Université de Montréal

Conception, synthèse et activité anticancéreuse d'analogues basés sur la molécule FTY720 (Gilenya)

par
Jérémie Tessier

Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M. Sc.) en chimie

Octobre 2015

© Jérémie Tessier, 2015

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Conception, synthèse et activité anticancéreuse d'analogues basés sur la molécule FTY720 (Gilenya)

Présenté par :
Jérémie Tessier

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Prof. Hélène Lebel
Présidente-rapporteuse

Prof. Richard Giasson
Membre du jury

Prof. Stephen Hanessian
Directeur de recherche

Résumé

FTY720 (aussi connu sous le nom de Fingolimod ou Gilenya) agit sur les récepteurs sphingosine-1-phosphate (S1P) et induit la suppression du système immunitaire (immunosuppression). Cette molécule est reconnue pour avoir une activité contre plusieurs cellules cancéreuses. Cette activité est indépendante de l'action sur les récepteurs S1P et on attribue plutôt la mort (apoptose) des cellules cancéreuse à la capacité que possède la molécule à réduire le transport des nutriments dans la cellule. Toutefois, malgré ses nombreux avantages, FTY720 ne peut pas être utilisé afin de traiter des humains puisque l'activation secondaire des récepteurs S1P1 et S1P3 mènent à une diminution du rythme cardiaque (bradycardie) chez les patients. Notre groupe s'est donc concentré sur la synthèse d'analogues qui potentiellement n'activeraient pas le récepteur S1P tout en gardant une activité biologique contre plusieurs cellules cancéreuses. Malgré le fait que nos analogues agissent également sur la diminution du transport des nutriments dans les cellules, nous ne connaissons pas le mécanisme d'action par lequel ceux-ci agissent. Au passage, le projet de recherche ci-présenté nous aura par ailleurs permis de développer une grande variété de sondes photo-actives dans l'espoir d'isoler une ou plusieurs protéines qui seraient impliquées dans le mécanisme d'action.

Mots-clés : FTY720, leucémie, pyrrolidine, approche chiron, Gilenya, sphingosine kinase, apoptose.

Abstract

FTY720 (also known as Fingolimod, or Gilenya) functions as an immunosuppressant due to its effect on sphingosine-1-phosphate receptors. FTY720 also exhibits anticancer activity in a number of cancer cell lines. This result is independent of its effects on S1P receptors and due instead, to its ability to induce nutrient transporter down-regulation. However, FTY 720 cannot be used in human patients due to bradycardia that occurs secondary to the activation of S1P1 and S1P3 receptors. Our group focused on the design and synthesis of constrained FTY720 analogues that do not activate S1P receptors and also have the potential to be safely used in humans due to their potent antiproliferative activity against selected cancer cell lines. Although we know that our analogues, like FTY 720, act as nutrient transporter down-regulators, the proteins involved in the process are not known. We are developing a wide variety of Photo-Cross-Linking Probes to hopefully isolate one or more proteins that may be involved in one of the pathways.

Keywords : FTY720, leukemia, pyrrolidine, chiron approach, Gilenya, sphingosine kinase, apoptosis.

Table des matières

Résumé ..... **i**

Abstract ..... **ii**

Table des matières ..... **iii**

Liste des abréviations ..... **v**

Liste des tableaux ..... **viii**

Liste des schémas ..... **ix**

Liste des figures ..... **xi**

Remerciements ..... **xiv**

Chapitre 1 : Conception et synthèse d'analogues rigides de la molécule FTY720 ..... **1**

