 min, RT 4.8 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₄ClN₁₂O₆ [M+H]⁺, 869.39723 found 869.39667. LCMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₄ClN₁₂O₆ [M+H]⁺, 869.4 found 869.4.



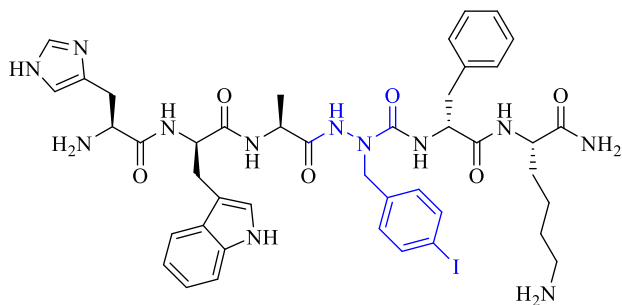
H-Ala-D-Trp-Ala-aza(4-chloro)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.1d): yield 1%; LCMS [25-50 % MeOH (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 14 min, RT 7.3 min] and [25-45% MeCN (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 14 min, RT 7.0 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₀H₅₂ClN₁₀O₆ [M+Na]⁺ 825.3574 found 825.3584; LCMS (ESI) calcd for C₄₀H₅₂ClN₁₀O₆ [M+2H]⁺/2 402.3 found 402.8,



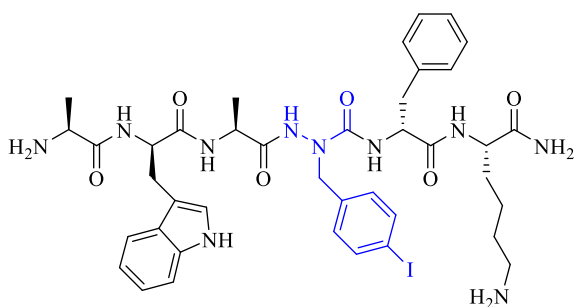
H-Ala-D-Trp-Ala-aza-(4-bromo)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.1e): yield 1%; LCMS [25-50 % MeOH (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 14 min, RT 7.8 min] and [20-40% MeCN (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 14 min, RT 5.4 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₀H₅₂BrN₁₀O₆ [M+H]⁺, 869.3972 Found 869.3967 LCMS (ESI) calcd for C₄₀H₅₂BrN₁₀O₆ [M+H]⁺, 869.4 Found 869.4.



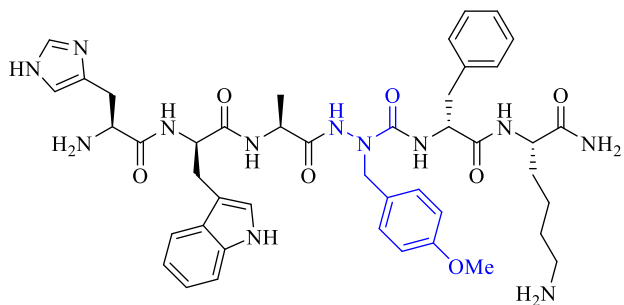
H-His-D-Trp-Ala-aza-(4-bromo)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.2e): yield 2%; LCMS [25-50 % MeOH (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 14 min, RT 3.5 min] and [25-35% MeCN (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 14 min, RT 6.1 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₄BrN₁₂O₆ [M+2H]²⁺, 457.1770 Found 457.1766, LCMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₄BrN₁₂O₆ [M+H]⁺, 913.3 Found 913.4.



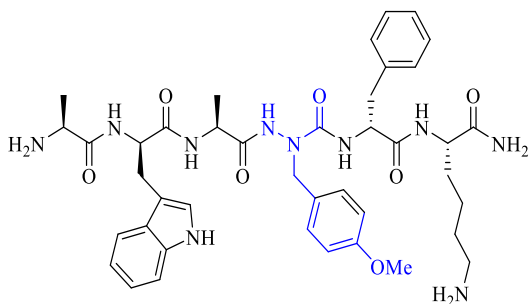
H-His-D-Trp-Ala-aza-(4-iodo)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.2f): yield 2%; LCMS [30-50% MeOH (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 20 min, RT 8.4 min] and [10-50% MeCN (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 16 min, RT 5.7 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₃NaIN₁₂O₆ [M+Na]⁺, 983.3148 Found 983.3140; LCMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₃NaIN₁₂O₆ [M+H]⁺, 961.3 Found 961.3.



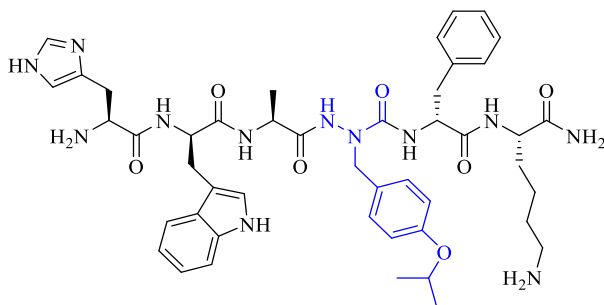
H-Ala-D-Trp-Ala-aza-(4-iodo)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.1f): yield 1.5%; LCMS [40-60% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min, RT 7.8 min] and [25-40% MeCN (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 20 min, RT 8.2 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₀H₅₂IN₁₀O₆ [M+H]⁺, 895.3110 Found 895.3105; LCMS (ESI) calcd for C₄₀H₅₂IN₁₀O₆ [M+H]⁺, 895.3 Found 895.3.



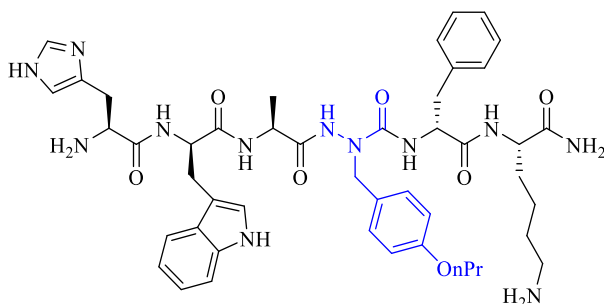
H-His-D-Trp-Ala-aza-(4-methoxy)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.2g): yield 10%; LCMS [25-45% MeOH (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 14 min, RT 7.6 min] and [10-35% MeCN (0.1% FA)/ water (0.1% FA), 14 min, RT 6.9 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₄H₅₇N₁₂O₇ [M+H]⁺, 865.4468 found 865.4467. LCMS (ESI) calcd for C₄₄H₅₇N₁₂O₇ [M+H]⁺, 865.4 found 865.4.



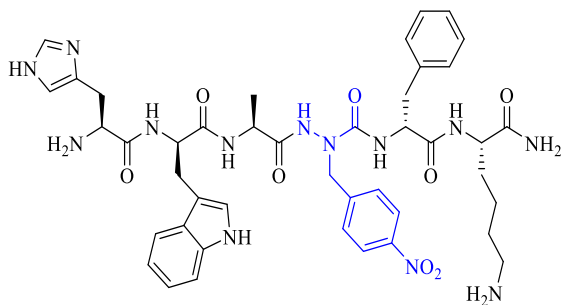
H-Ala-D-Trp-Ala-aza-(4-methoxy)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.1g): yield 6%; LCMS [10-50% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min, RT 13.4 min] and [20-40% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min, RT 9.0 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₁H₅₄NaN₁₀O₇ [M+Na]⁺, 821.4069 found.821.4052; LCMS (ESI) calcd for C₄₁H₅₄NaN₁₀O₇ [M+H]⁺, 799.4 found.799.4.



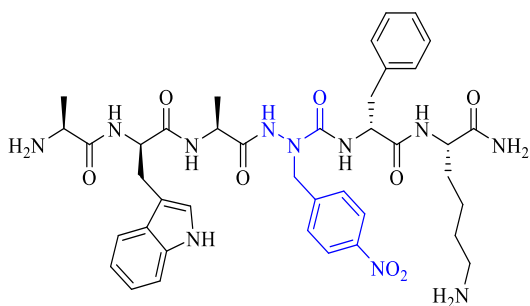
H-His-D-Trp-Ala-aza-(4-*iso*-propoxy)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.2h): yield 1%; LCMS [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 5.3 min] and [10-80% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 3.8 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₆H₆₁N₁₂O₇ [M+H]⁺, 893.4781 found m/z 893.4786; LCMS (ESI) calcd for C₄₆H₆₁N₁₂O₇ [M+2H]^{+/2}, 447.2 found m/z found 447.3.



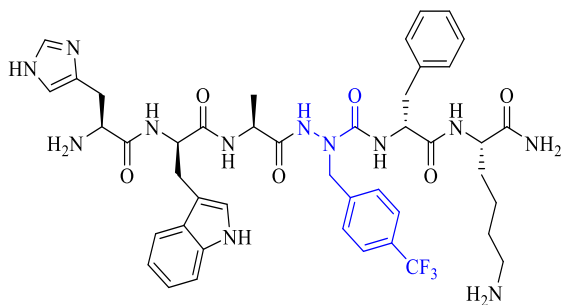
H-His-D-Trp-Ala-aza-(4-*n*-propoxy)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.2i): yield 3%; LCMS [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 4.7 min] and [5-80% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 4.2 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₆H₆₁N₁₂O₇ [M+2H]^{+/2}, 447.2427 found m/z 447.2442; LCMS (ESI) calcd for C₄₆H₆₁N₁₂O₇ [M+2H]^{+/2}, 447.2 found m/z 447.3.



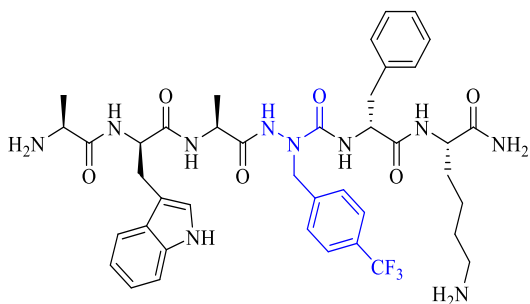
H-His-D-Trp-Ala-aza-(4-nitro)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.2j): yield 1%; LCMS [10-30% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 7.6 min] and [10-40% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 3.9 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₄N₁₃O₈ [M+H]⁺, 880.4213 found 880.4196. LCMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₄N₁₃O₈ [M+H]⁺, 880.4 found 880.4.



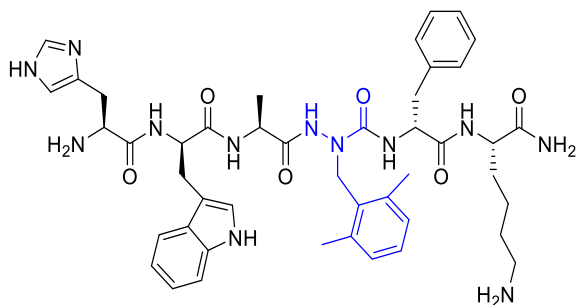
H-Ala-D-Trp-Ala-aza-(4-nitro)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.1j): yield 1%; LCMS [35-55% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min, RT 7.2 min] and [20-30% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min, RT 13.9 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₀H₅₂N₁₁O₈ [M+Na]⁺, 836.3814 found 836.3809 LCMS (ESI) calcd for C₄₀H₅₂N₁₁O₈ [M+H]⁺, 814.4 found 814.4.



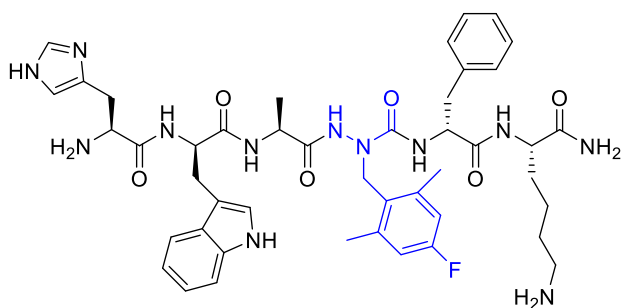
H-His-D-Trp-Ala-aza-[4-(trifluoromethyl)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.2k): yield 4%; LCMS [10-50% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min, RT 14.0 min] and [10-50% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 4.9 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₄H₅₃F₃N₁₂O₆ [M+H]⁺, 903.4236 found 903.4238. LCMS (ESI) calcd for C₄₄H₅₄F₃N₁₂O₆ [M+H]⁺, 903.4 found 903.4.



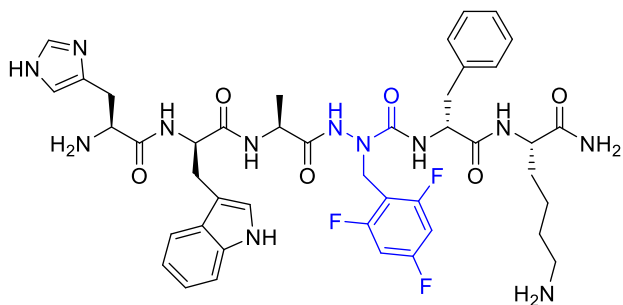
H-Ala-D-Trp-Ala-aza-[4-(trifluoromethyl)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.1k): yield 4%; LCMS [35-55% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min, RT 11.3 min] and [25-40% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min, RT 11.8 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₁H₅₂F₃N₁₀O₆ [M+H]⁺, 837.4018 found 837.4032; LCMS (ESI) calcd for C₄₁H₅₂F₃N₁₀O₆ [M+H]⁺, 837.4 found 837.4.



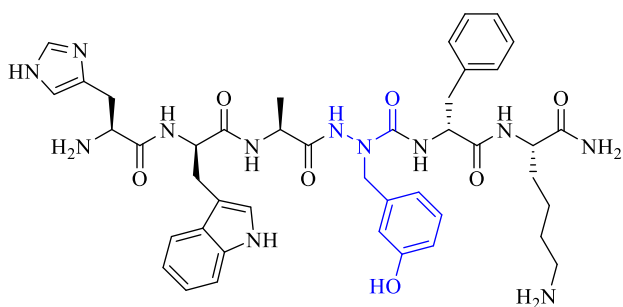
H-His-D-Trp-Ala-aza-(2,6-dimethyl)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.2l): yield 7%; LCMS [30-60% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 5.3 min] and [15-40% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 12 min, RT 6.2 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₅H₅₈NaN₁₂O₆ [M+Na]⁺, 885.4494 found 885.4489. LCMS (ESI)



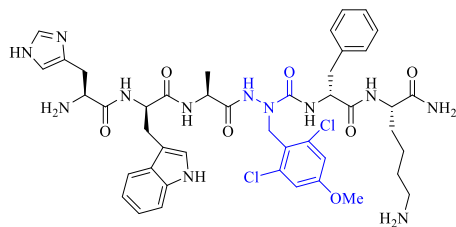
H-His-D-Trp-Ala-aza-(4-fluoro-2,6-dimethyl)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.2m): yield 8%; LCMS [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 5.5 min] and [5-80% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 5.6 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₅H₅₇FN₁₂O₆ [M+2H]⁺/2, 441.2327 found 441.2348; LCMS (ESI) calcd for C₄₅H₅₇FN₁₂O₆ [M+2H]⁺/2, 441.3 found *m/z* 441.3.



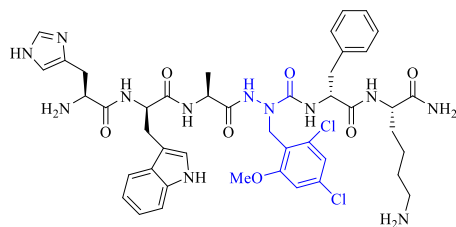
H-His-D-Trp-Ala-aza-(2,4,6-trifluoro)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.2n): yield 10%; LCMS [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 6.2 min] and [5-80% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 6.0 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₁F₃N₁₂O₆ [M+2H]^{+/2}, 445.2076 found 445.2092; LCMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₁F₃N₁₂O₆ [M+2H]^{+/2}, 445.2 found *m/z* 445.3.



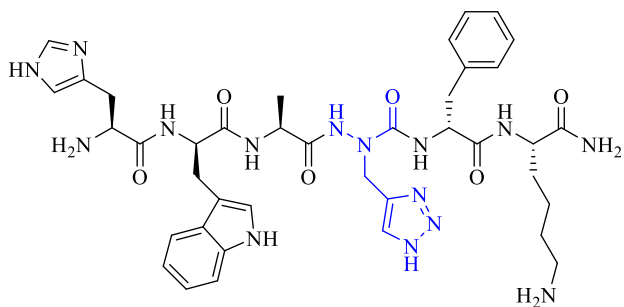
H-His-D-Trp-Ala-aza-(3-hydroxy)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.2o): yield 3%; LCMS [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 5.5 min] and [5-80% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 2.6 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₅N₁₂O₇ [M+H]^{+/2}, 426.2192 found 426.2208. LCMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₅N₁₂O₇ [M+H]⁺, 826.4 found 826.4.



H-His-D-Trp-Ala-aza-(2,6-dichloro-4-methoxy)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.2p): yield 2%; LCMS [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 5.0 min] and [5-80% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 6.0 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₃ClN₁₂O₆ [M+2H]⁺/2, 467.1888 found 467.1902; LCMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₃ClN₁₂O₆ [M+2H]⁺/2, 467.2 found 467.2.

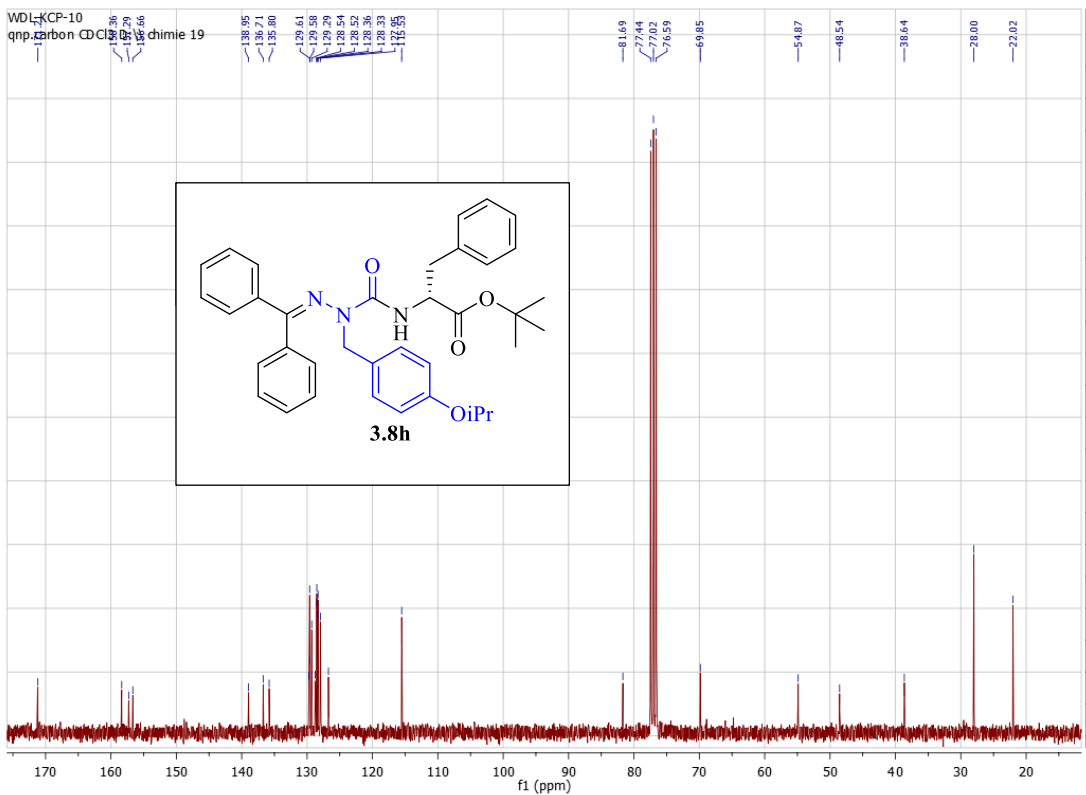
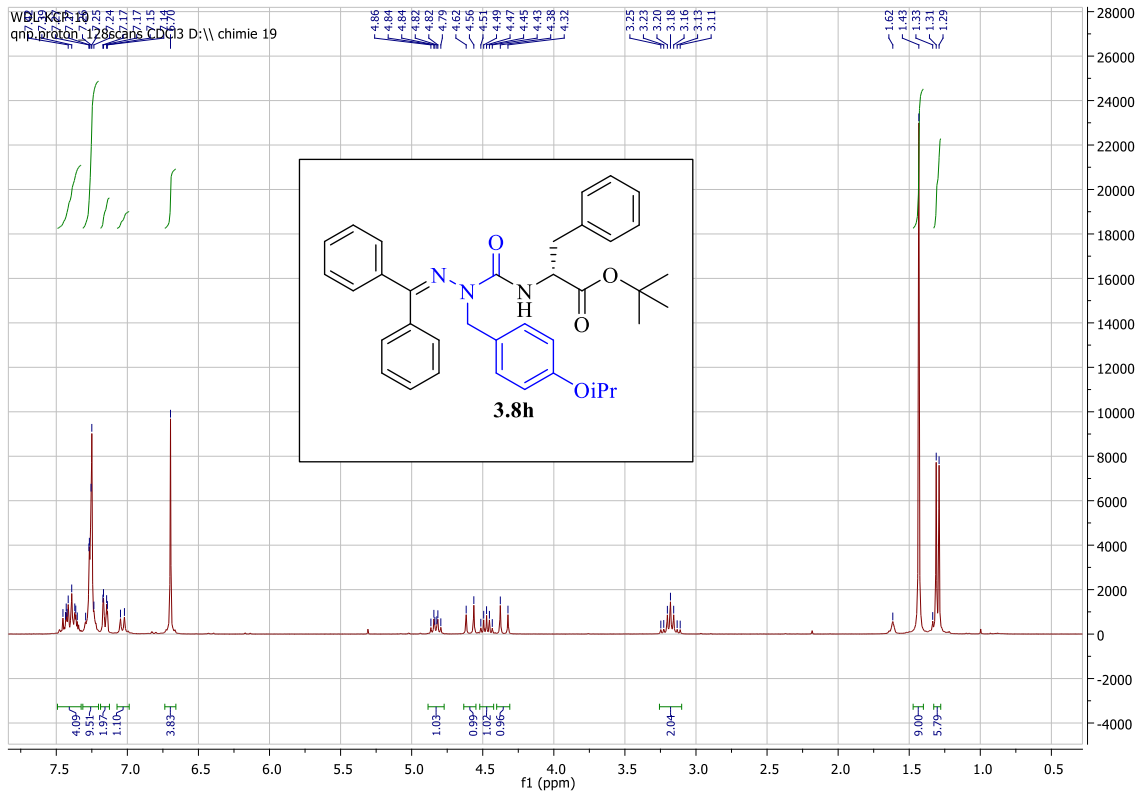