1.1 Historique de la molécule FTY720 (Gilenya) **2**

1.1.1 De la découverte à la conception de la molécule FTY720 2

1.1.2 Le mécanisme d'action de la molécule 2

1.1.3 Restrictions pour l'utilisation de FTY720 comme agent anticancéreux 4

1.2 La synthèse d'analogue à conformation définie de FTY720 ..... **4**

1.2.1 Les débuts de la conception d'analogues rigides de FTY720 4

1.2.2 La conception et la synthèse de la série des éthers benzyliques 7

1.2.3 L'optimisation de la synthèse des éthers benzyliques 11

1.3 La synthèse d'analogues phosphorés **14**

1.3.1 L'importance des phosphates dans le mécanisme d'action des molécules 14

1.3.2 La conception et la synthèse de la série des phosphates 16

1.3.3 La conception et la synthèse de la série des phosphonates 20

1.4 La synthèse d'analogues comportant différentes fonctions **26**

1.4.1 L'effet des groupements azotures et alcynes sur l'activité biologique des analogues 26

1.4.2 L'effet des groupements alcools sur l'activité biologique des analogues 33

1.5 Conclusions générales et perspectives **35**

1.6 Références **37**

Chapitre 2 : Ciblage et isolation du récepteur impliqué via liaison d'une molécule photo-active 39

2.1 La chimie bio-orthogonale 40

2.1.1 Le concept de bio-orthogonalité 40

2.2 La recherche de la réaction bio-orthogonale idéale 41

2.2.1 Réactions impliquant une modification directement sur la protéine 41

2.2.2 L'application de la réaction de Staudinger en chimie bio-orthogonale 43

2.2.3 L'application du couplage azoture-alcyne en chimie bio-orthogonale 45

2.3 Conception d'une molécule photo-active afin de lier le récepteur 47

2.3.1 Le concept de photo-activité 47

2.3.2 Les composés benzophénones ou cétones aromatiques 48

2.3.3 Les composés contenant la fonction diazirine 49

2.3.4 Les composés contenant un azoture aromatique 50

2.4 Conception de la molécule afin de lier et isoler la protéine cible 51

2.4.1 La synthèse d'analogues diazirine-alcyne 51

2.4.2 La synthèse de l'analogue azoture aromatique-alcyne 56

2.4 Conclusions générales et perspectives 60

2.5 Références 62

Chapitre 3 : Partie Expérimentale 64

3.1 Conditions réactionnelles et provenance des produits 65

3.2 Instrumentation 65

Annexe 66

Annexe I – Partie expérimentale I

FTY-720 Analogues: The *O*-Benzyl Series I

FTY-720 Analogues: The O-Benzyl Phosphonate Series XXVI

FTY-720 Diazirine-Alkyne Linker Analogues XXX

Liste des abréviations

$[\alpha]_D$	rotation optique, raie D du sodium
°C	degré Celsius
2M2B	2-méthyl-2-butène
9-BBN	9-borabicyclo[3.3.1]nonane
Å	Ångström
AAA	alkylation allylique asymétrique
Ac	acétyle
aq.	aqueux
Ar	aromatique
atm	atmosphère
Bn	benzyle
Boc	tert-butyloxycarbonyle
Bu	butyle
c	concentration en g/mL
CAM	ceric ammonium molybdate
cat.	catalytique
CBS	catalyseur de Corey-Bakshi-Shibata
CCM	chromatographie sur couche mince
CI_{50}	concentration inhibitrice à 50%
COSY	spectroscopie de corrélation
DCE	1,2-dichloroéthane
DCM	dichlorométhane
DIAD	diisopropyl azodicarboxylate
DIBAL	hydrure de diisobutylaluminium
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	diméthylformamide
DMP	périodinane de Dess-Martin
DMSO	diméthylsulfoxyde
ee	excès énantiomérique

eq.	équivalent
ESI	ionisation par électronébuliseur
Et	éthyle
g	gramme
h	heure
HPLC	chromatographie en phase liquide à haute performance
HRMS	spectre de masse haute résolution
Hz	Hertz
IBX	2-iodoxybenzoic acid
Im	imidazole
IR	infrarouge
J	constante de couplage
KHMDS	*N,N*-bis(triméthylsilyl)amidure de potassium
L	litre
LDA	diisopropylamidure de lithium
LG	groupe partant
LiHMDS	*N,N*-bis(triméthylsilyl)amidure de lithium
LRMS	spectre de masse basse résolution
M	molaire
Me	méthyle
mg	milligramme
MHz	mégahertz
min.	minute
mL	millilitre
mmol	millimole
Ms	mésyle
MS	tamis moléculaire
N	normalité
NaHMDS	*N,N*-bis(triméthylsilyl)amidure de sodium
NBS	*N*-bromosuccinimide
nOe	effet nucléaire d'Overhauser

o	ortho
PCC	chlorochromate de pyridinium
PG	groupe protecteur
Ph	phényle
ppm	partie par million
PPTS	pyridinium para-toluenesulfonate
*p*TSA	acide para-toluènesulfonique
py	pyridine
quant.	quantitatif
R	alkyle
r.d.	ratio de diastéréoisomères
rdt	rendement
RMN	résonance magnétique nucléaire
sat.	saturée
SD	substrat de départ
t	tert
T	température
t.p.	température pièce
TBA	tetra-*n*-butylammonium
TBS	tert-butyldiméthylsilyle
TEA	triéthylamine
Tf	triflyle
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
TLC	"thin layer chromatography"
TMS	tétraméthylsilane
Ts	tosyle
UV	ultraviolet
δ	déplacement chimique
µL	microlitre

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Activité (IC50) des composés phosphates/phosphonates sur des cellules cancéreuses (SupB15). 24

Liste des schémas

Schéma 1.1. Synthèse d'analogues à partir de l'acide L et D-pyroglutamique selon G. Charron. 6
Schéma 1.2. Synthèse de l'éther benzylique 1.22 selon R. Fransson. 11
Schéma 1.3. Mécanisme de la réaction de Mitsunobu. 12
Schéma 1.4. Synthèse optimisée de l'éther benzylique 1.22 à partir de la *cis*-4-hydroxy-D-proline. 13
Schéma 1.5. Mécanisme de phosphorylation de la sphingosine et la molécule FTY720. 15
Schéma 1.6. Synthèse d'analogues rigides de FTY720-phosphate selon G. Charron. 17
Schéma 1.7. Synthèses des analogues phosphorés 1.41-1.44 à partir de la *trans*-4-hydroxy-D et L-proline. 19
Schéma 1.8. Synthèses des analogues phosphorés 1.49-1.56 à partir de la *trans*-4-hydroxy-D et L-proline. 22
Schéma 1.9. Mécanisme de la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons. 23
Schéma 1.10. Synthèse et réactivité du composé triflate (1.65). 27
Schéma 1.11. Synthèse du composé 1.60 et réactivité du tosylate 1.67. 28
Schéma 1.12. Synthèse de l'azoture à longue chaîne 1.61. 29
Schéma 1.13. Synthèse de l'azoture à chaîne intermédiaire 1.73. 29
Schéma 1.14. Synthèse de l'alcyne 1.62. 30
Schéma 1.15. Synthèse de l'alcyne 1.63. 31
Schéma 1.16. Synthèse de l'éther propargylique 1.64. 31
Schéma 2.1. Mécanisme de la réaction de Staudinger 43
Schéma 2.2. Mécanisme de réaction pour la ligature de Staudinger. 44
Schéma 2.3. Mécanisme d'insertion de la benzophénone* dans le lien C-H de la glycine. 48
Schéma 2.4. Illustration des différents mécanismes d'insertion du nitrène. 50
Schéma 2.5. Illustration du mécanisme de liaison et d'isolation du récepteur. 51
Schéma 2.6. Synthèse linéaire de l'analogue 2.4 à partir de la *trans*-4-hydroxy-D-proline. 53
Schéma 2.7. Synthèse convergente de l'analogue 2.17 à partir de la *trans*-4-hydroxy-D-proline. 54

Schéma 2.8. Mécanisme de cyclisation intramoléculaire afin de former le carbamate cyclique 2.18..... 55
Schéma 2.9. Réaction d'amination réductrice afin de former le composé 2.20. 55
Schéma 2.10. Réactions impliquées dans la formation du composé 2.24. 57
Schéma 2.11. Synthèse des composés 2.26 et 2.27 57
Schéma 2.12. Synthèse de l'azoture aromatique (2.33) via différentes conditions d'alkylation. 58
Schéma 2.13. Synthèse des azotures aromatiques 2.35 et 2.5. 59
Schéma 2.13. Route envisagée pour la synthèse de l'analogue 2.37. 61