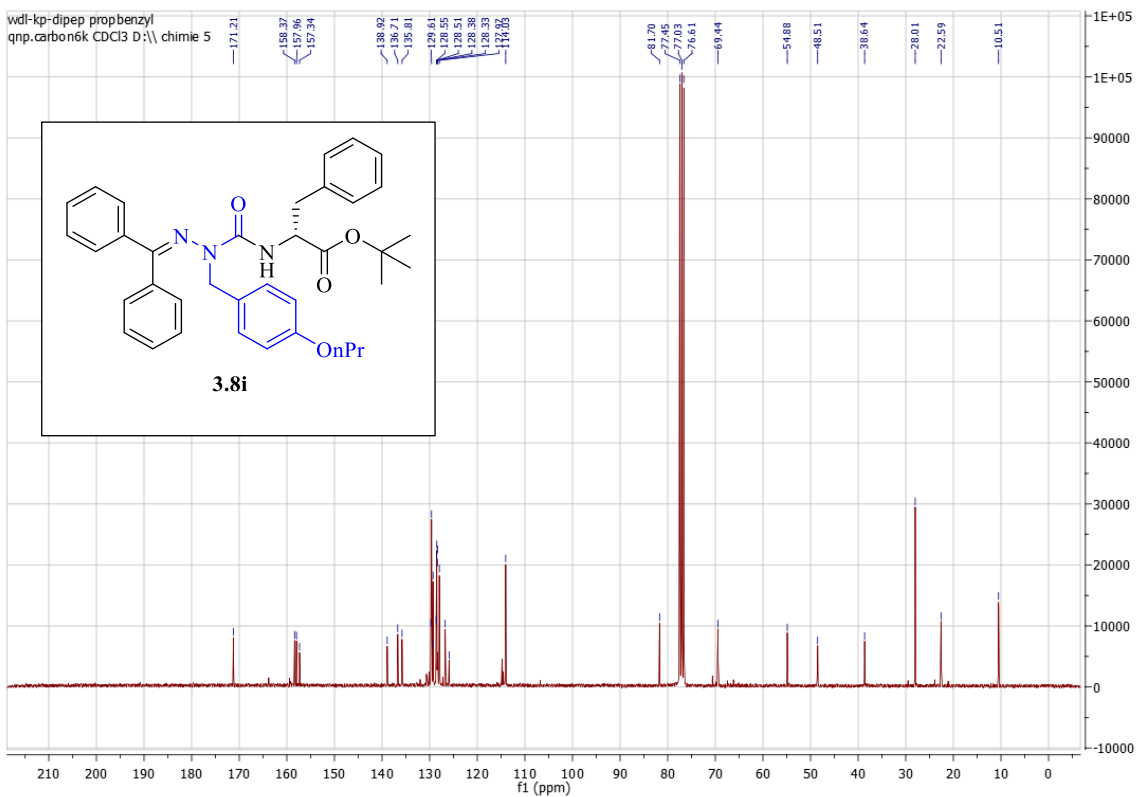
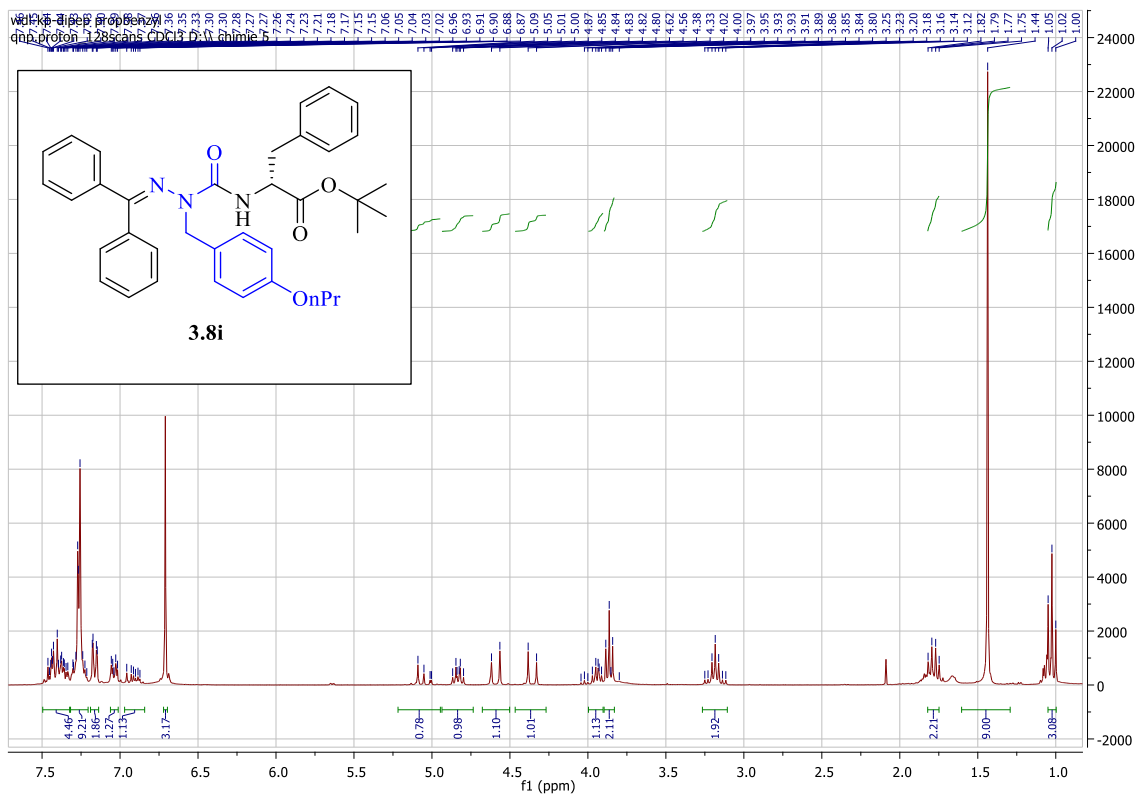
H-His-D-Trp-Ala-aza-(2,4-dichloro-6-methoxy)-Phe-D-Phe-Lys-NH₂ (3.2q): yield 1%; LCMS [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 6.4 min] and [5-80% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 6.3 min]; HRMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₃ClN₁₂O₆ [M+2H]⁺/2, 467,1888 found 467,1900; LCMS (ESI) calcd for C₄₃H₅₃ClN₁₂O₆ [M+2H]⁺/2, 467.2 found 467.2.

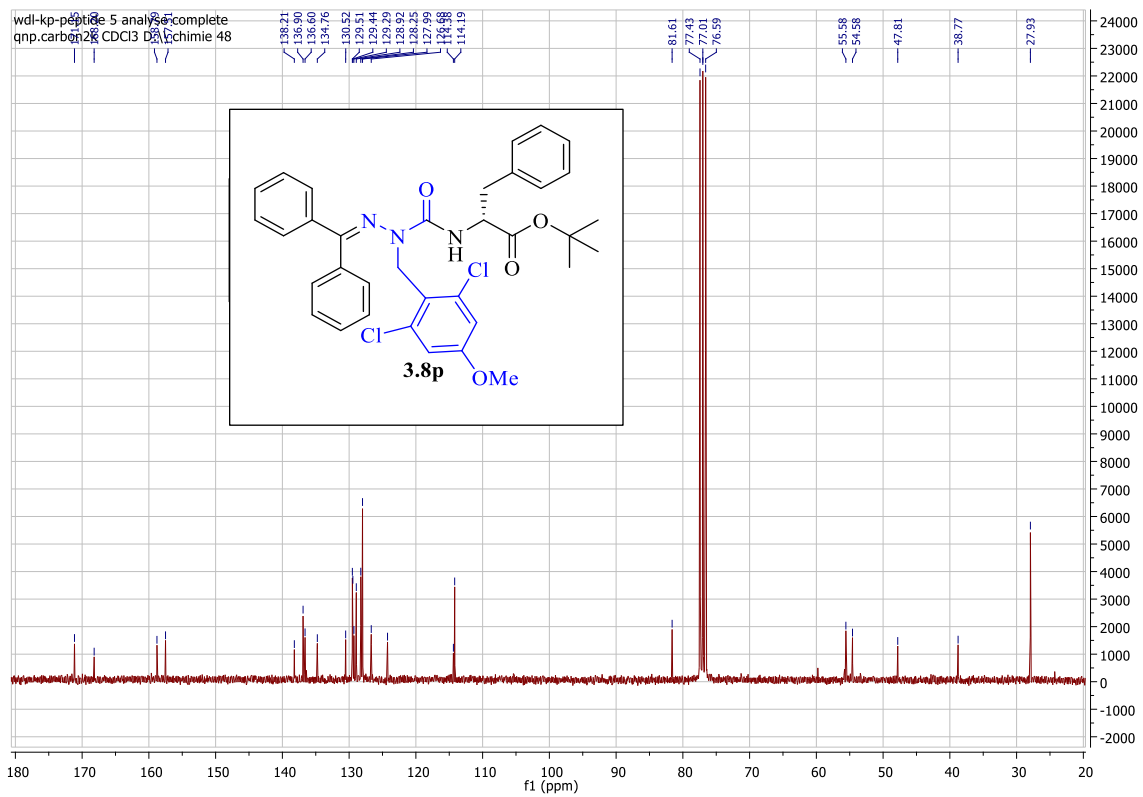
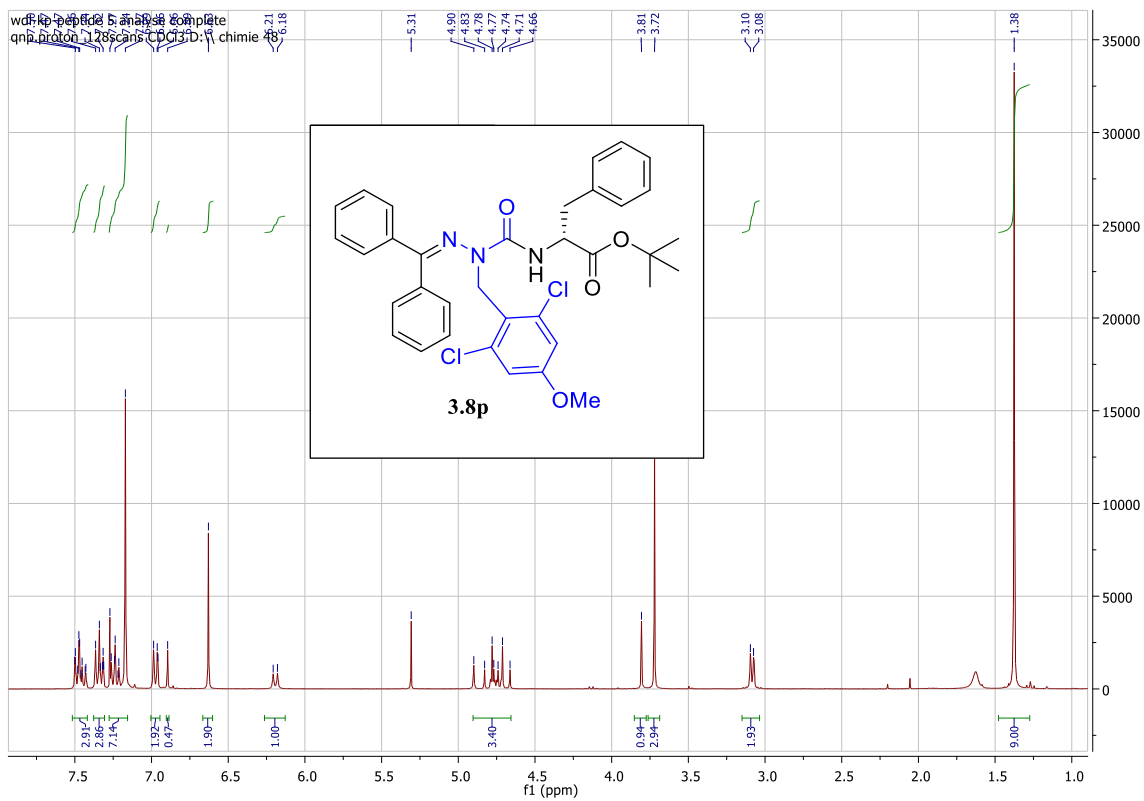


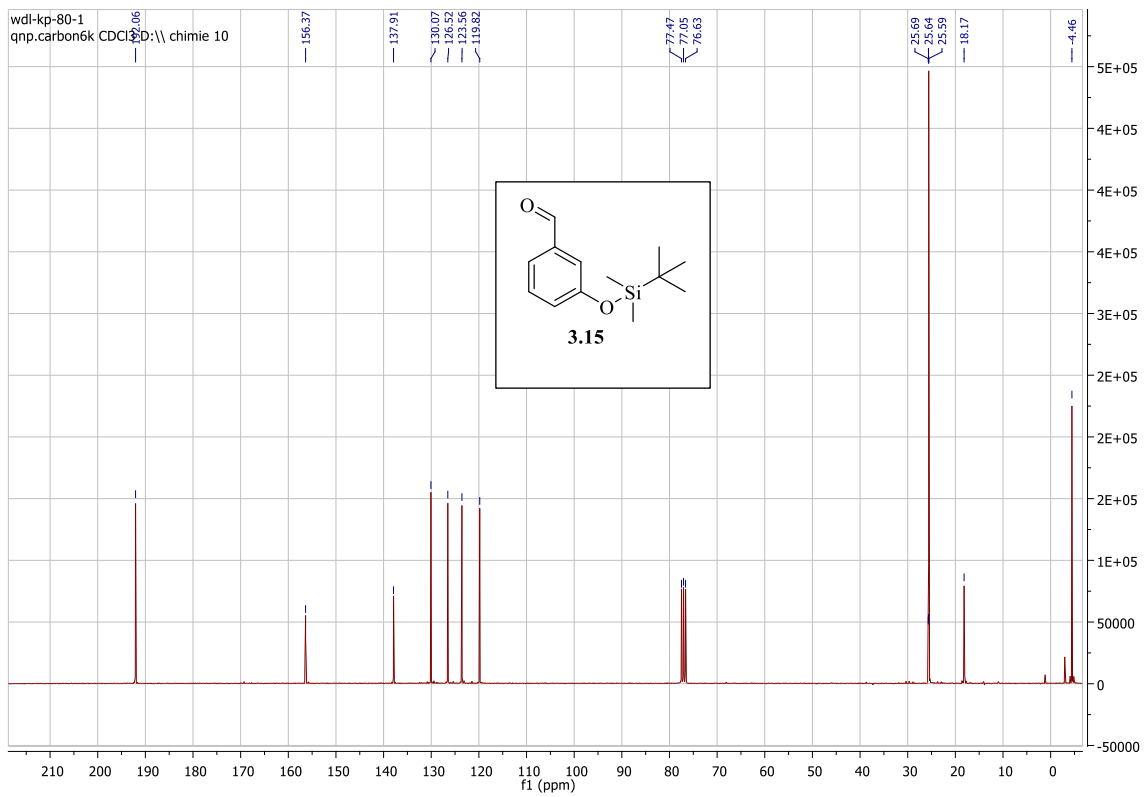
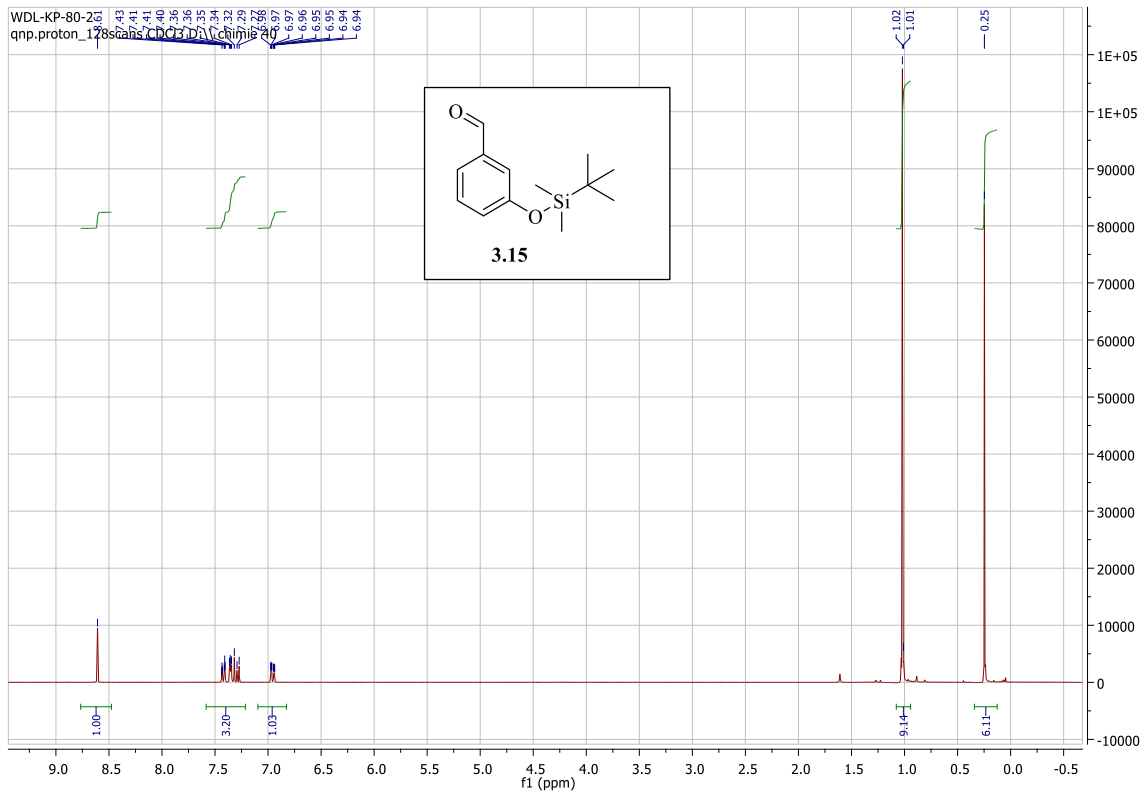
H-His-D-Trp-Ala-aza-(1,2,3-triazole)-Ala-D-Phe-Lys-NH₂ (3.3): yield 3%; LCMS [0-50% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 7.7 min] and [0-30% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min, RT 8.8 min]; HRMS (ESI) calcd for 826.4220 found 826.4211; LC-MS Calcd m/z for C₃₉H₅₂N₁₅O₆ [M+2H]⁺ 827.4, found 827.4.

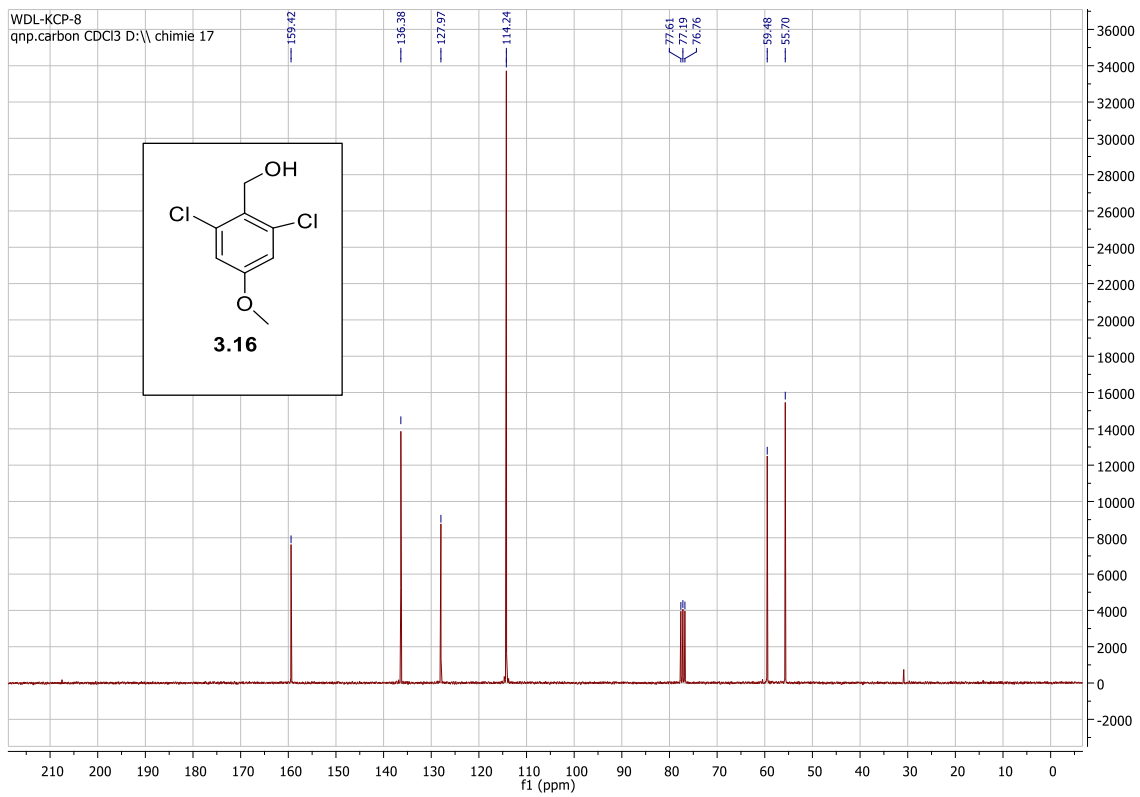
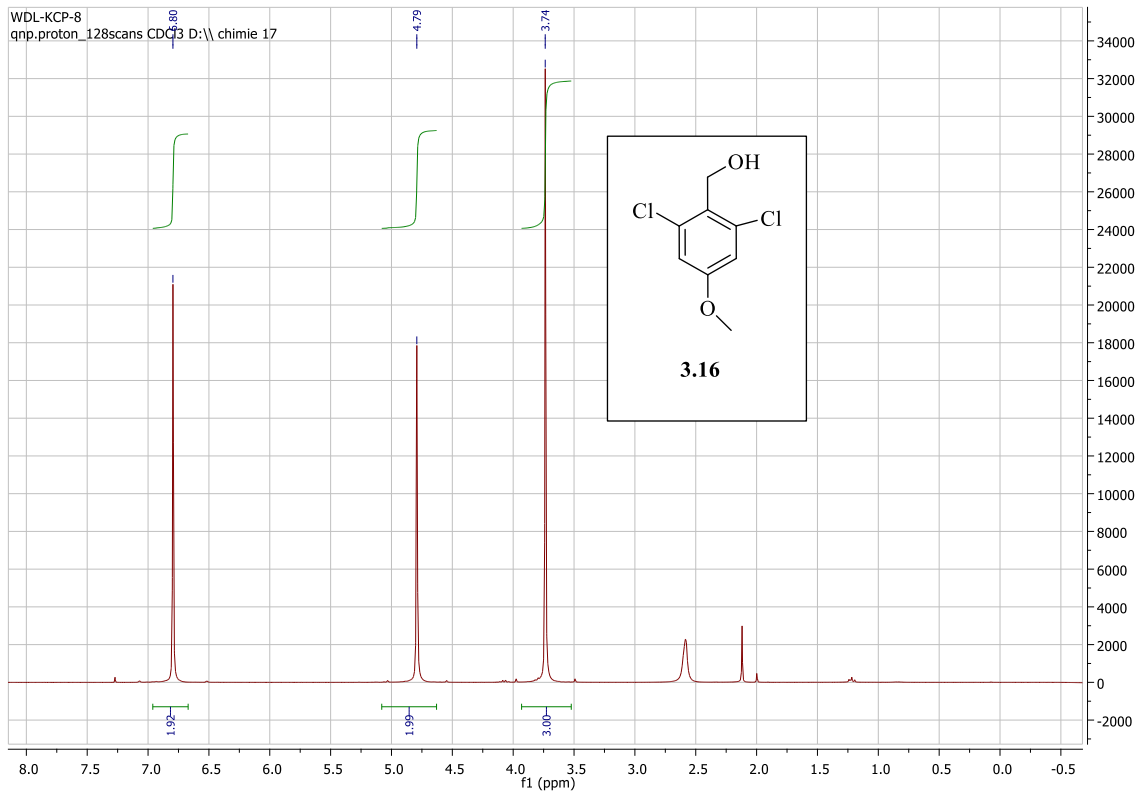
II. Spectres RMN