Liste des figures

Figure 1.1. Structures des molécules FTY720 et Myriocine. 2
Figure 1.2. Structures des molécules FTY720-Phosphate et Sphingosine 1-Phosphate (S1P). . 3
Figure 1.3. Structures des acides L et D-pyroglutamique. 5
Figure 1.4. Structures des analogues de la série des éthers benzyliques 3 et 4. 8
Figure 1.5. Structures des quatre isomères de la série des éthers benzyliques sur C-3 (Série 3). 8
Figure 1.6. Structures des quatre isomères de la série des éthers benzyliques sur C-4 (Série 4). 9
Figure 1.7. Structures des analogues 1.23-1.27. 10
Figure 1.8. Structures rayon-X du composé 1.34 (gauche) ainsi que sa forme dimérique (droite). 14
Figure 1.9. Rétrosynthèse de l'analogue phosphorylé 1.35 à partir du dérivé d'acide pyroglutamique 1.14. 16
Figure 1.10. Structures des quatre isomères des analogues phosphorylés de la série des éthers benzyliques 4. 18
Figure 1.11. Structures des différents analogues phosphates et phosphonates de FTY720. 20
Figure 1.12. Structures des différents analogues rigides de FTY720 portant la fonction phosphonates (1.49-1.56). 21
Figure 1.13. Structures des différents analogues rigides de FTY720 portant la fonction azoture ou alcyne. 26
Figure 1.14. Analyse rétro-synthétique pour la synthèse des azotures à courte chaîne. 27
Figure 1.15. Analyse rétro synthétique pour la synthèse des azotures à longue chaîne. 28
Figure 1.16. Analyse rétro synthétique pour la synthèse des différents analogues portant un alcyne. 30
Figure 1.17. Activité (viabilité) des composés 1.60-1.64 contre des cellules lymphoblastiques (FL5.12). 32
Figure 1.18. Structures et activité biologique des différents analogues portant une fonction alcool. 33
Figure 1.19. Synthèse optimisée de l'éther benzylique 1.22. 35

Figure 1.20. Structures des nouvelles séries basées sur la sphingosine et la sphinganine..... 36
Figure 2.1. Illustration du principe général de bio-orthogonalité. 40
Figure 2.2. Modifications des différent acides aminés (Cys, Lys, Trp, et Tyr) et de la fonction N-terminale. 41
Figure 2.3. Cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne afin de former un 1,2,3-triazole..... 45
Figure 2.4. Structures des différents cycloalcynes de la nouvelle génération. 46
Figure 2.5. Structures des différentes fonctions photo-actives 47
Figure 2.6. Structures des différentes diazirines ainsi que les carbènes formés après irraditation. 49
Figure 2.7. Structure des différents analogues comportants les différentes sondes photo-actives. 53
Figure 2.8. Structure de l'analogue azido-FTY720. 56
Figure 2.9. Structure des analogues 1.12 et 2.37. 60

À ma famille et mes proches

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche le Professeur Stephen Hanessian de m'avoir accepté dans son groupe de recherche comme stagiaire durant l'été 2010 et 2011 et ensuite comme étudiant gradué. Il est une personne très intimidante au départ, mais à force de le connaître on apprend qu'il ne recherche qu'à ressortir le meilleur de chacun d'entre nous et pour cela je lui serai toujours reconnaissant.

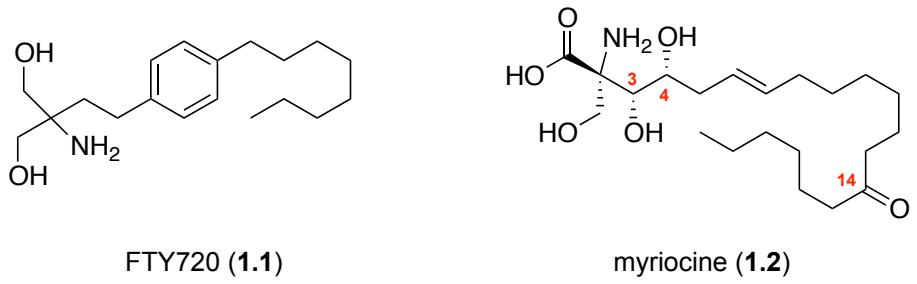
Un gros merci également à Vu, Stéphane, Bianca qui ont bien voulu prendre la peine de réviser mon mémoire. J'aimerais également souligner le support continu de Jean-Philippe et Alexandre, qui m'ont toujours rappelés de par leur existence qu'il existe pire dans la vie que soi-même.