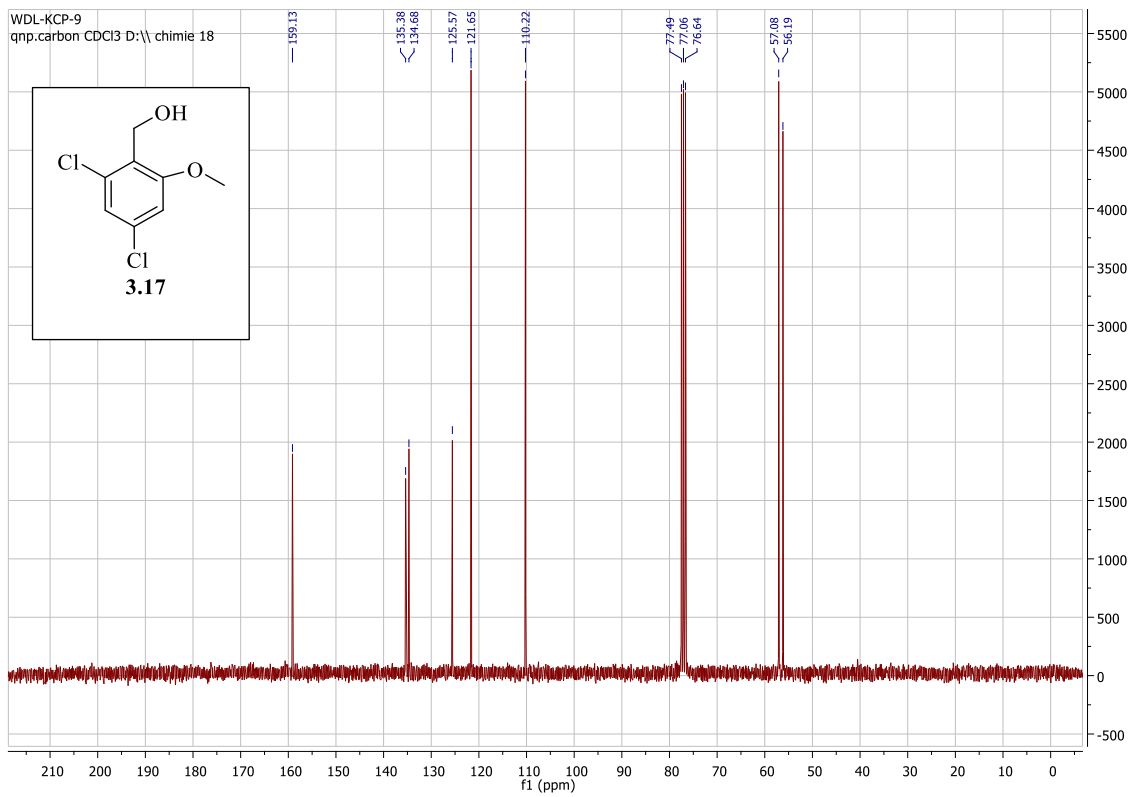
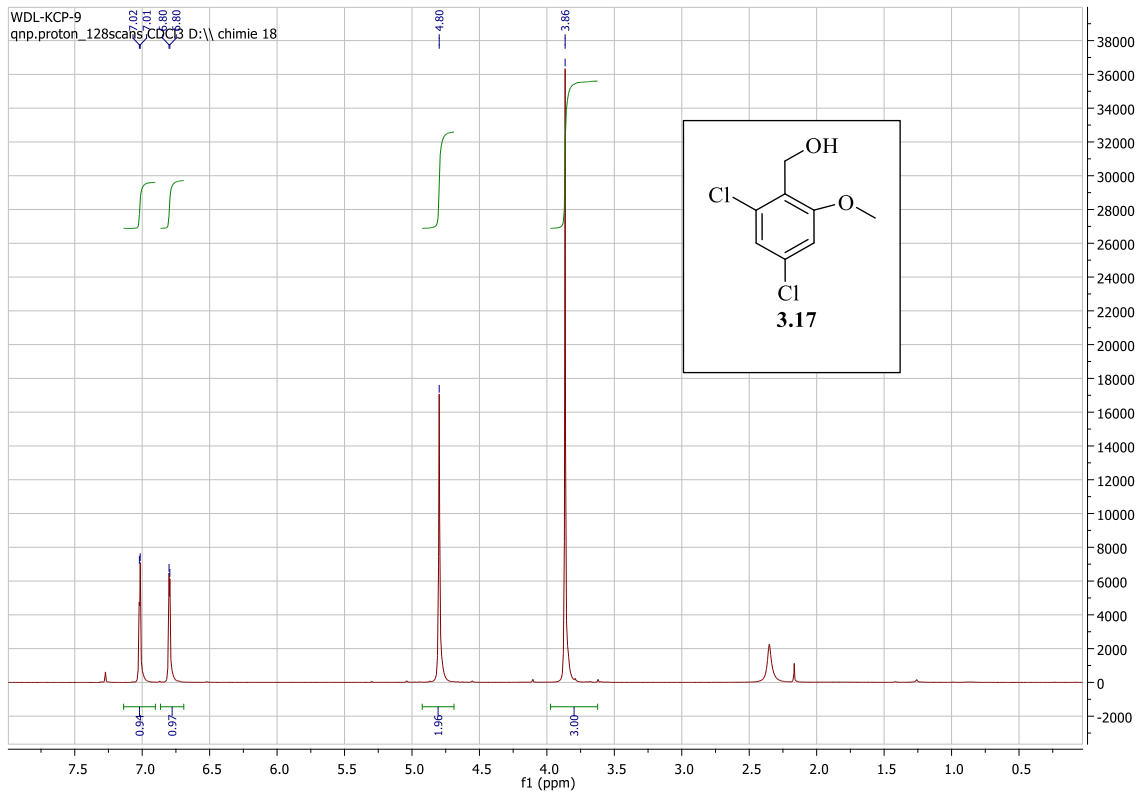


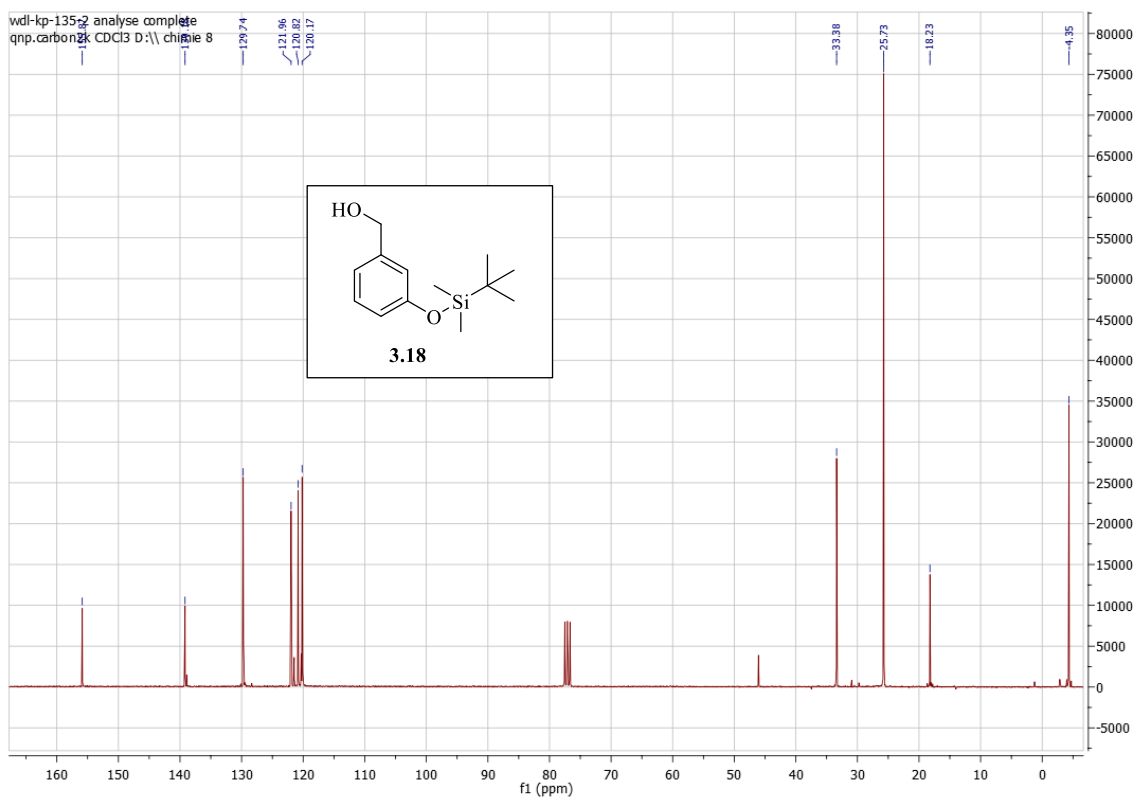
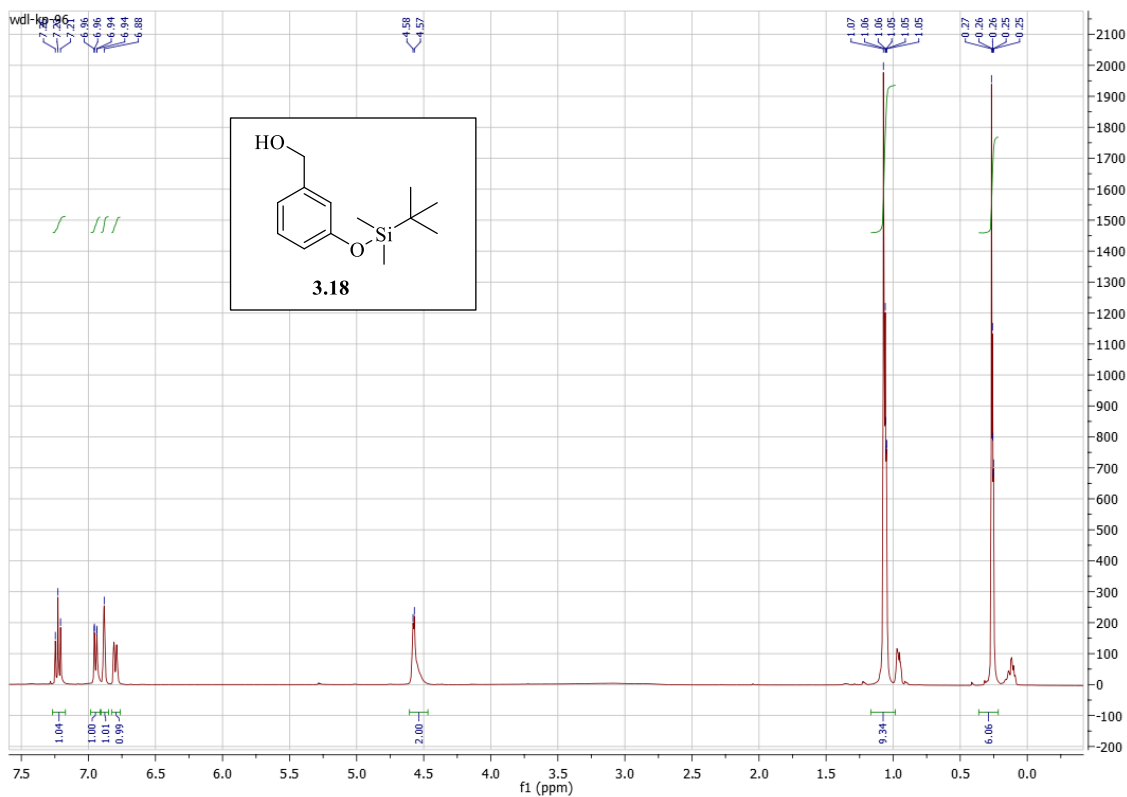


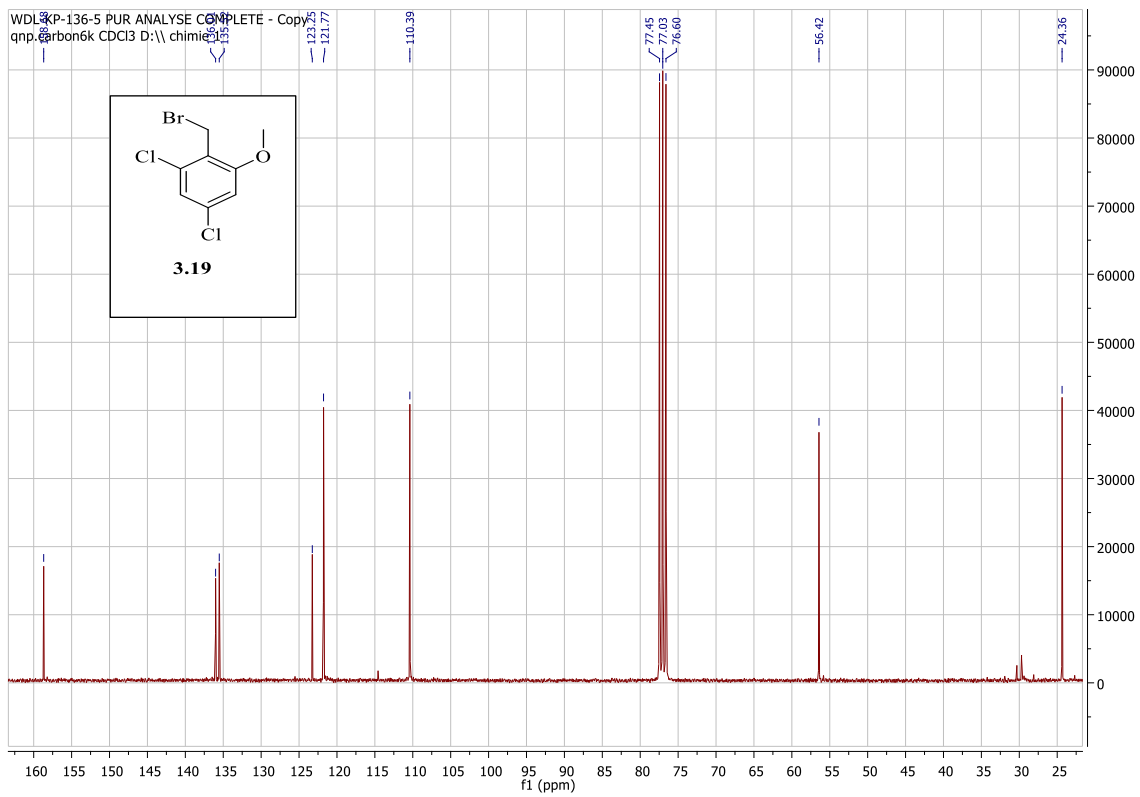
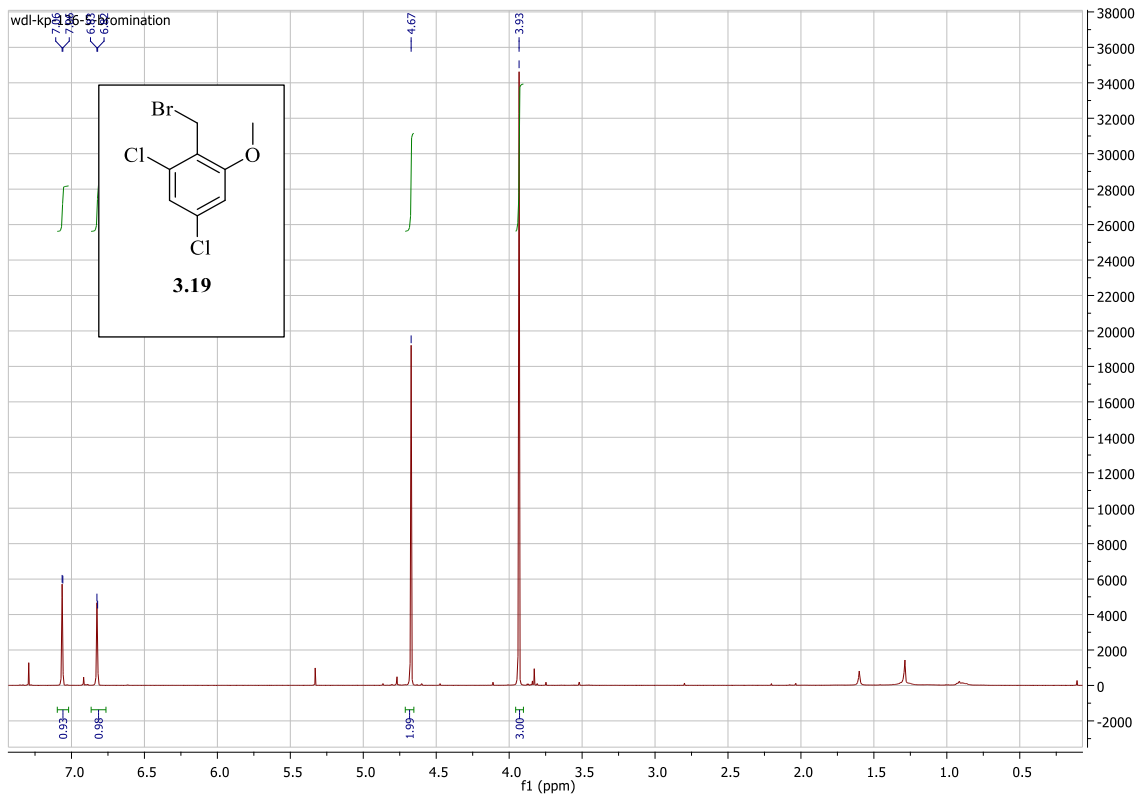


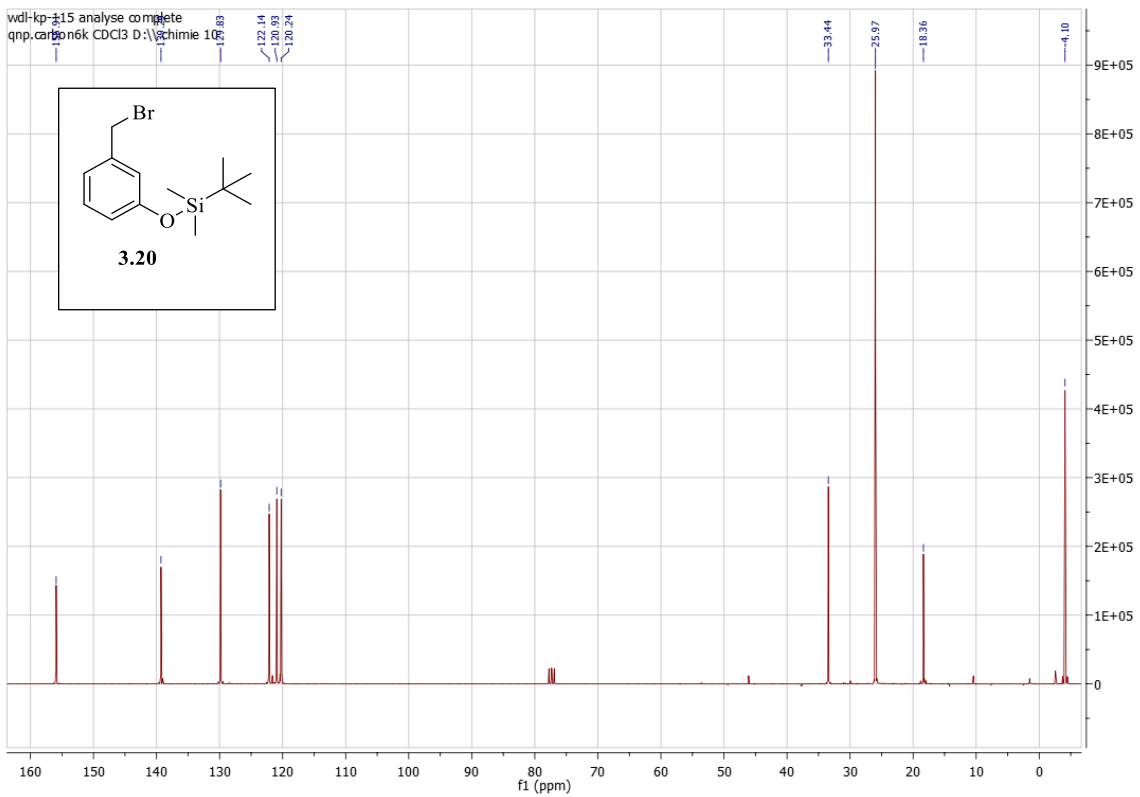
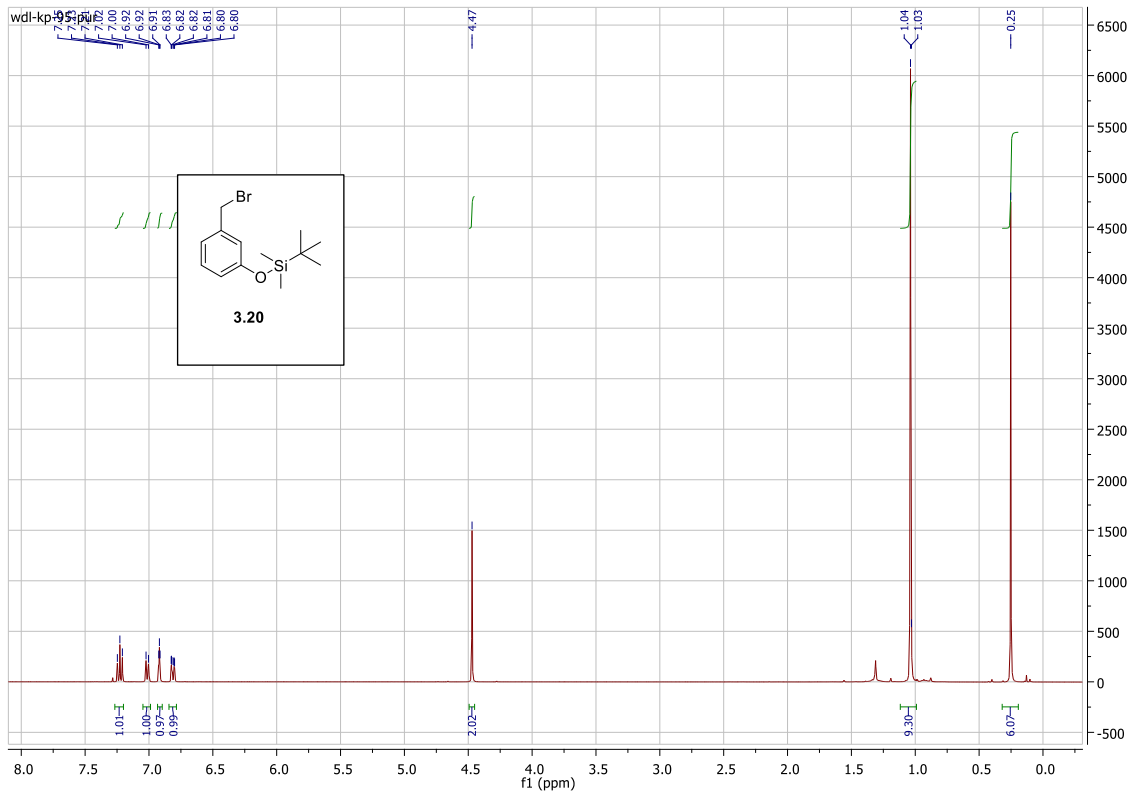


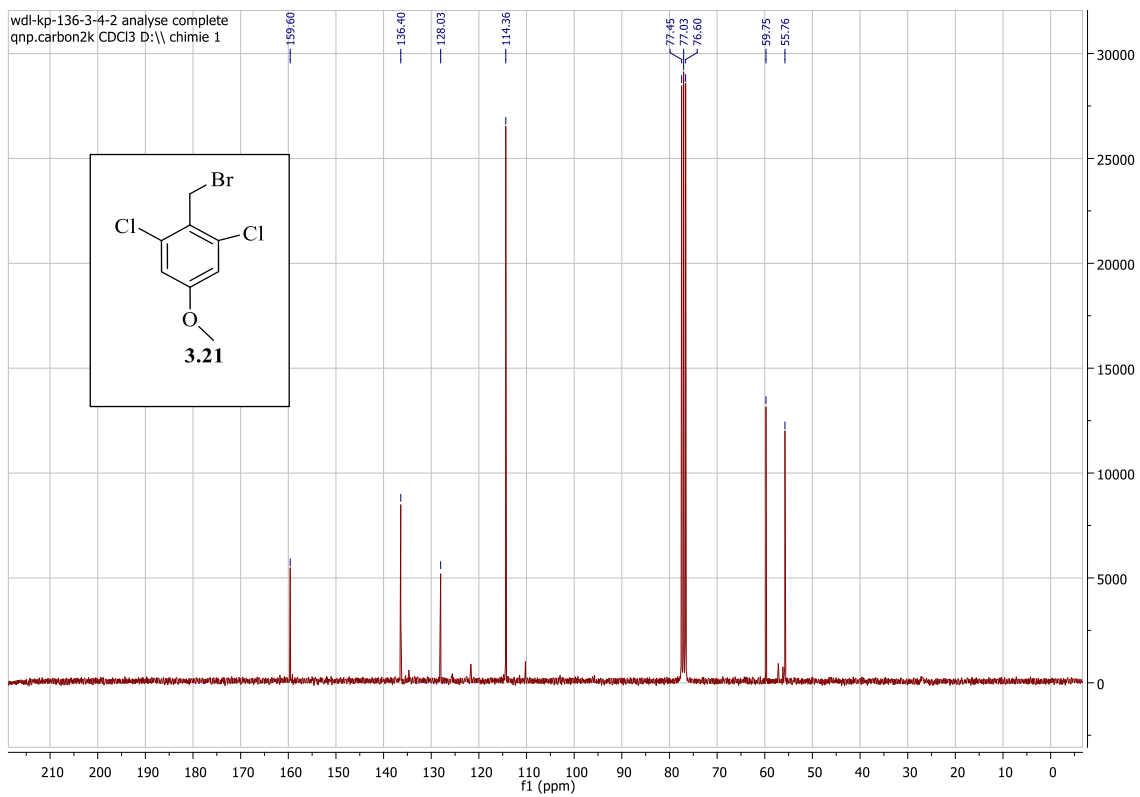
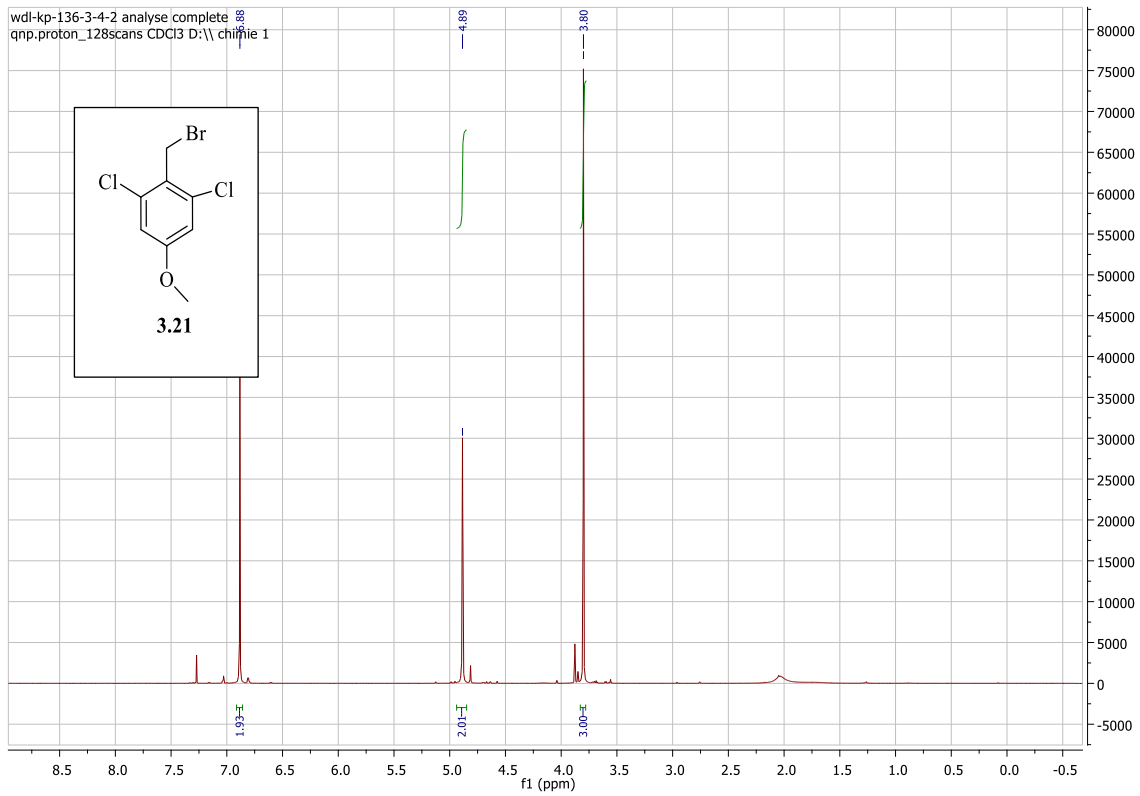


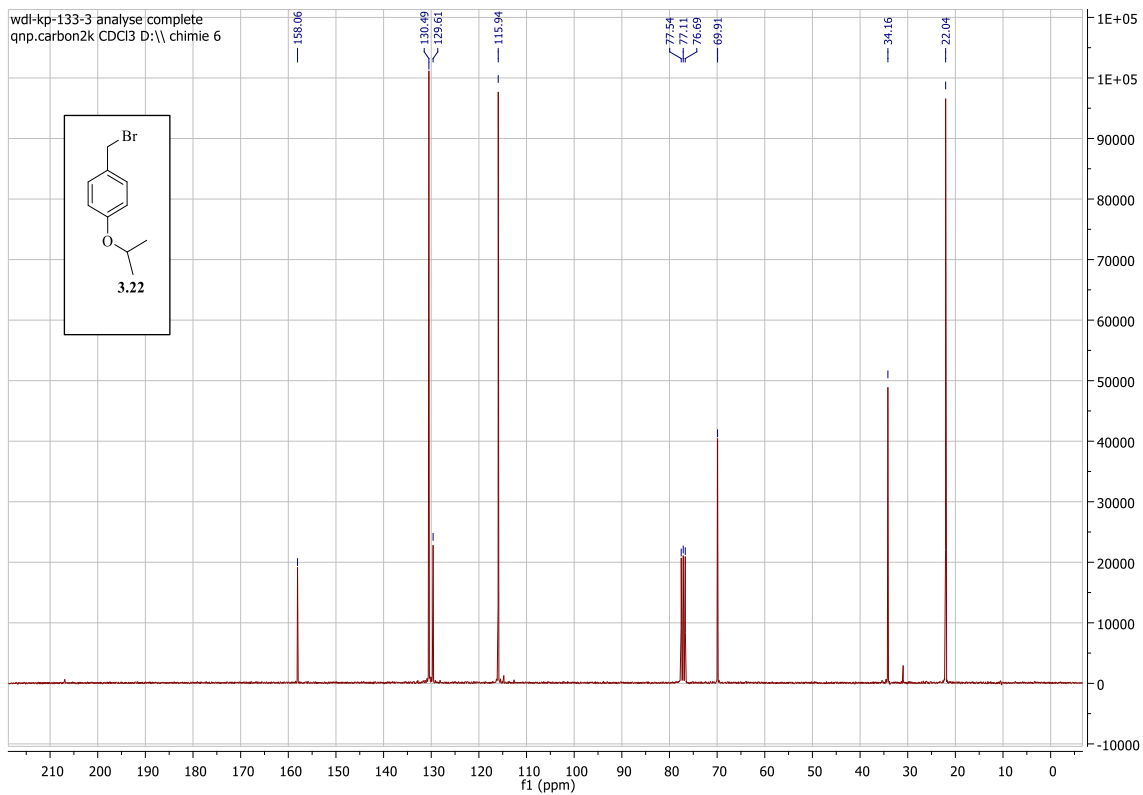
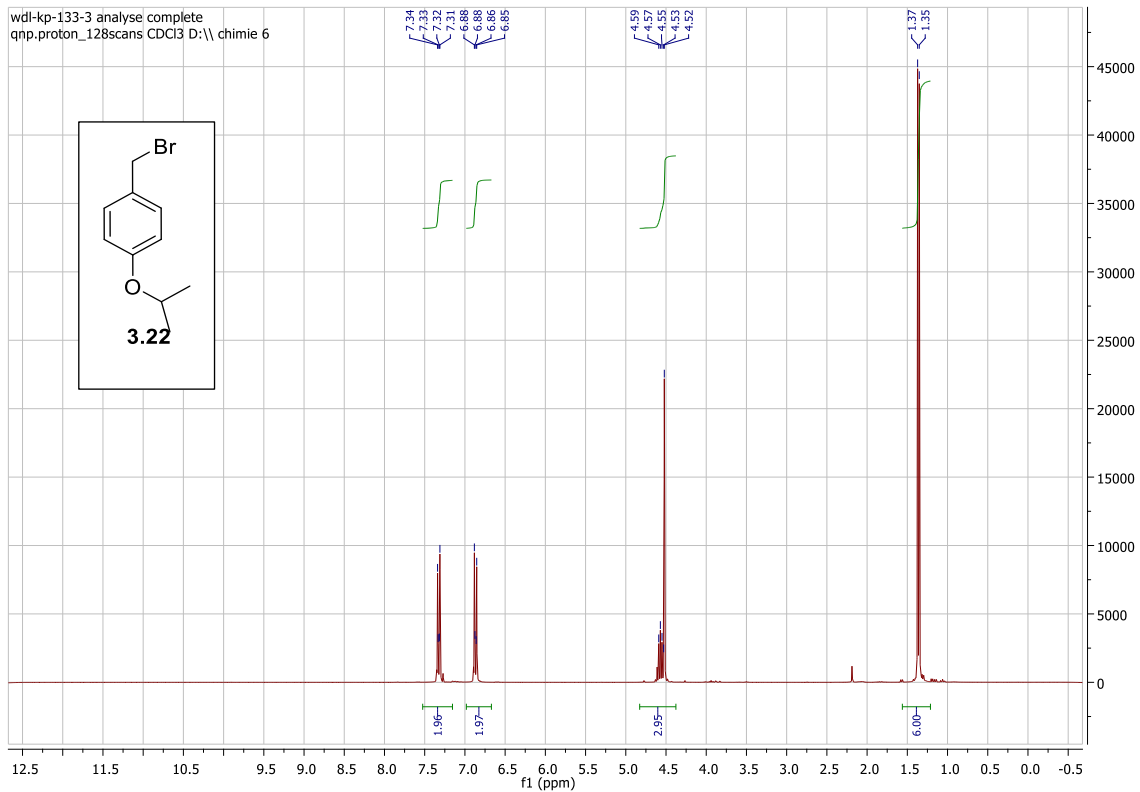


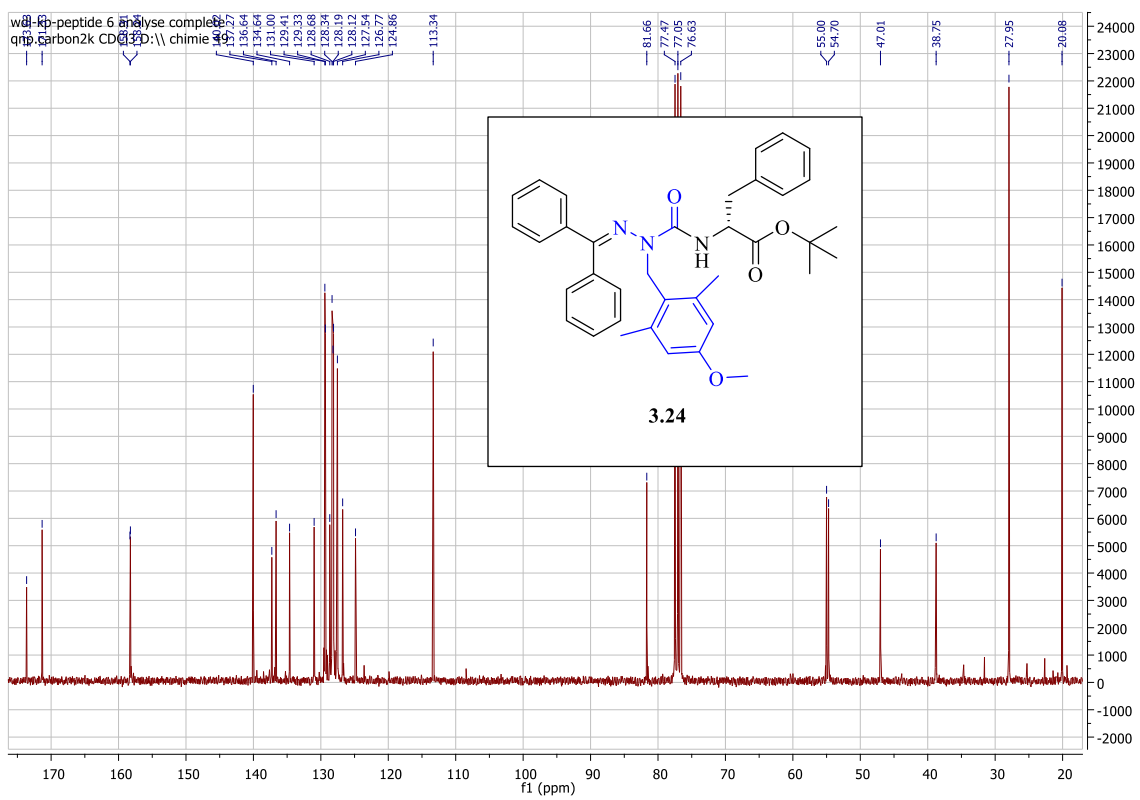
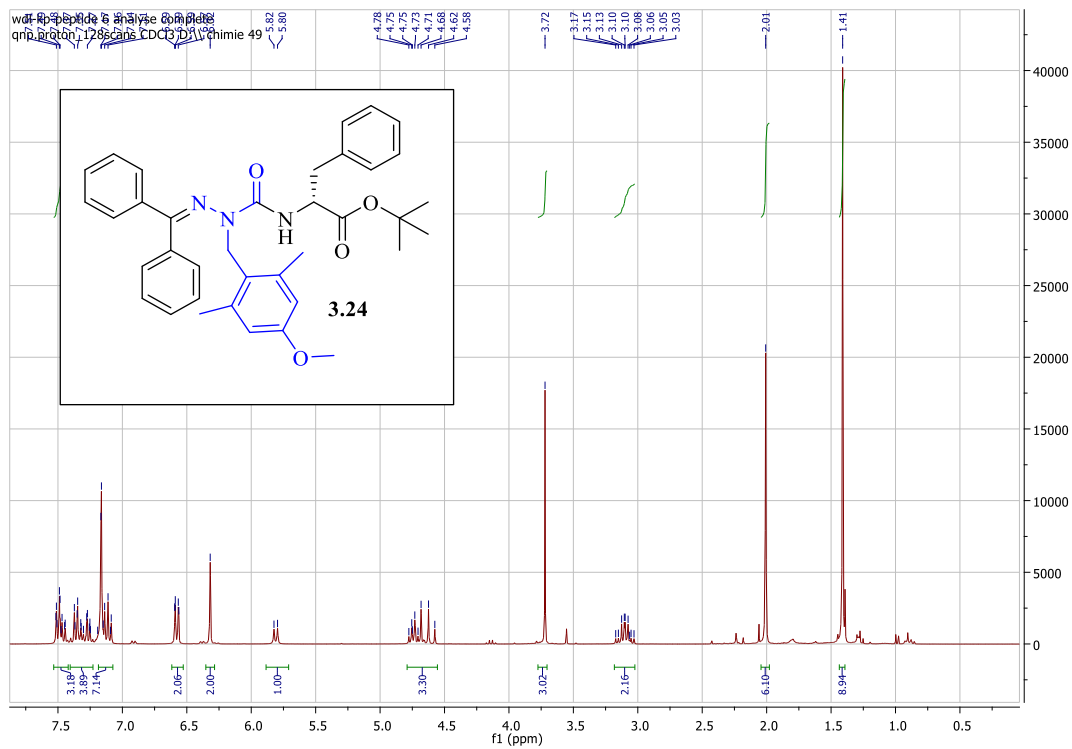




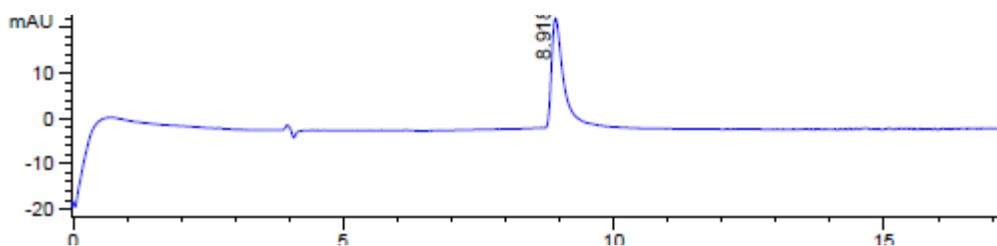
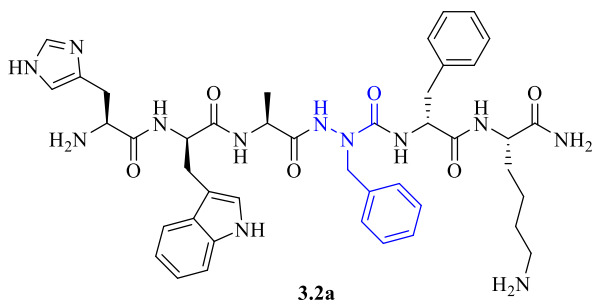




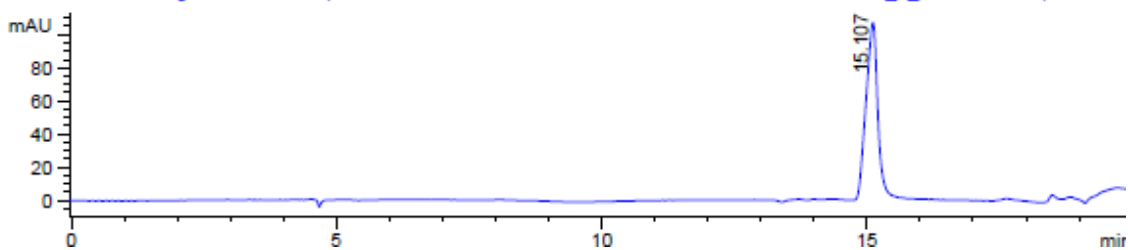




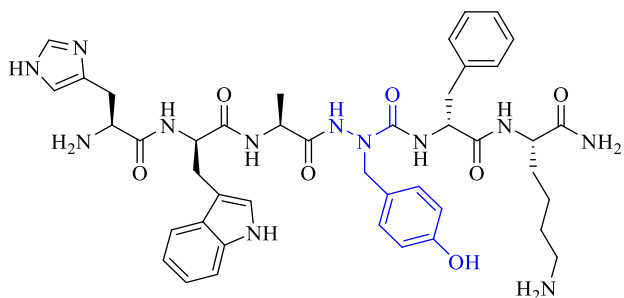
III. Spectres LC-MS



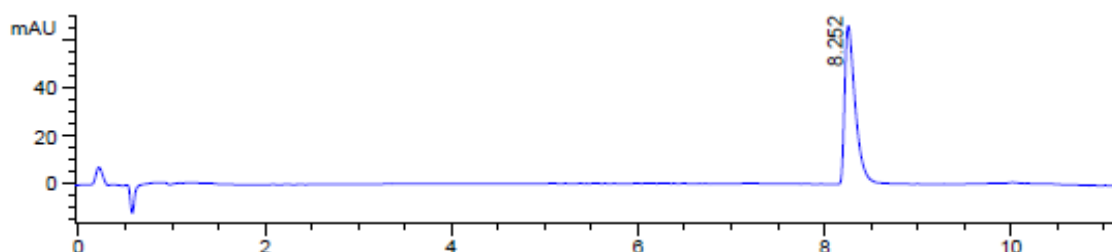
(3.2a) LCMS chromatogram [20-50% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min]; RT = 8.9 on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



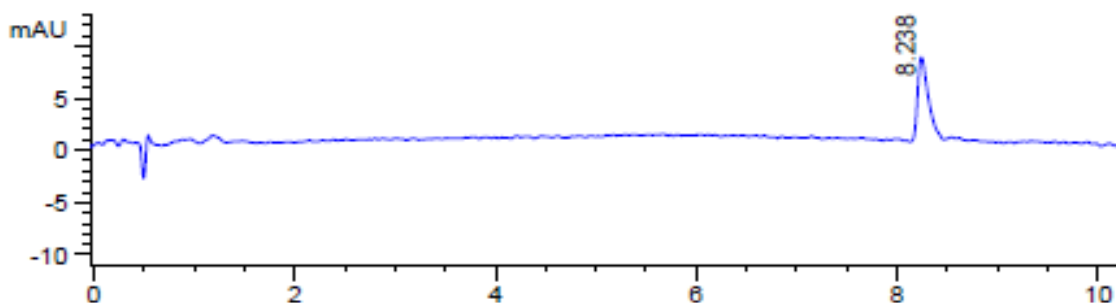
(3.2a) LCMS chromatogram [15-30% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 15.1 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



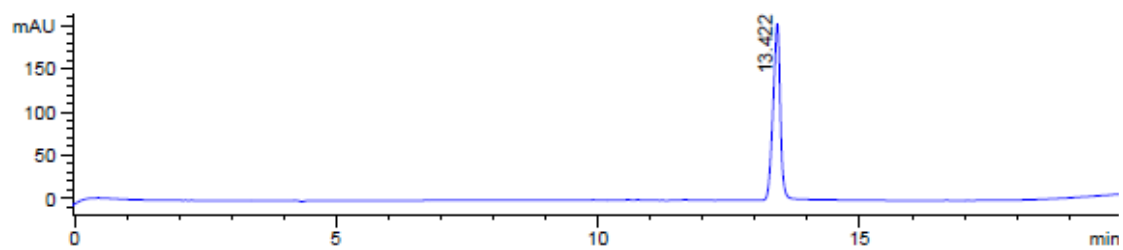
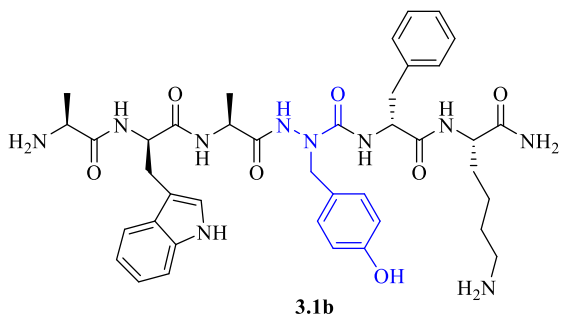
3.2b



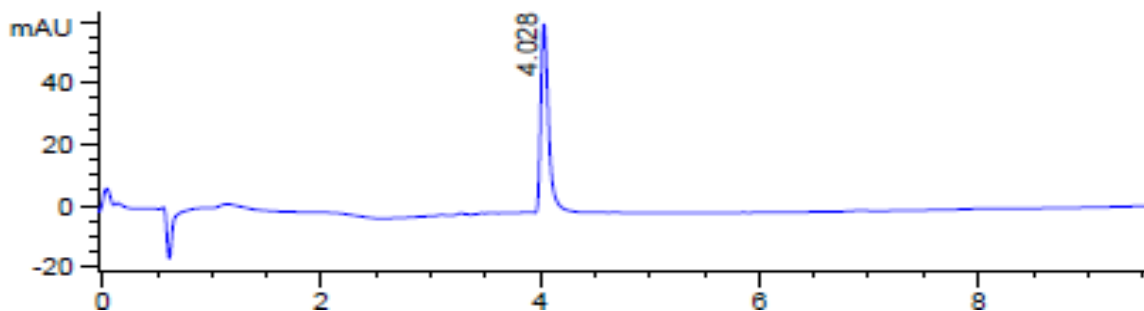
(3.2b) LCMS chromatogram [10-40% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 8.2 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μ m, 4.6 mm X 100 mm).