Chapitre 1 : Conception et synthèse d'analogues rigides de la molécule FTY720

1.1 Historique de la molécule FTY720 (Gilenya)

1.1.1 De la découverte à la conception de la molécule FTY720

La molécule FTY720 (**1.1**), présentement mise en marché sous le nom de Gilenya et également appelée fingolimod, est utilisée pour le traitement de la sclérose en plaque, une maladie neurologique auto-immune chronique du système nerveux central (SNC), qui affecte plus de 2,5 millions de personnes dans le monde.[1] Le FTY720 a été synthétisé, pour la première fois en 1992 par des chercheurs japonais.[2] Ce produit est dérivé d'une molécule extraite du champignon *Isaria sinclarii*, la myriocine (**1.2**). Celle-ci possède des propriétés immunosuppressives intéressantes, autant au niveau *in vitro* que *in vivo*, et était principalement utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise.



FTY720 (**1.1**) myriocine (**1.2**)

Figure 1.1. Structures des molécules FTY720 et Myriocine.

En s'inspirant de la structure de la myriocine, ces chercheurs[2] ont effectué des modifications afin d'augmenter l'activité biologique et de réduire la toxicité de la myriocine, une stratégie souvent utilisée en chimie médicinale. Ces études d'analogues ont mené à la conclusion que les groupements alcools en position 3 et 4, la cétone en position 14 ainsi que la double liaison n'étaient pas primordiaux pour l'activité immunosuppressive de la molécule.

1.1.2 Le mécanisme d'action de la molécule

Bien que la molécule aie été synthétisée en 1992, il a fallu près de 10 ans avant que le mécanisme d'action de celle-ci soit démystifié.[3a-c] Il est désormais connu que la molécule est phosphorylée dans la cellule, et ce majoritairement en isomère pro-*S* (**1.3**), par la sphingosine

kinase 1 et 2 (SPHK1 et SPHK2). La molécule est phosphorylée par les deux types de kinase, mais les études démontrent que SPHK2 phosphoryle FTY720 à une vitesse trente fois plus rapide que SPHK1 et ce autant dans les cellules humaines que dans celles des souris.[4] Le phosphate résultant (**1.3**), imitant la structure de sphingosine-1 phosphate (**1.4**), agira comme ligand pour quatre des cinq récepteurs sphingosine 1-phosphate (S1P) qui sont, quant à eux, des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).[5, 6]

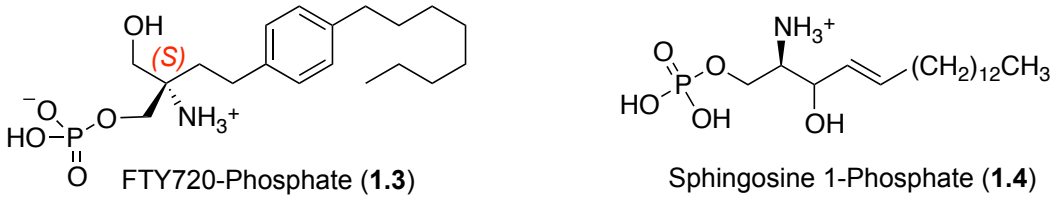


Figure 1.2. Structures des molécules FTY720-Phosphate et Sphingosine 1-Phosphate (S1P).

Toutefois, c'est la liaison au récepteur sphingosine 1-phosphate de type 1 (S1P1) ainsi que celle au récepteur sphingosine 1-phosphate de type 3 (S1P3) qui procure la majeure partie de l'activité biologique du médicament. Une fois lié au récepteur, FTY720 agit en modulant (redistribuant) les lymphocytes, des globules blancs qui jouent un rôle très important dans la réponse du système immunitaire, du sang et de la rate dans d'autres organes lymphoïdes secondaires. La redistribution des globules blancs empêche ainsi la migration des lymphocytes vers les sites d'inflammations privant ainsi une réponse du système immunitaire.[7] En plus de son action sur la recirculation des lymphocytes, FTY720 permet également de préserver l'intégrité vasculaire du système en améliorant les fonctions de la barrière endothéliale.[8] En effet, FTY720 permet la réduction de la migration des lymphocytes dans le système nerveux central (SNC) où plusieurs processus pathologiques ont lieu. Ceci a pour effet de diminuer l'activité des lymphocytes qui sont la cause de nombreuses maladies auto-immunes telle que la sclérose en plaque.