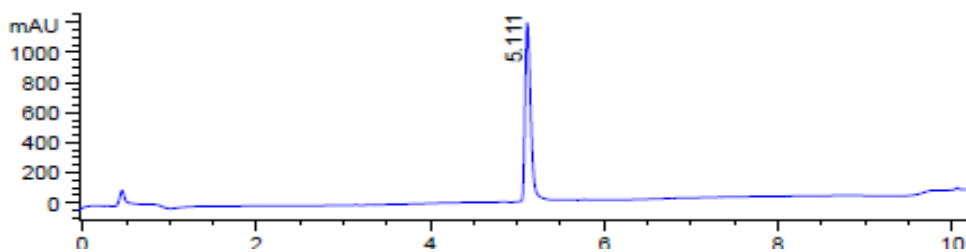
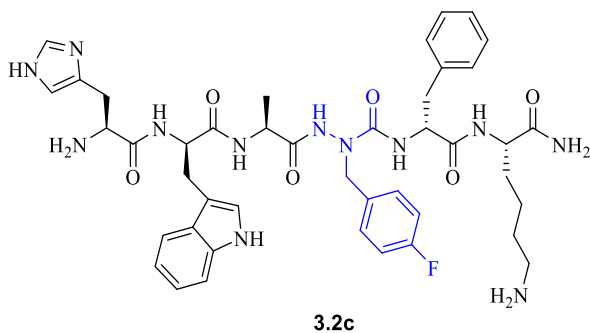
(3.2b) LCMS chromatogram [10-50% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 8.2 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μ m, 4.6 mm X 100 mm).



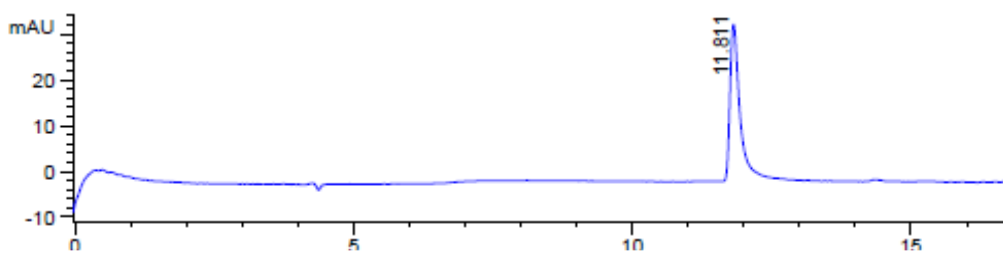
(3.1b) LCMS chromatogram [10-50% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 13.4 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm)



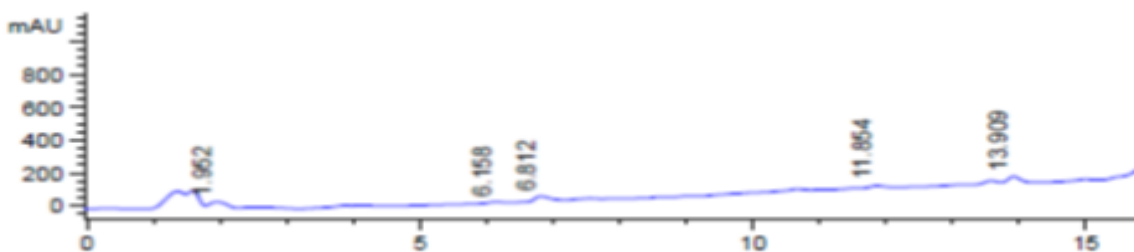
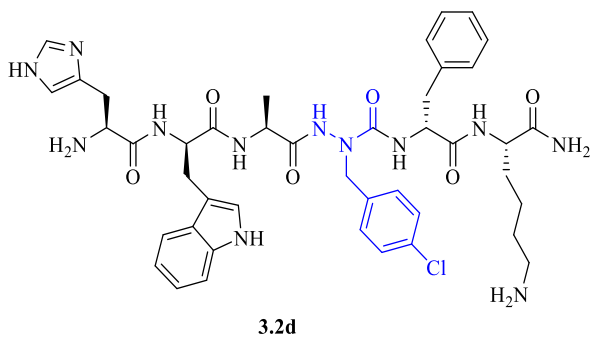
(3.1b) LCMS chromatogram [10-50% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 4.0 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm)



(3.2c) LCMS chromatogram [5-50% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 5.1 min) on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 µm, 4.6 mm X 100 mm).

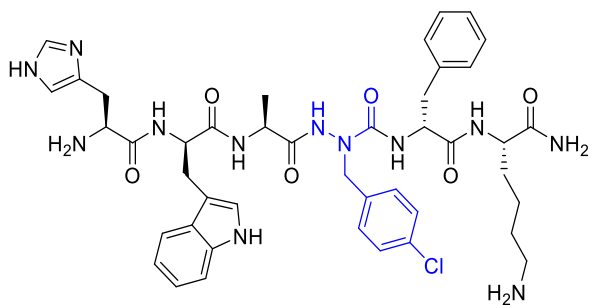


(3.2c) LCMS chromatogram [10-50% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 11.8 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 µm, 4.6 mm X 100 mm).

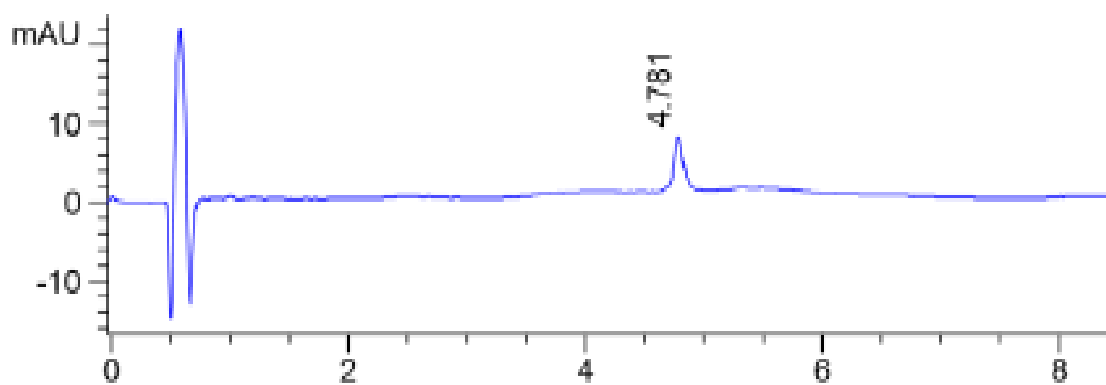


(3.2d) LCMS chromatogram [30-60% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 6.8 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

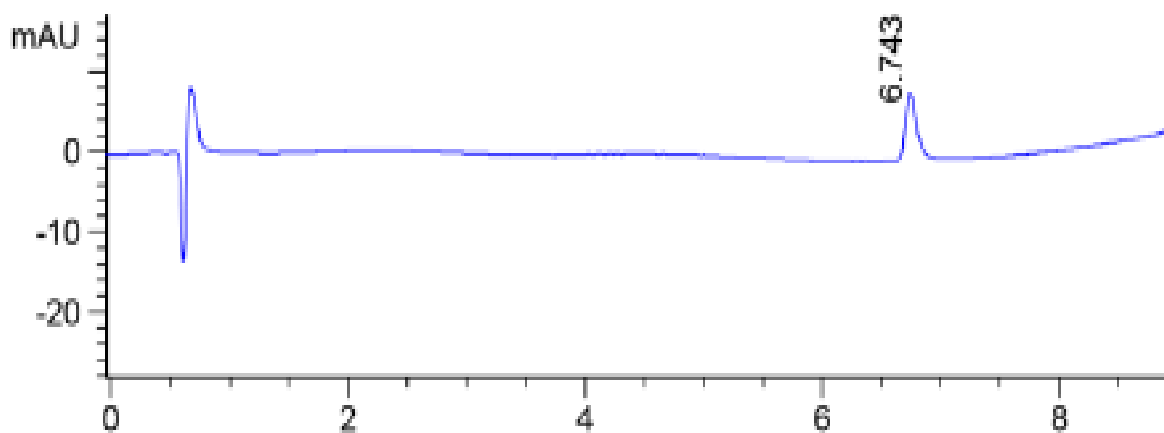
Ret. Time	Height	Area	Area %
1.583	83.198	2603.015	57.474
1.952	39.794	766.218	16.918
6.158	8.207	76.285	1.684
6.812	29.062	413.221	9.124
11.854	11.719	126.108	2.784



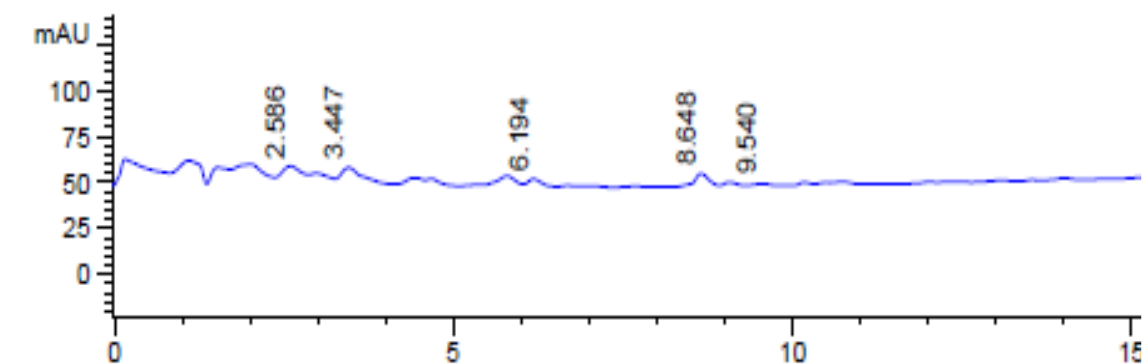
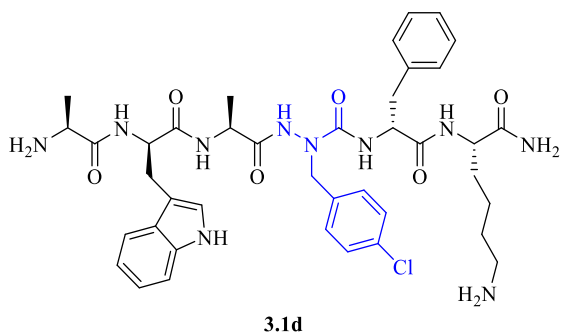
3.2d



(3.2d) LCMS chromatogram [10-80% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT = 4.8 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

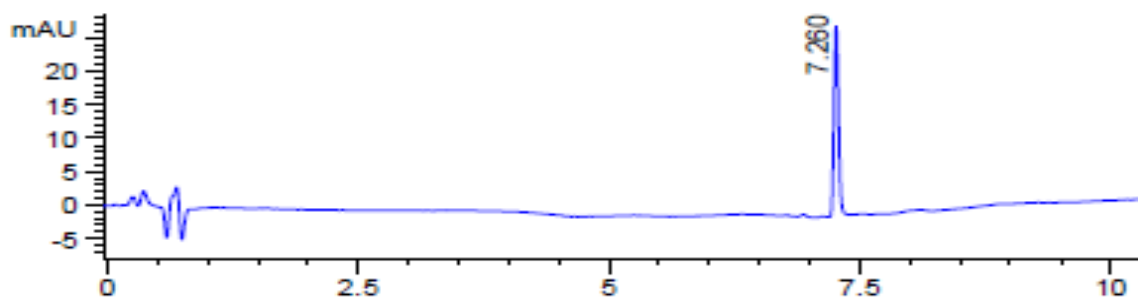
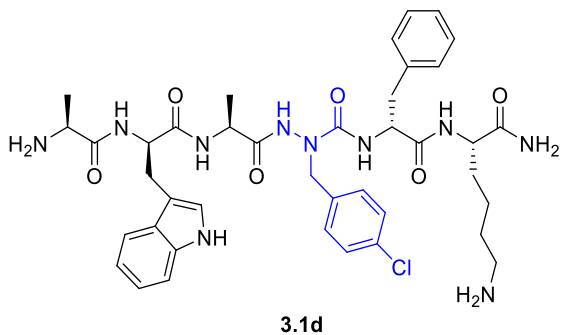


(3.2d) LCMS chromatogram [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 6.7 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

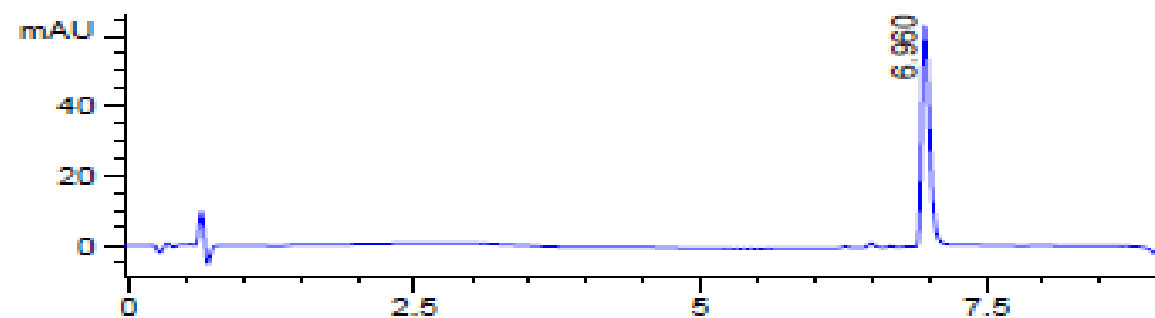


(3.1d) LCMS chromatogram [30-60% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 8.6 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

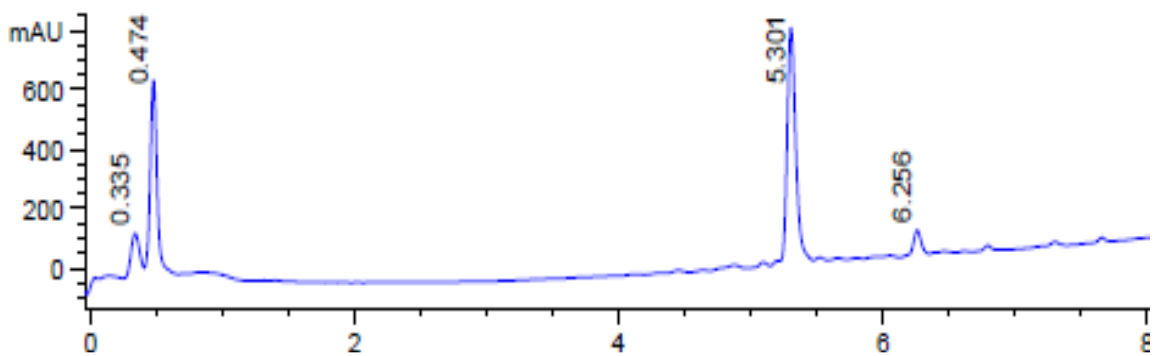
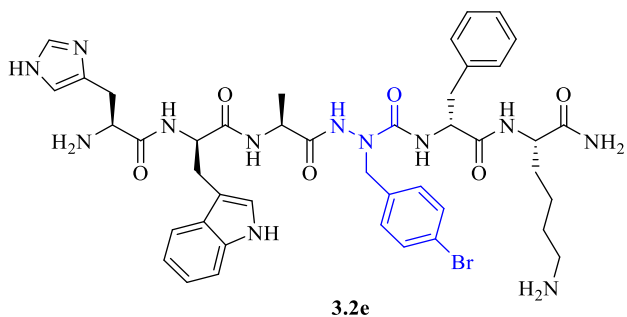
Ret. Time	Height	Area	Area %
2.599	95.735	1812.256	17.816
3.447	95.369	2233.830	21.961
6.168	84.865	1579.281	15.526
8.649	123.540	1991.734	19.581
9.556	42.424	540.583	5.314



(3.1d) LCMS chromatogram [25-50% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 7.3 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

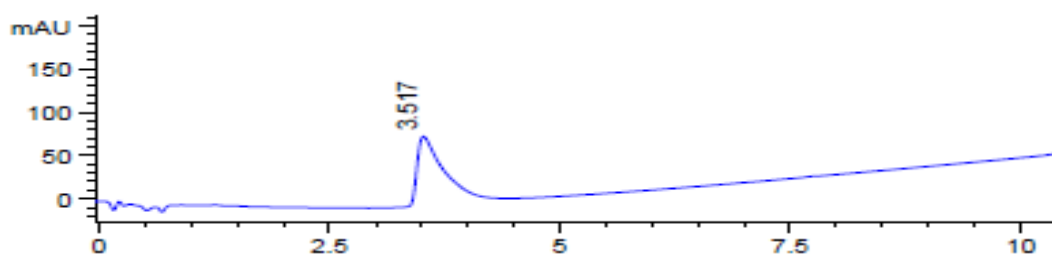
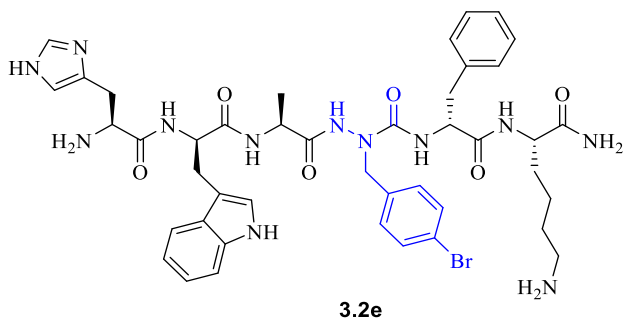


(3.1d) LCMS chromatogram [25-45% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 7.0 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

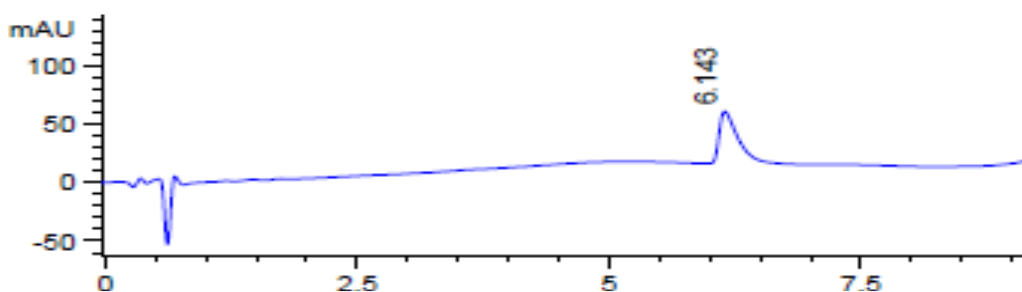


(3.2e) LCMS chromatogram [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 10 min] RT 5.3 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 µm, 4.6 mm X 100 mm).

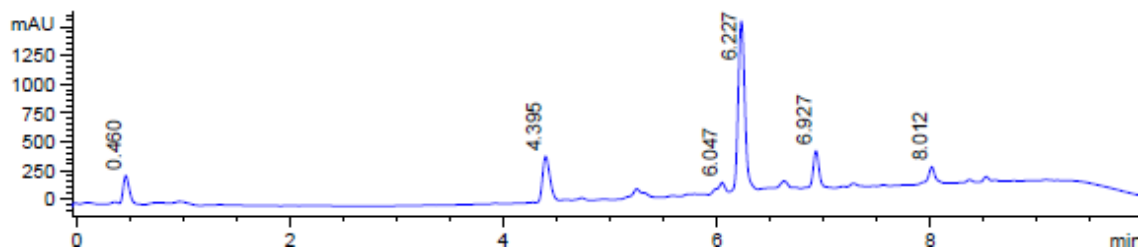
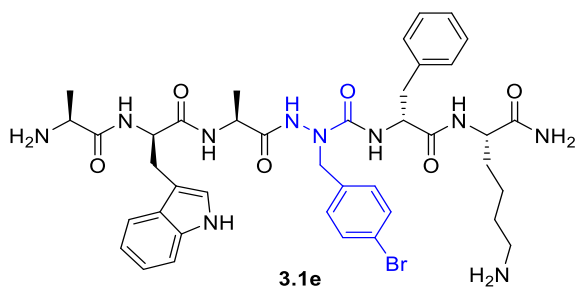
Ret. Time	Height	Area	Area %
0.335	131.306	494.665	7.357
0.474	650.138	2274.060	33.823
5.301	782.319	3318.455	49.357
6.256	114.451	636.238	9.463



(3.2e) LCMS chromatogram [25-50% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 3.5 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 µm, 4.6 mm X 100 mm).

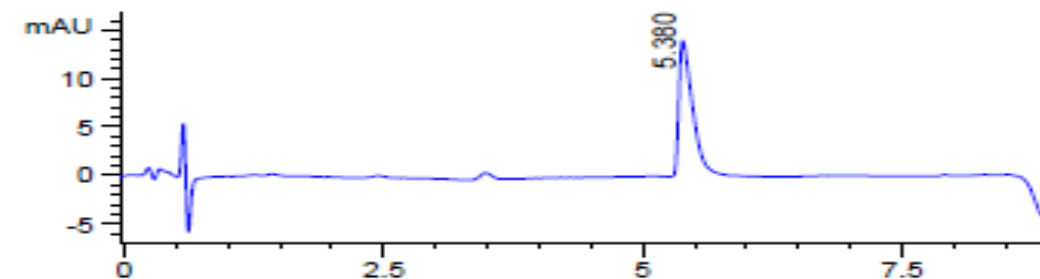
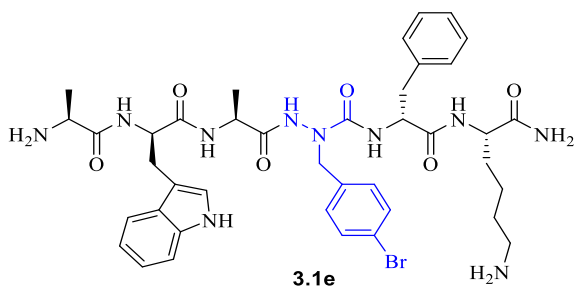


(3.2e) LCMS chromatogram [25-35% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT = 6.1 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 µm, 4.6 mm X 100 mm).