1.1.3 Restrictions pour l'utilisation de FTY720 comme agent anticancéreux

Tel que mentionné, FTY720 est un immunosuppresseur très efficace. Plusieurs chercheurs ont également démontré que cette molécule peut avoir des effets anticancéreux.[9-13] Ces effets sont observés à des doses beaucoup plus élevées que les doses généralement requises pour obtenir une réponse immunosuppressive. À ces fortes doses, il se produit une activation secondaire des récepteurs S1P1 et S1P3 qui peut causer une arythmie cardiaque chez les patients,[14] de sorte que, bien que l'activité anticancéreuse soit très efficace afin de traiter divers cancers dans les cellules animales, la molécule ne peut pas être utilisée afin de traiter des humains.

Jusqu'à récemment, nous croyions que les effets biologiques anticancéreux de la molécule étaient reliés uniquement à l'activation des récepteurs sphingosine 1-phosphate. En collaboration avec le groupe de recherche de la Pr. Edinger, notre groupe a pu déterminer que les effets anticancéreux et l'activation des récepteurs S1P par la molécule n'étaient pas reliés. Ces études ont donc permis de proposer un nouveau mécanisme d'action anticancéreux pour FTY720 lorsque les doses sont très élevées, c'est-à-dire une mort cellulaire par modulation (baisse) du transport des nutriments à l'intérieur de la cellule.[15] Ceci dit, il serait donc possible d'envisager une molécule analogue à FTY720 qui possèderait une activité anticancéreuse, tout en laissant les récepteurs S1P inactifs. Une molécule de la sorte permettrait l'utilisation d'un médicament anticancéreux chez les humains puisque celui-ci n'induirait plus d'arythmie cardiaque chez les patients traités.

1.2 La synthèse d'analogue à conformation définie de FTY720

1.2.1 Les débuts de la conception d'analogues rigides de FTY720

Afin de mieux comprendre la topologie et la structure du récepteur, notre groupe, plus spécifiquement Guillaume Charron, a synthétisé une série d'analogues rigides à configuration définie de FTY720, qui sont utilisée comme sonde moléculaire dans le récepteur.[16] On dit que ces analogues sont rigides puisque leur structure est basée sur une pyrrolidine. En plus de procurer de la rigidité, le cycle apporte un contrôle par rapport aux centres stéréogéniques

puisque plusieurs pyrrolidines substituées existent de manière énantiopures, soit de source naturelle ou de source synthétique (commerciale).

Acide L-pyroglutamique (**1.5**) Acide D-pyroglutamique (**1.6**)

Figure 1.3. Structures des acides L et D-pyroglutamique.

La méthodologie utilisée est aussi connue sous le nom de l'approche Chiron.[17] Celle-ci a été développée par le professeur Hanessian dans les années 1980. La stratégie est simple, et consiste à utiliser comme précurseur une molécule comportant un ou plusieurs centres chiraux connus, aussi appelée « chiron », afin de débuter la synthèse et ainsi éviter des étapes de synthèse énantiosélective impliquant des catalyseurs chiraux pouvant être coûteux ou difficiles à synthétiser. Les sucres, les acides aminés, les aminoglycosides et les terpènes sont souvent utilisés dans ce genre de méthodologie.

Dans notre cas, les synthèses ont été effectuées sur les acides L- et D-pyroglutamique (**1.5 et 1.6**). Ces acides peu coûteux nous permettent d'obtenir en quelques étapes la lactame α,β−insaturée **1.7** qui sert comme intermédiaire de départ pour la synthèse (**Schéma 1.1**). Il existe plusieurs méthodologies dans la littérature pour additionner des nucléophiles en position 4 d'une lactame α,β−insaturé. Toutefois, notre groupe a rapporté que l'addition directe du composé 1-bromo-4-octylphényle en utilisant un organocuprate lithié (aussi appelé réactif de Gilman),[18] ou un réactif de Grignard en présence de cuivre, ne fonctionne pas, et ce même en présence d'un acide de Lewis très fort. Par contre, le sel de lithium formé à partir du 1,4-dibromobenzène a donné de meilleurs résultats et le composé d'addition-1,4 (**1.8**) a été obtenu avec un rendement de 94%.