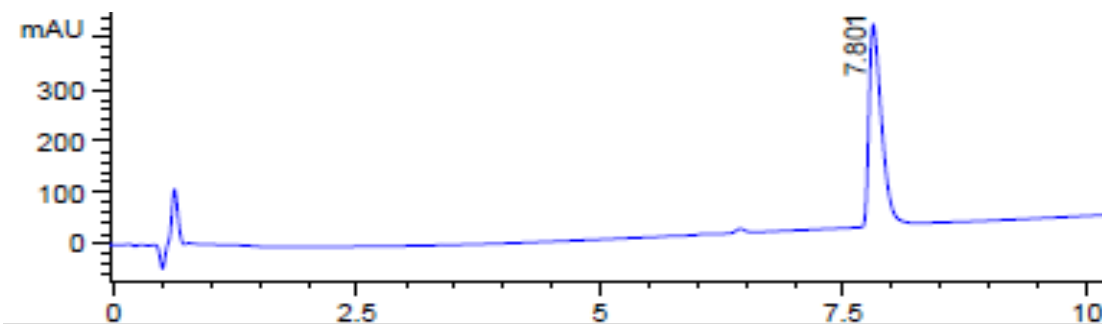


(3.1e) LCMS chromatogram [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 10 min] RT 6.2 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

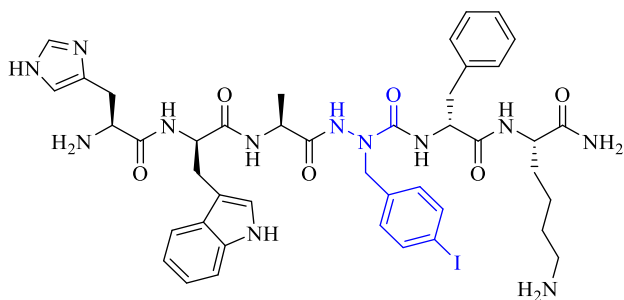
Ret. Time	Height	Area	Area %
0.460	256.247	1105.416	8.855
4.395	416.265	2738.099	21.934
6.047	113.822	635.010	5.087
6.227	1474.195	6128.975	49.098
6.927	269.571	793.343	6.355



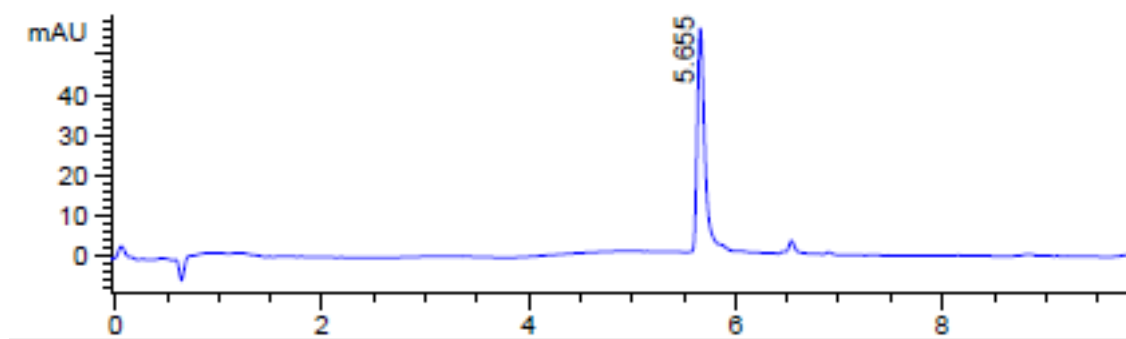
(3.1e) LCMS chromatogram [20-40% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 5.4 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



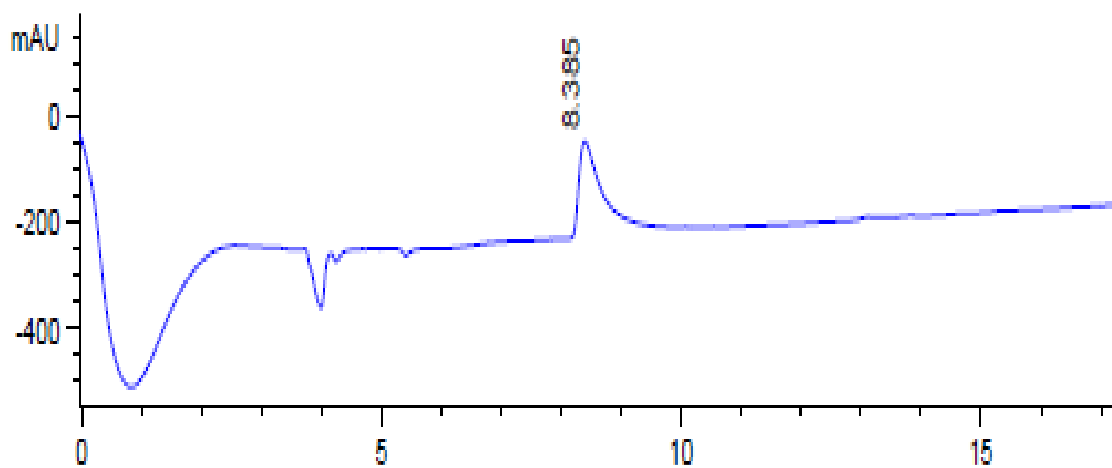
(3.1e) LCMS chromatogram [25-50% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 7.8 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



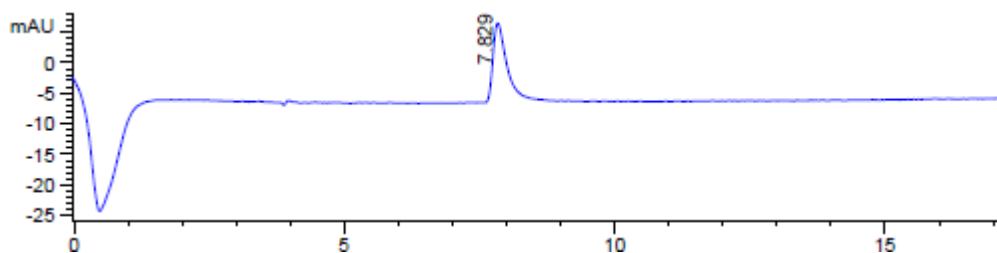
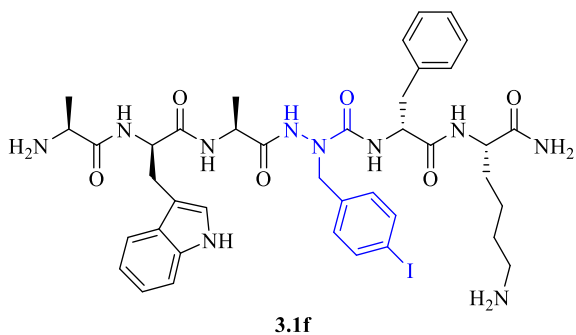
3.2f



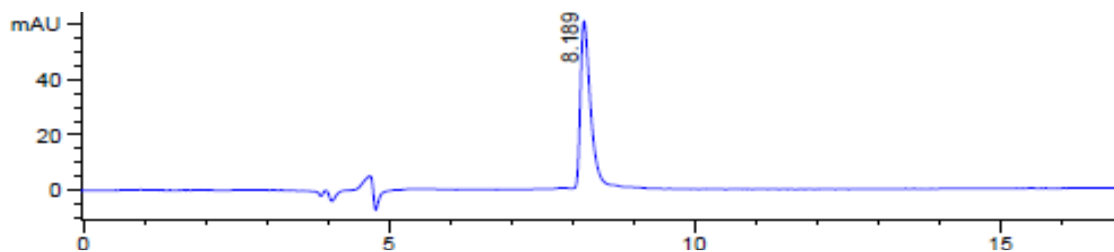
(3.2f) LCMS chromatogram [10-50% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 16 min] RT 5.7 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



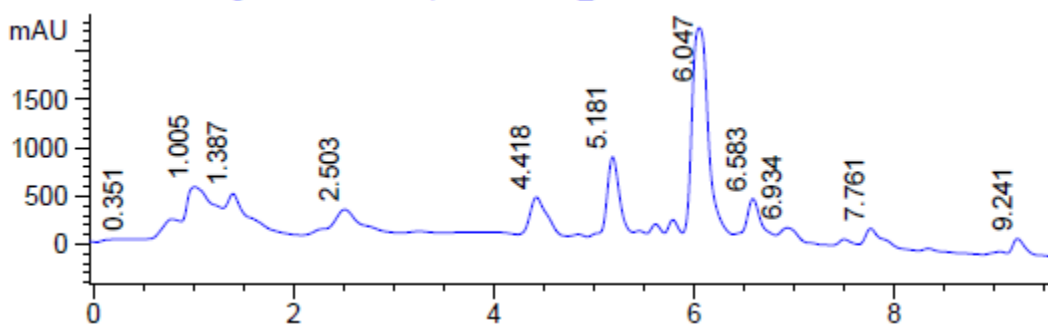
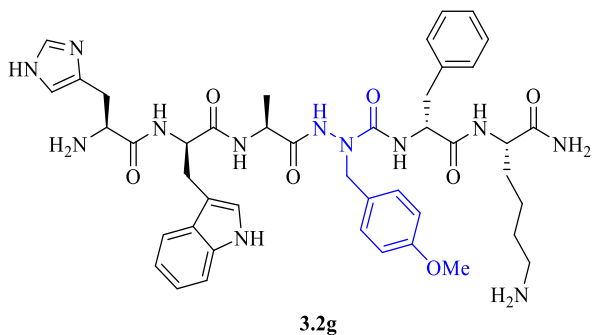
(3.2f) LCMS chromatogram [30-50% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 8.4 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



(3.1f) LCMS chromatogram [20-60% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 7.8 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

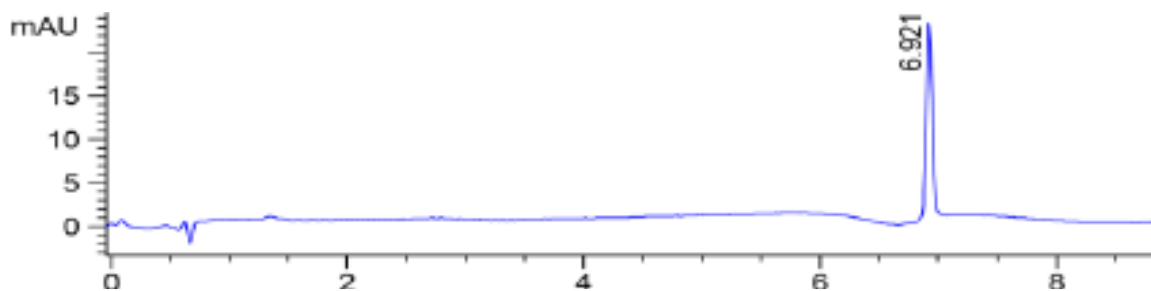
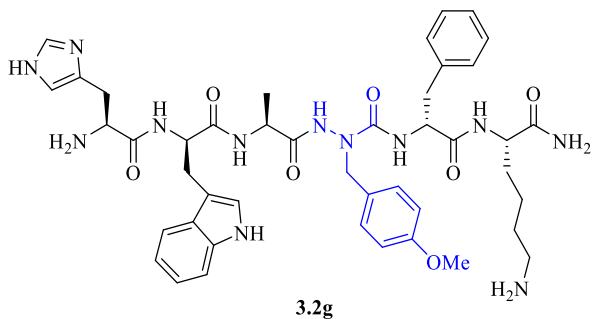


(3.1f) LCMS chromatogram [25-40% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 8.2 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

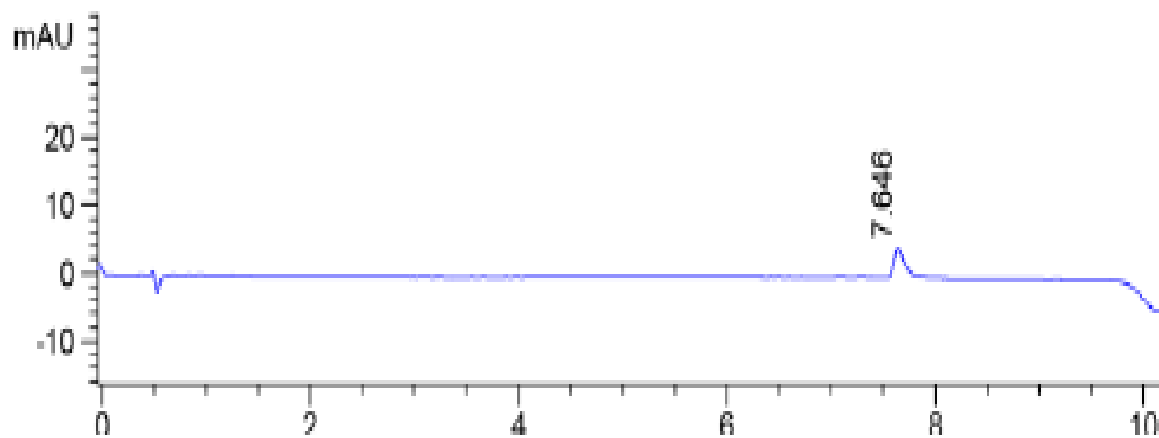


(3.2g) LCMS chromatogram [20-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 5.0 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 µm, 4.6 mm X 100 mm).

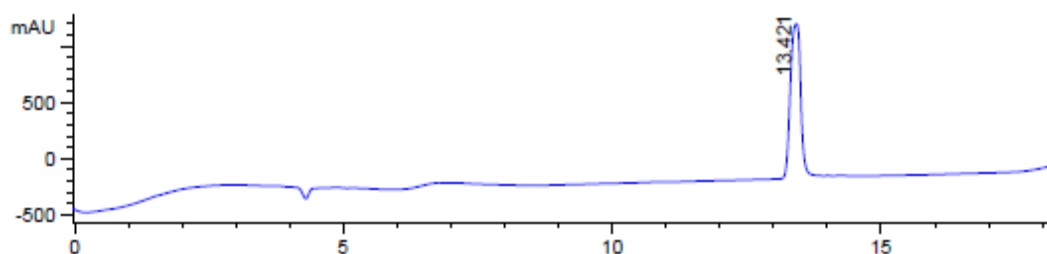
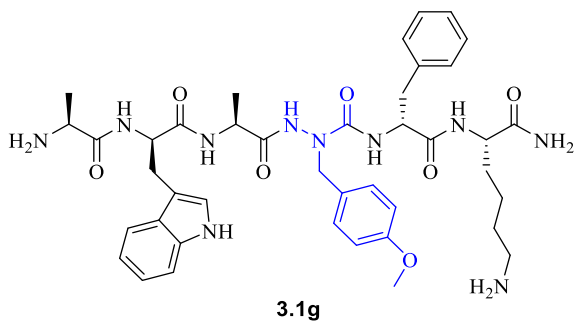
Ret. Time	Height	Area	Area %
0.351	38.542	610.812	1.319
1.005	245.034	2389.290	5.158
1.387	182.488	1205.772	2.603
2.503	228.701	3283.526	7.088
4.418	429.713	5812.138	12.547
5.181	779.939	6213.626	13.413
6.047	2036.986	20889.586	45.095
6.583	337.630	2365.973	5.107
6.934	28.567	138.734	0.299
7.761	112.143	694.234	1.499
9.241	191.507	2720.073	5.872



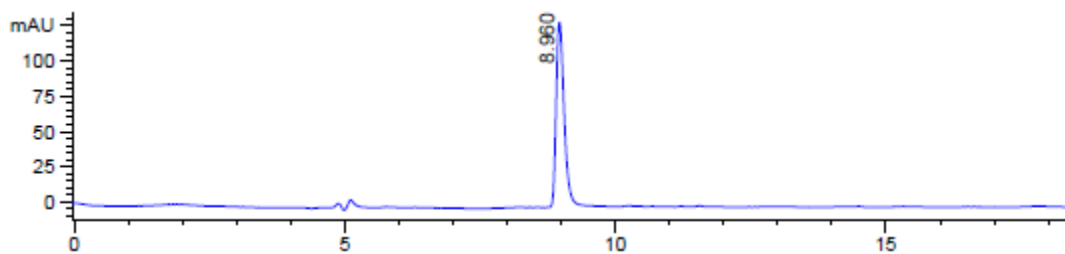
(3.2g) LCMS chromatogram [10-35% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 6.9 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



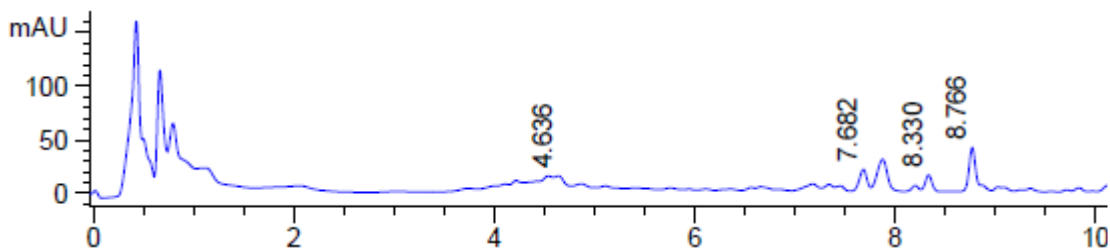
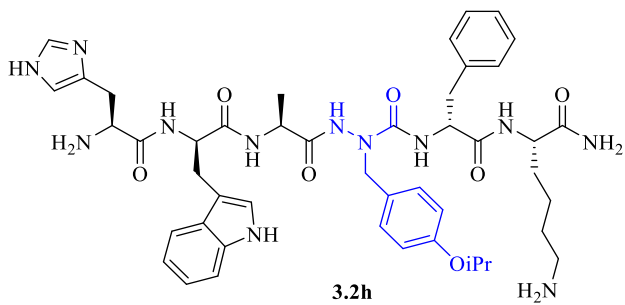
(3.2g) LCMS chromatogram [25-45% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 7.6 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



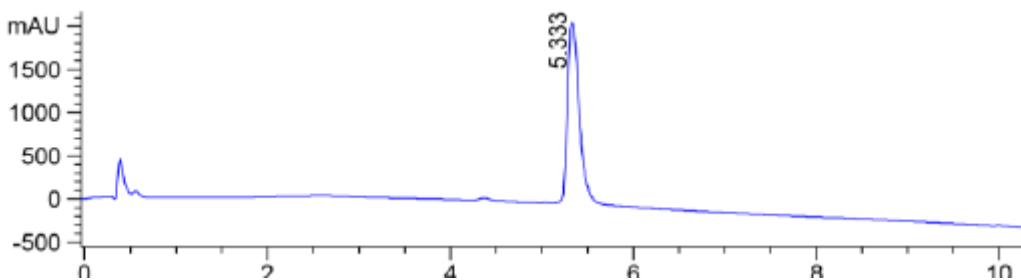
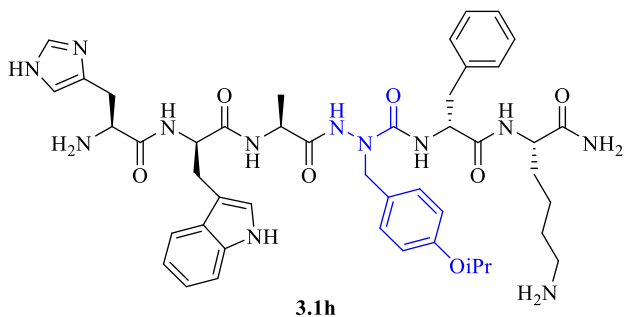
(3.1g) LCMS chromatogram [10-50% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 13.4 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



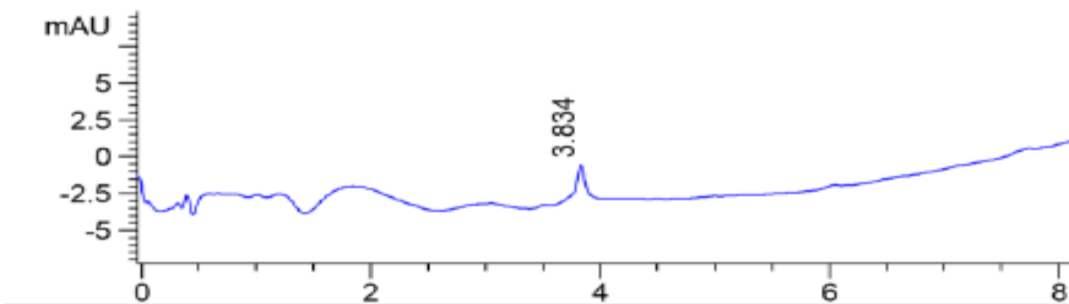
(3.1g) LCMS chromatogram [20-40% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 9.0 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



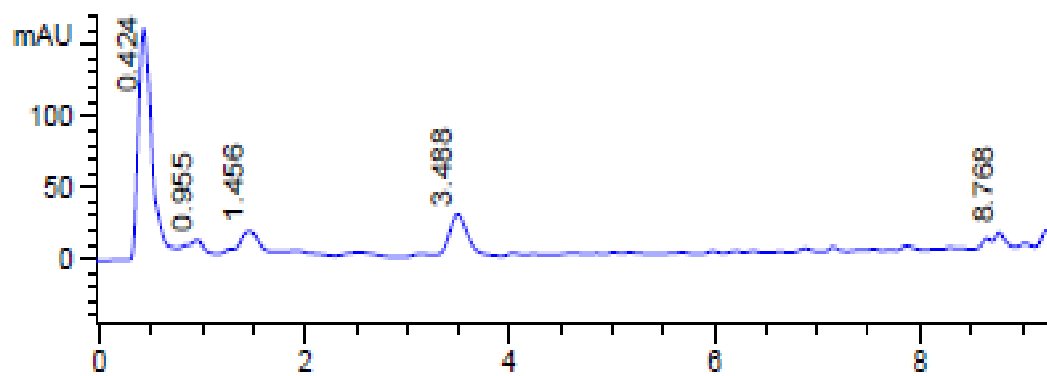
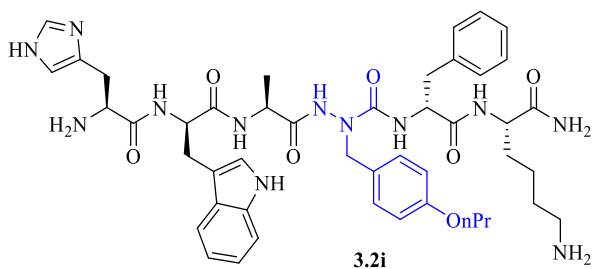
(3.1h) LCMS chromatogram [20-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 4.6 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



(3.1h) LCMS chromatogram [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 5.3 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

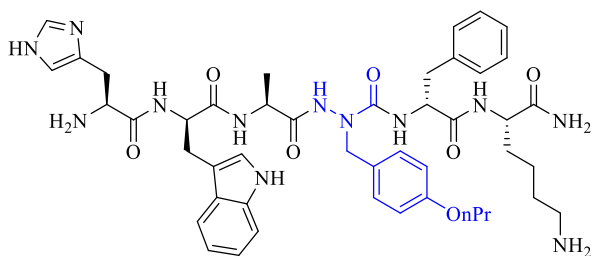


(3.1h) LCMS chromatogram [10-80% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 3.8 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

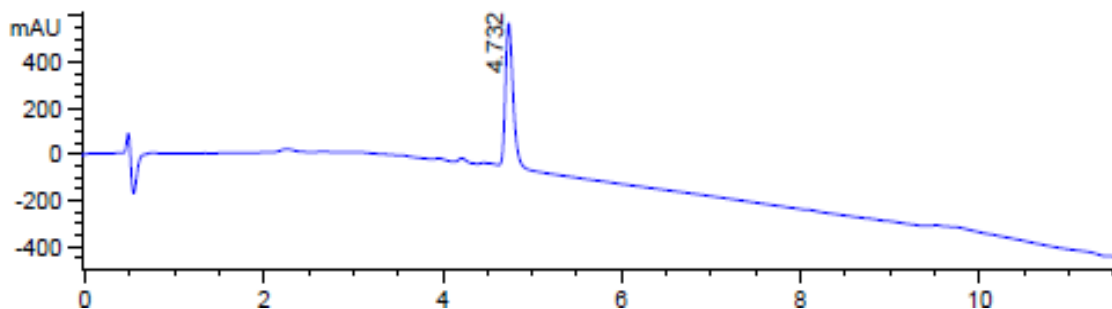


(3.2i) LCMS chromatogram [20-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 3.5 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

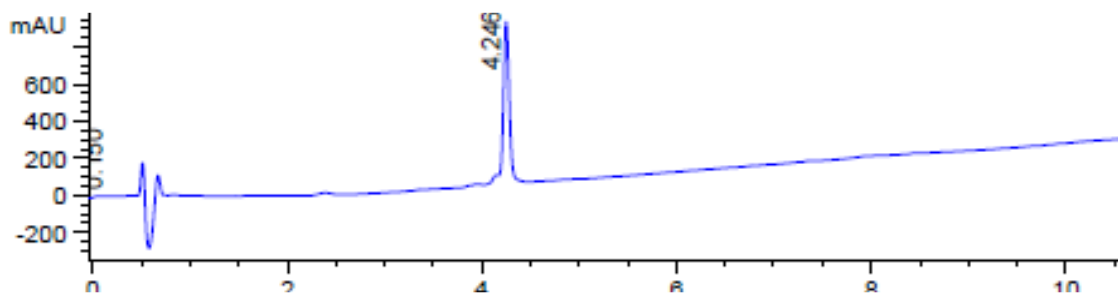
Ret. Time	Height	Area	Area %
0.424	161.222	1460.991	56.300
0.955	11.878	126.568	4.877
1.456	21.280	279.184	10.759
3.488	31.257	432.125	16.652
8.768	20.494	296.139	11.412



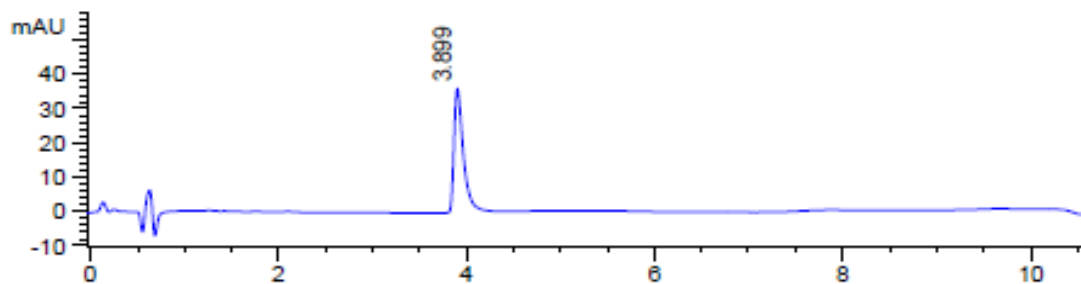
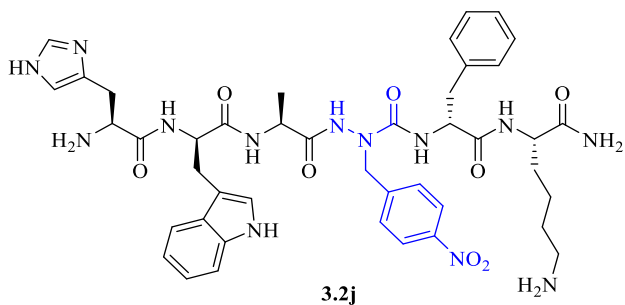
3.2i



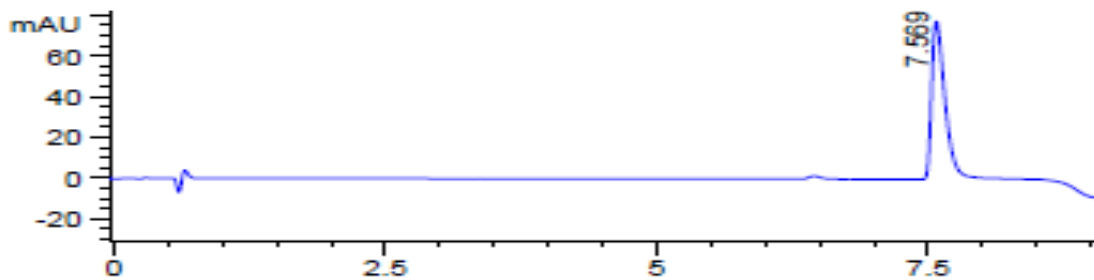
(3.2i) LCMS chromatogram [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 4.7 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



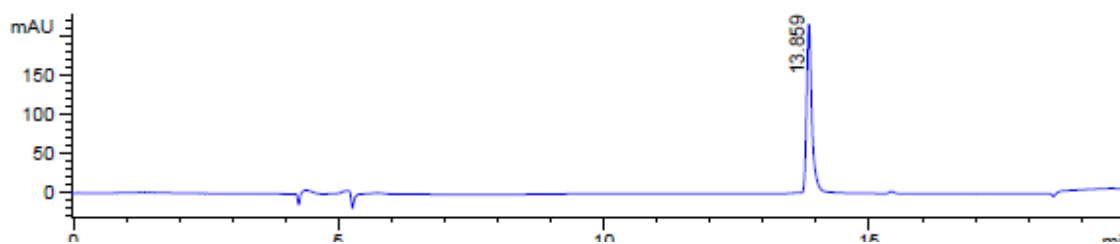
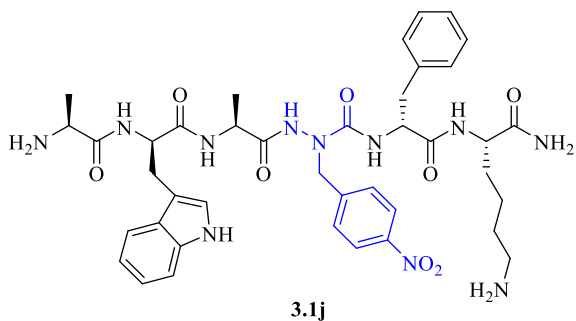
(3.2i) LCMS chromatogram [5-80% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 4.2 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



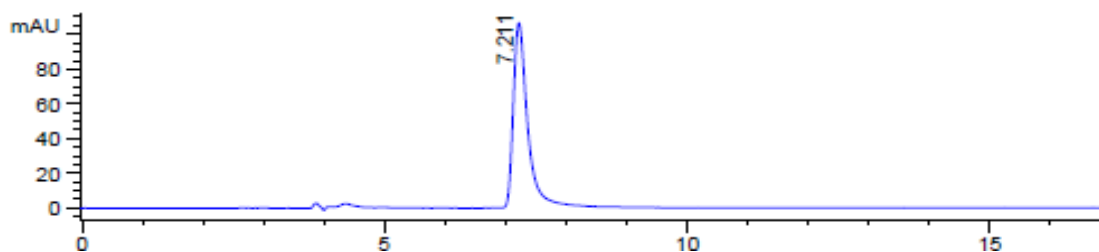
(3.2j) LCMS chromatogram [10-40% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 3.9 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



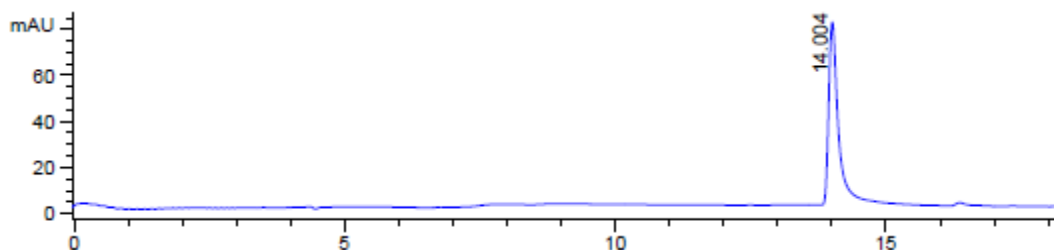
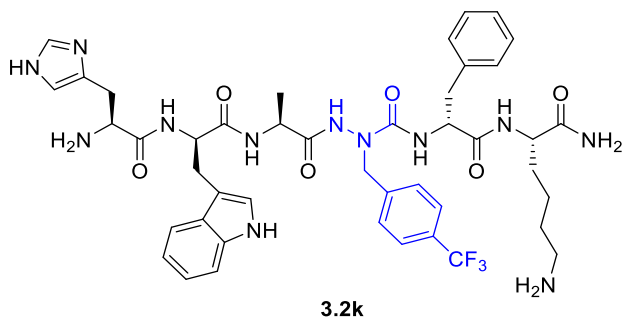
(3.2j) LCMS chromatogram [10-30% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 7.6 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



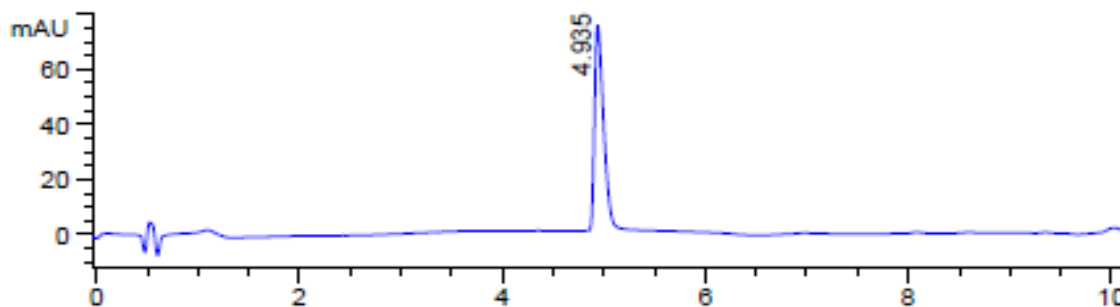
(3.1j) LCMS chromatogram [20-30% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 13.9 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



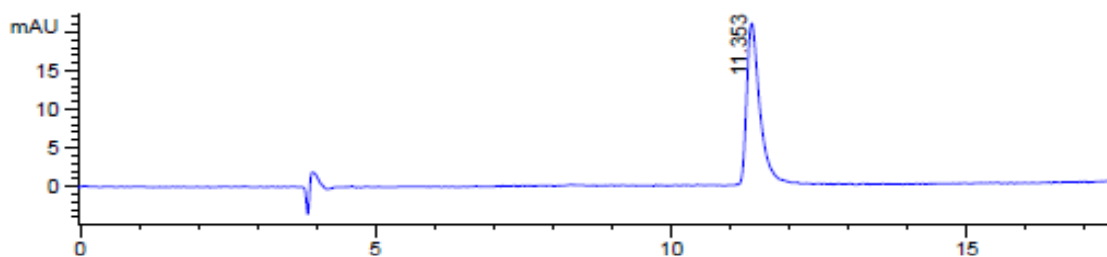
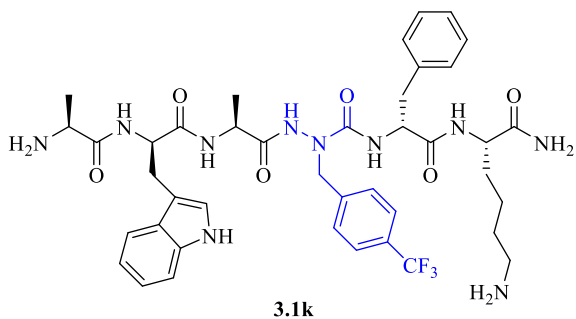
(3.1j) LCMS chromatogram [35-55% ACN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 7.21 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



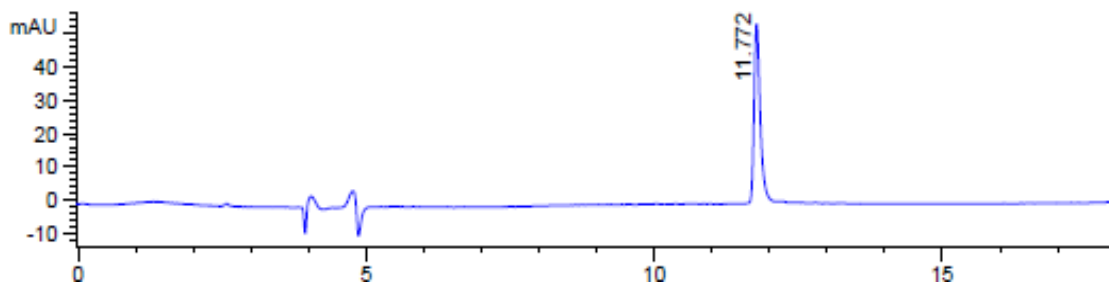
(3.2k) LCMS chromatogram [10-50% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 14.0 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



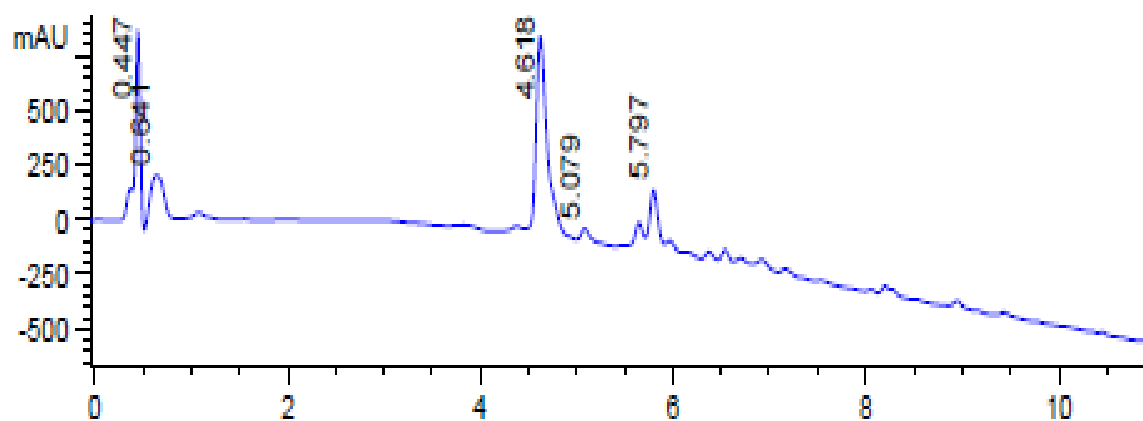
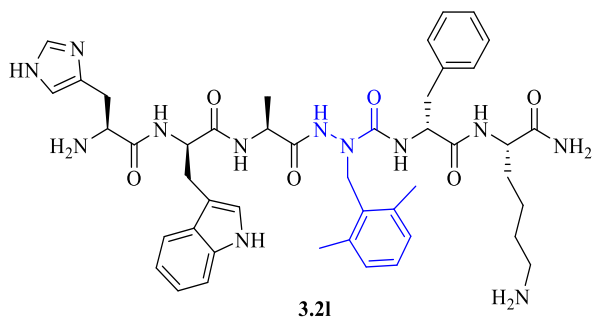
(3.2k) LCMS chromatogram [10-50% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 16 min] RT 4.9 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



(3.1k) LCMS chromatogram [35-55% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 11.3 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

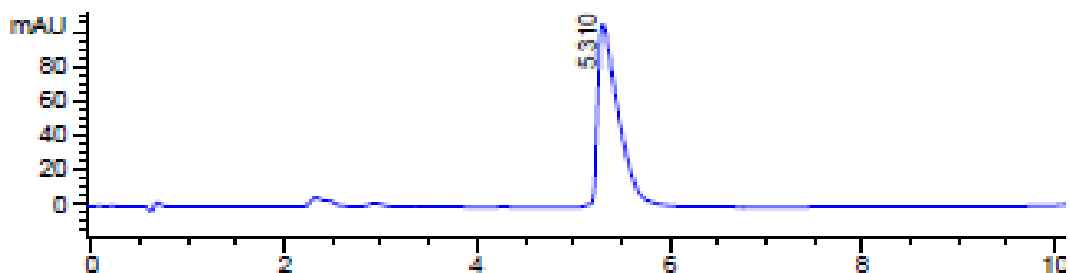
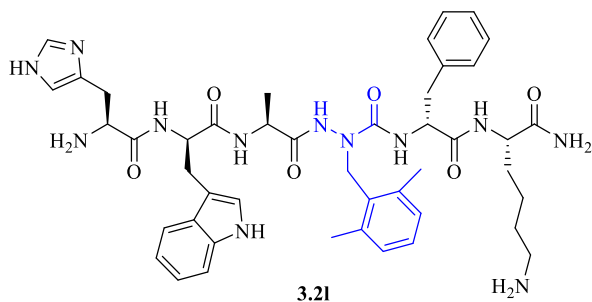


(3.1k) LCMS chromatogram [20-40% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 11.8 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

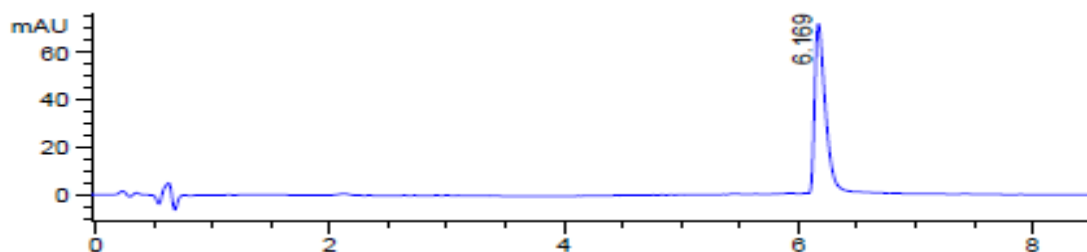


(3.21) LCMS chromatogram [10-00% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 4.6 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 µm, 4.6 mm X 100 mm).

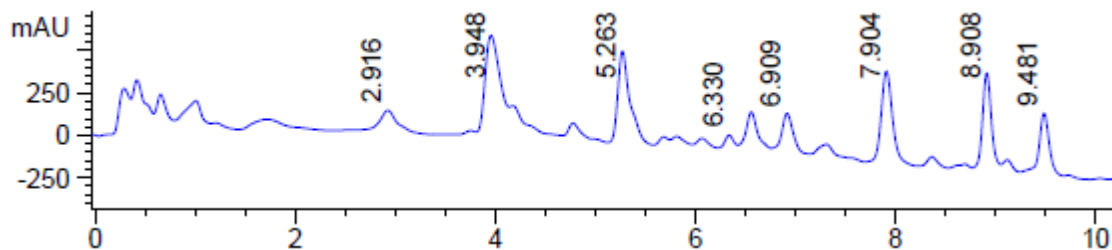
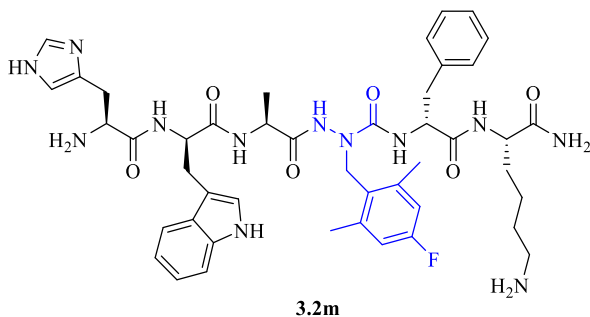
Ret. Time	Height	Area	Area %
0.447	835.417	2234.176	14.936
0.641	204.995	1881.325	12.577
4.618	948.156	8056.568	53.860
5.079	84.376	819.758	5.480
5.797	299.524	1966.595	13.147



(3.21) LCMS chromatogram [30-60% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 5.3 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

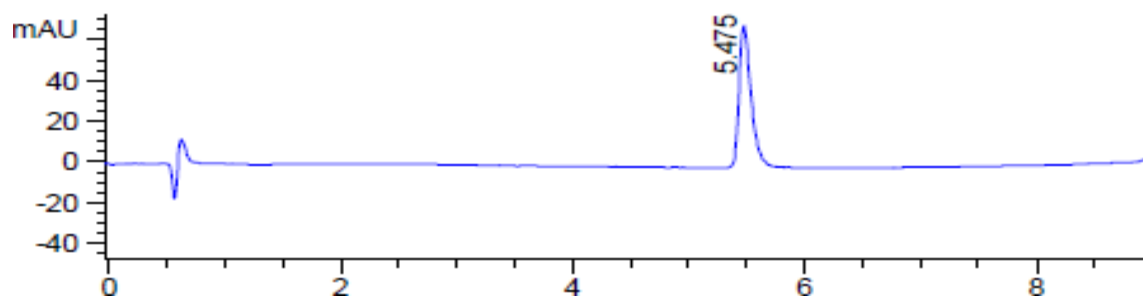
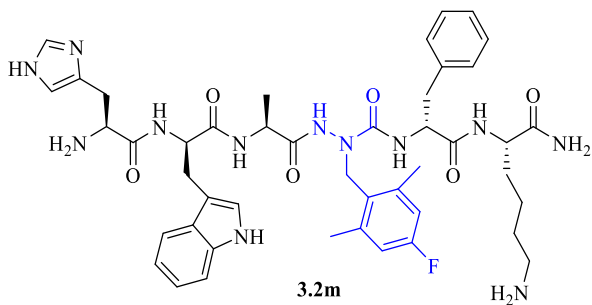


(3.21) LCMS chromatogram [14-40% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 12 min] RT 6.2min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

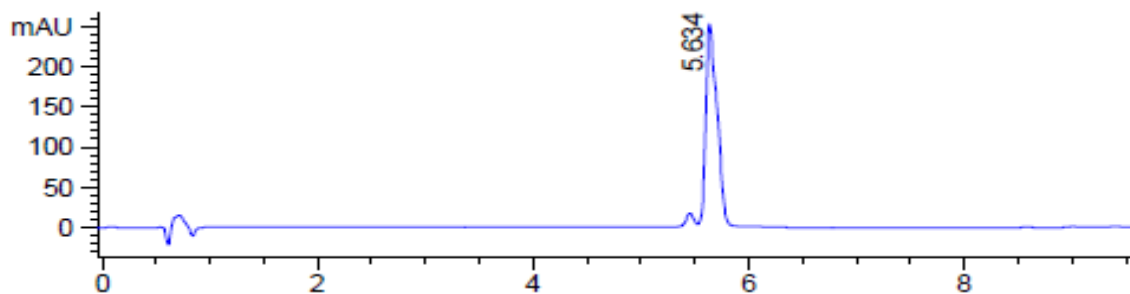


(3.2m) LCMS chromatogram [20-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 3.9 (M+CO₂) and 5.2 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

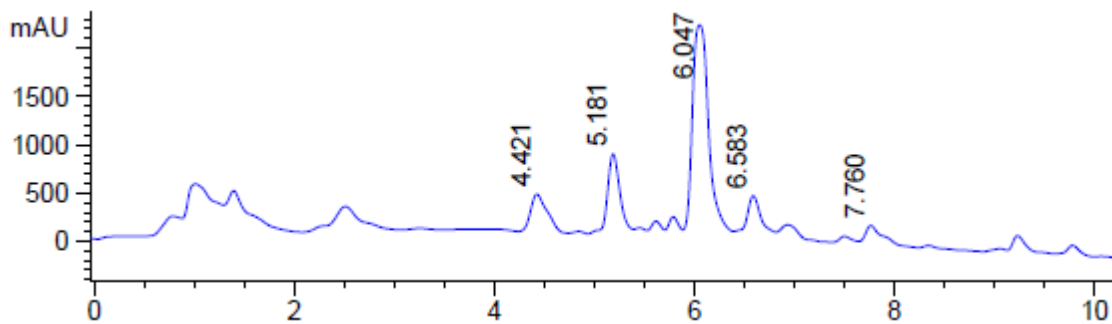
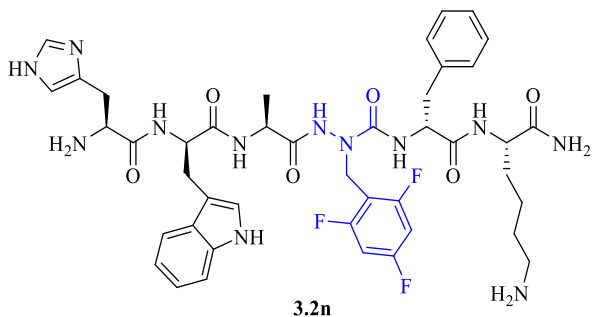
Ret. Time	Height	Area	Area %
2.916	145.205	1480.952	5.985
3.948	581.492	7029.073	28.408
5.263	517.552	3853.392	15.574
6.330	119.912	854.503	3.454
6.552	184.319	1111.498	4.492
6.909	199.978	1286.967	5.201
7.904	544.630	4233.996	17.112
8.908	548.464	3107.564	12.559
9.481	320.710	1785.067	7.214



(3.2m) LCMS chromatogram [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 5.5 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 µm, 4.6 mm X 100 mm).