Par la suite, un couplage de Suzuki suivi d'une hydrogénation de l'alcène résultant du couplage permet d'obtenir le composé **1.9,** qui a été à son tour réduit à l'hémiaminal en utilisant un puissant réducteur suivi d'un parachèvement avec un sel de sulfonate de pyridine

en présence de méthanol afin de former l'éther méthylique correspondant, qui a quant à lui été alkylé en présence d'un catalyseur de titane pour former l'alcène terminal **1.10**.

L'isomérisation de cet alcène terminal peut se faire en utilisant le catalyseur de Grubbs et en utilisant le protocole de Roy.[19] Cette oléfine a ensuite été transformée en alcool **1.11** avec une réaction d'ozonolyse réductrice suivie d'une réduction de l'aldéhyde correspondant avec $NaBH_4$ avec un rendement de 50% sur quatres étapes. Deux réactions de déprotection nous donnent l'analogue rigide de FTY720 (**1.12**). Un protocole similaire utilisant l'acide D-pyroglutamique permet d'obtenir l'énantiomère **1.13**.

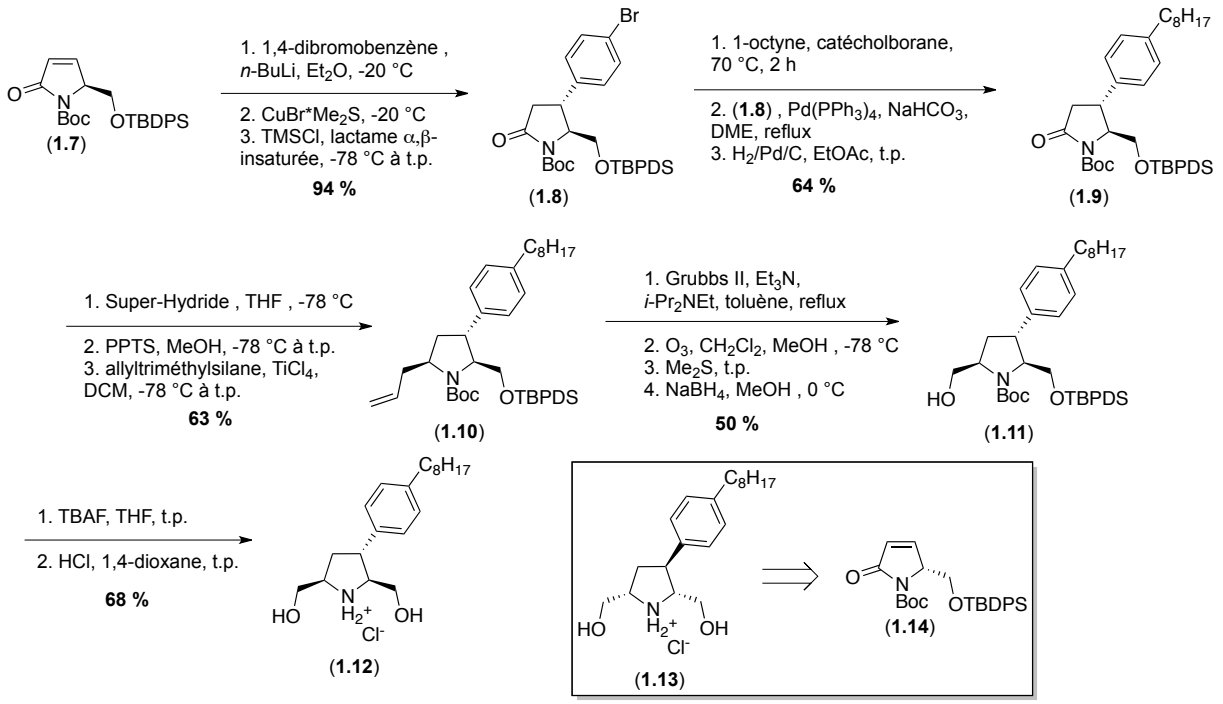


Schéma 1.1. Synthèse d'analogues à partir de l'acide L et D-pyroglutamique selon G. Charron.