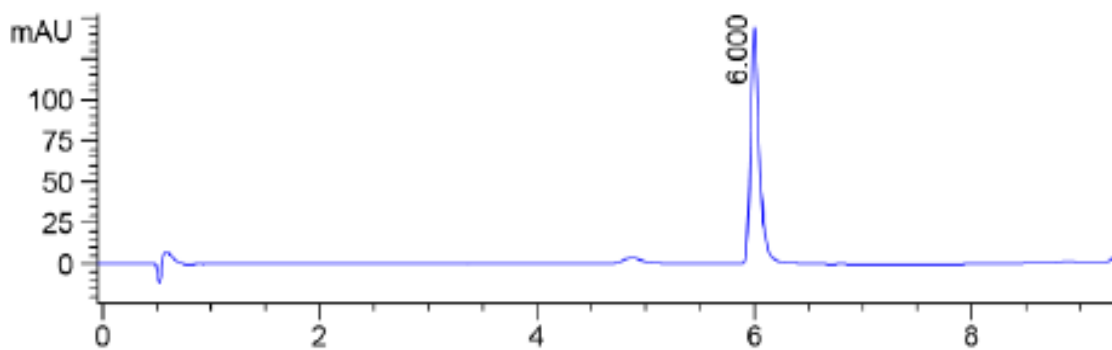
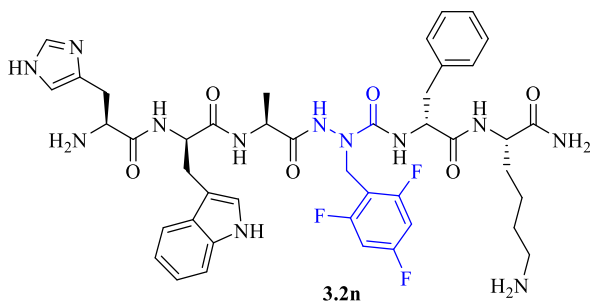


(3.2m) LCMS chromatogram [5-80% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 5.6 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 µm, 4.6 mm X 100 mm).

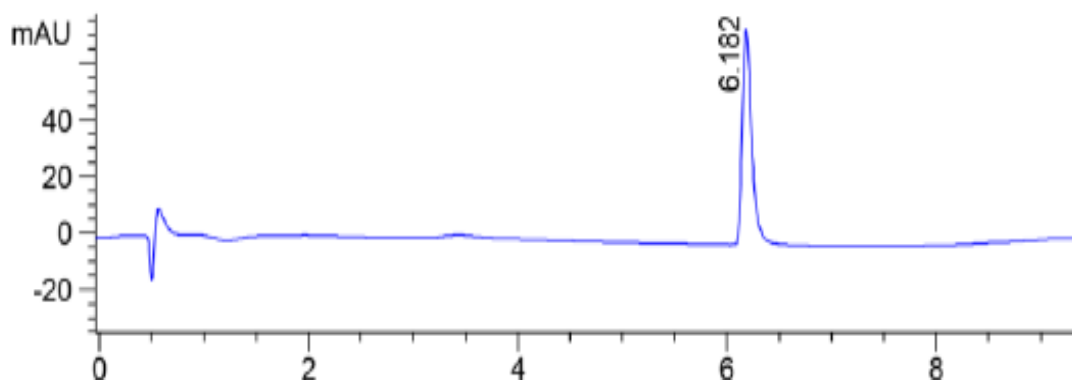


(3.2n) LCMS chromatogram [5-90% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 6.1 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 µm, 4.6 mm X 100 mm).

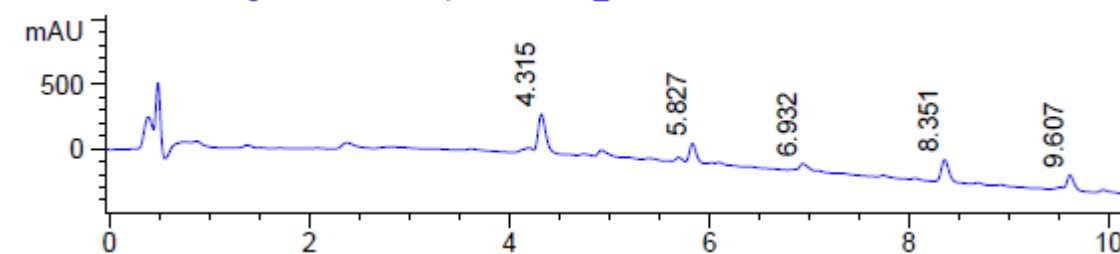
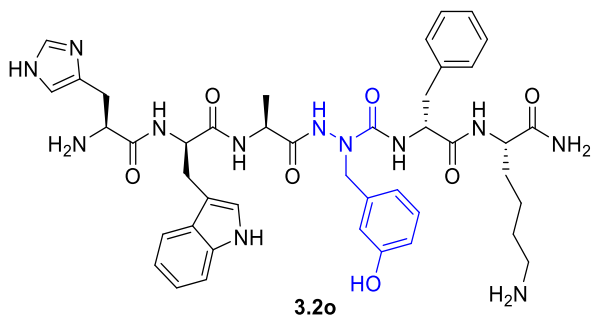
4.421	378.702	4227.616	11.577
5.181	724.409	5123.640	14.030
6.047	2110.221	23082.568	63.208
6.583	307.814	1934.005	5.296
7.760	243.700	2150.345	5.888



(3.2n) LCMS chromatogram [5-80% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 6.0 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

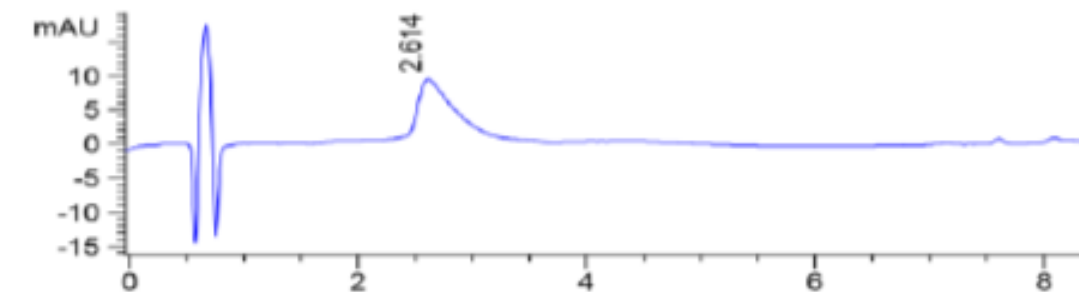
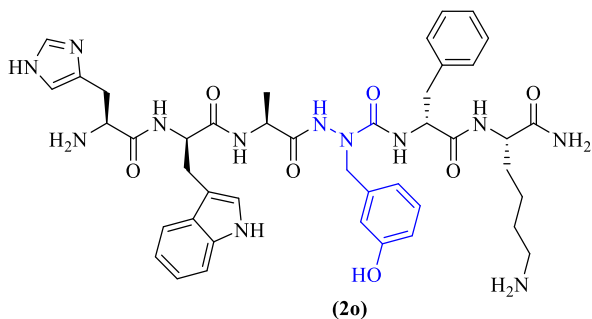


(3.2n) LCMS chromatogram [2-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 6.2 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

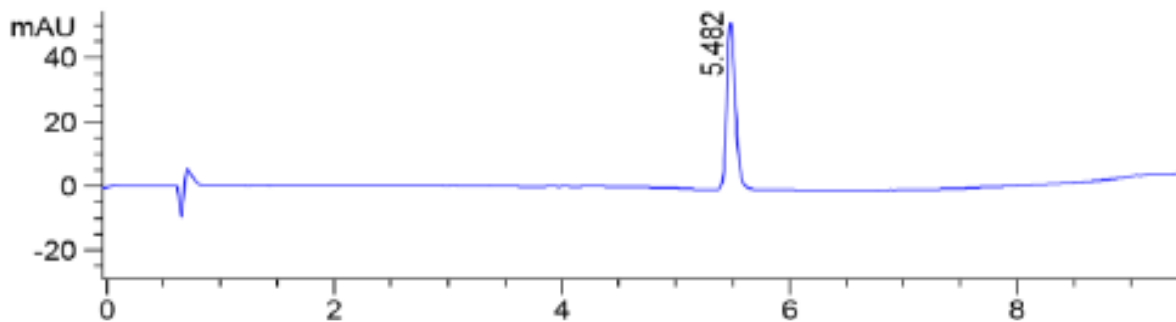


(**3.2o**) LCMS chromatogram [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 4.3 min (M+CO₂) and 5.5 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 µm, 4.6 mm X 100 mm).

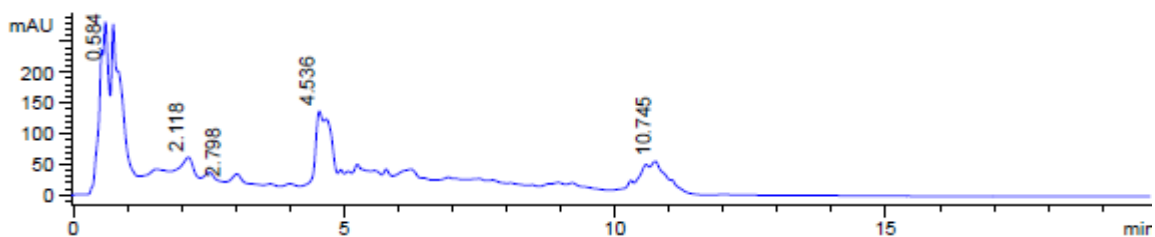
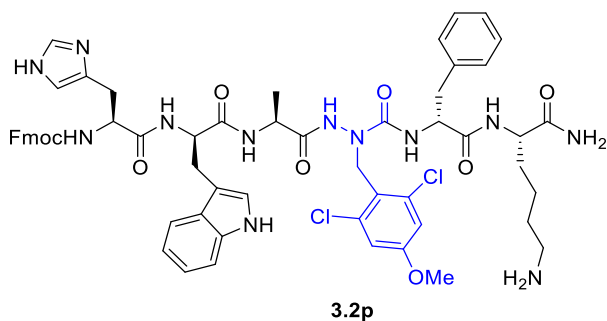
Ret. Time	Height	Area	Area %
4.315	264.480	1216.759	21.510
5.827	195.103	1341.203	23.710
6.932	98.780	766.382	13.548
8.351	167.930	844.399	14.928
9.607	162.537	1487.924	26.304



(3.2o) LCMS chromatogram [5-80% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 2.6 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

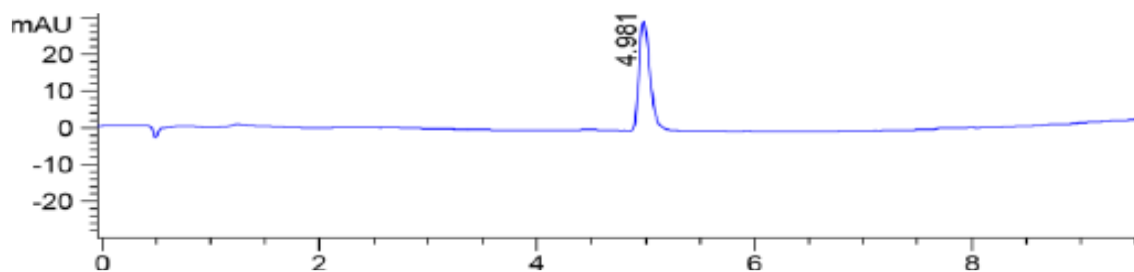
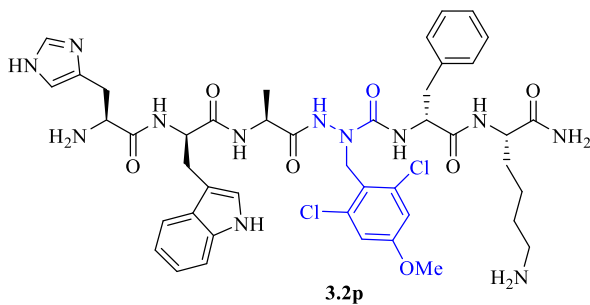


(3.2o) LCMS chromatogram [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 5.5 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

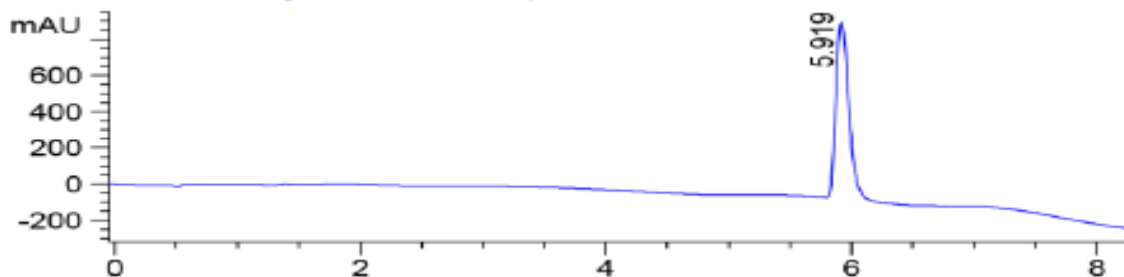


(3.2p) LCMS chromatogram [20-60% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 4.5 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μ m, 4.6 mm X 100 mm).

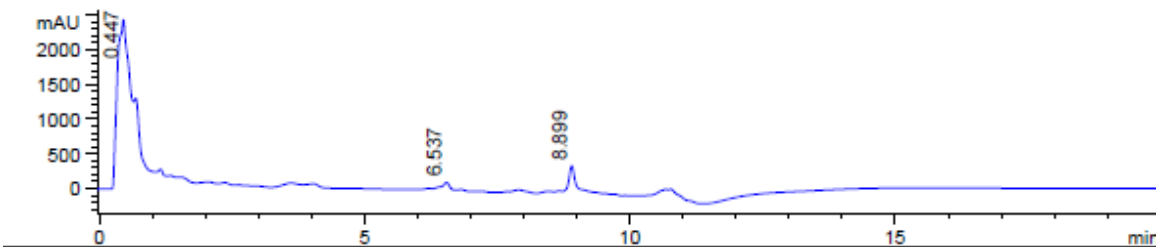
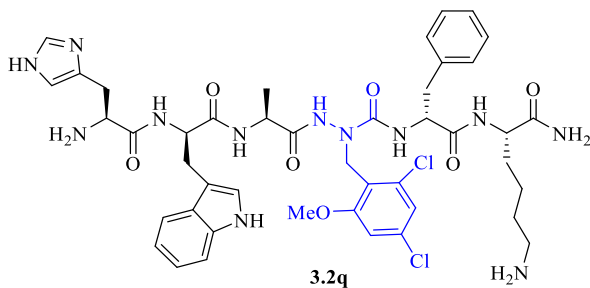
Ret. Time	Height	Area	Area %
0.584	274.190	6000.970	54.177
2.118	24.025	274.603	2.479
2.798	20.025	323.865	2.924
3.018	6.301	35.620	0.322
4.536	114.121	2178.437	19.667
10.745	58.320	2263.162	20.432



(3.2p) LCMS chromatogram [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 4.98 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 µm, 4.6 mm X 100 mm).

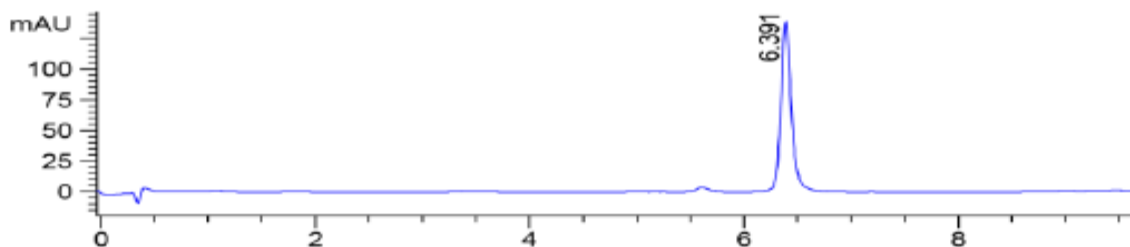
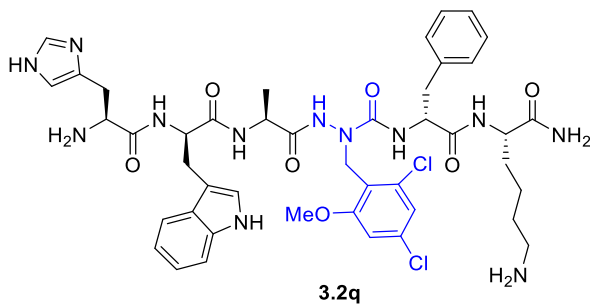


(3.2p) LCMS chromatogram [5-80% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 5.2 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 µm, 4.6 mm X 100 mm).

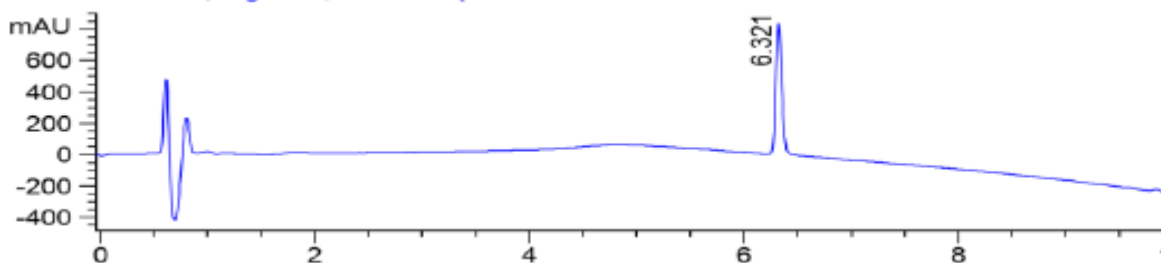


(3.2q) LCMS chromatogram [20-60% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 0.5 min (M+44) and 3.6 min (M+1) on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 µm, 4.6 mm X 100 mm).

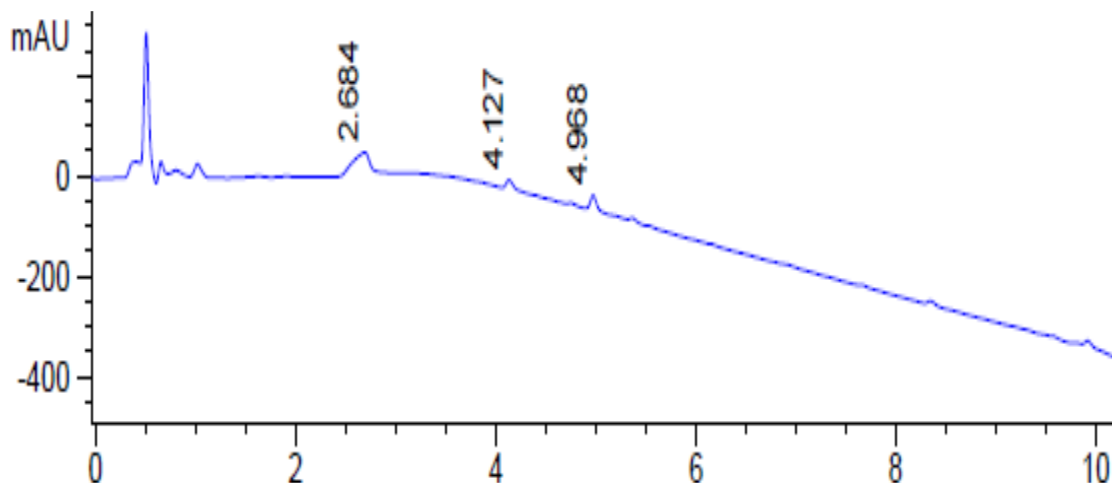
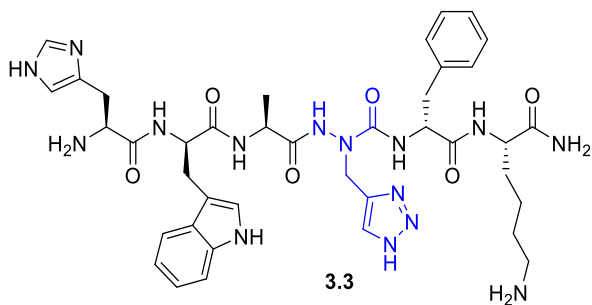
Ret. Time	Height	Area	Area %
0.447	2411.707	48908.781	94.159
6.537	154.307	1295.242	2.494
8.899	312.094	1739.008	3.348



(3.2q) LCMS chromatogram [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 6.4 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

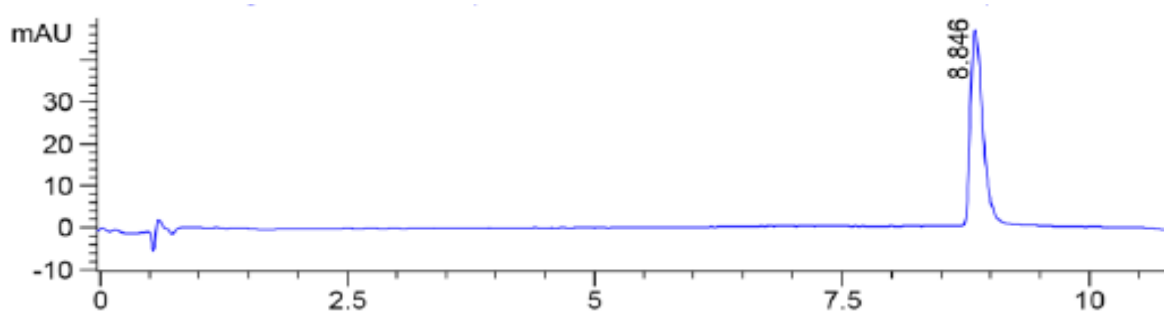
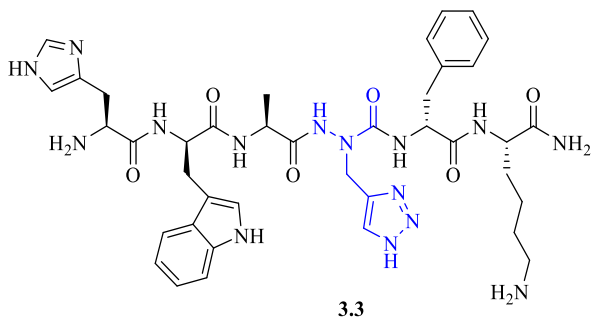


(3.2q) LCMS chromatogram [5-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 6.3 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

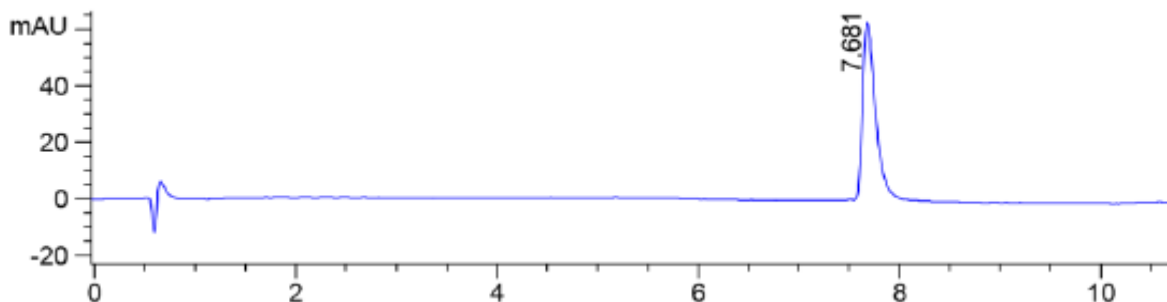


(3.3) LCMS chromatogram [10-80% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 4.1 min (M+CO₂) and 5.0 min (M+1) on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).

Ret. Time	Height	Area	Area %
2.684	31.227	217.774	39.480
4.127	28.710	159.794	28.969
4.968	34.048	174.032	31.550



(3.3) LCMS chromatogram [0-30% MeCN (0.1% FA)/water (0.1% FA), 20 min] RT 8.8 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).



(3.3) LCMS chromatogram [0-50% MeOH (0.1% FA)/water (0.1% FA), 14 min] RT 7.68 min on a Sunfire C18 analytical column (100Å, 3.5 μm, 4.6 mm X 100 mm).