Ces analogues rigides de FTY720 ont ensuite été testés afin de déterminer leur affinité avec les récepteurs S1P. Les études d'affinité ont été réalisées en observant la vitesse de phosphorylation par les enzymes avec l'incorporation de phosphate marqué, également appelé radiotraceur, lors d'une incubation d'ATP [γ-^{32}P] avec les enzymes appropriées, c'est à dire SPHK1 et SPHK2.[20] Tout d'abord, l'isomère **1.12** possède une bonne affinité pour la

sphingosine kinase 2. En effet, cet isomère est phosphorylé quatre fois plus vite par cette kinase que FTY720. La vitesse de phosphorylation est également moins rapide avec SPHK1.

Quant à l'isomère **1.13** les études montrent qu'il ne possède aucune affinité que ce soit avec les deux récepteurs [16]. C'est donc dire que ces enzymes sont sélectives envers les substrats lors de la phosphorylation. Une sélectivité de la sorte est également observée avec FTY720, puisque l'énantiomère pro-*S* est majoritairement phosphorylé dans la cellule par la sphingosine kinase.[21] De plus, les composés **1.12** et **1.13** ont une affinité/sélectivité pour les récepteurs S1P4 et S1P5. D'autre part, aucune affinité pour les récepteurs S1P1 et S1P3 n'a été observée ouvrant la porte à une nouvelle classe de médicaments potentiels. En résumé, ces travaux ont permis de synthétiser une molécule analogue à FTY720 qui possède une activité anticancéreuse, tout en laissant les récepteurs S1P inactifs, ouvrant ainsi la porte à l'utilisation de ce genre de molécules chez les humains.

Les composés **1.12** et **1.13** ont également été phosphorylés dans nos laboratoires afin de former les phosphates correspondants. Une étude plus approfondie de ces modifications sera décrite à la section **1.3.4**. À partir de ces résultats, nous avons proposé une nouvelle série d'analogues rigides, la série des éthers benzyliques.

1.2.2 La conception et la synthèse de la série des éthers benzyliques

Au vue des résultats obtenus, notre groupe s'est penché sur la synthèse d'analogues portant une chaîne benzylique. Afin de rendre la synthèse plus simple, deux séries d'analogues ont été synthétisées à partir d'un dérivé de l'hydroxy proline qui est commercialement disponible. Ces deux séries se distinguent simplement par l'emplacement de la chaîne éther sur le cycle. L'emplacement sur le cycle pyrrolidine de la chaîne par rapport à l'azote déterminera leur nomenclature, d'où le nom éther benzylique 3 et éther benzylique 4 (**Figure 1.4)**. La chaîne benzylique, en plus d'être facilement instalable via une alkylation, permettra d'avoir une flexibilité/mobilité supérieure par rapport à la série précédente et ce de manière stéréocontrollée.

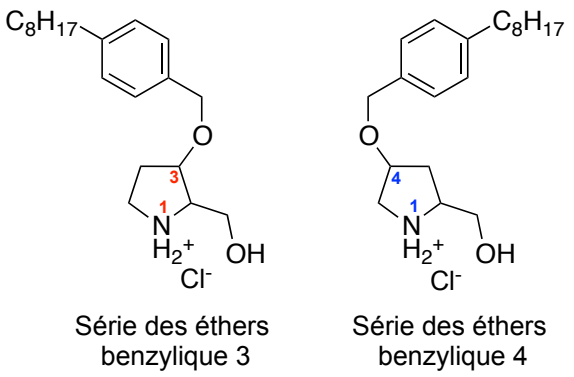


Figure 1.4. Structures des analogues de la série des éthers benzyliques 3 et 4.

La conception de ces molécules a passé par un long processus d'essais et erreurs qui a permis, grâce aux efforts de la postdoc Rebecca Fransson, de tirer plusieurs conclusions sur la topologie de la molécule.[22] Tout d'abord, un composé ayant une lactame (carbonyle en position 5) au lieu d'une pyrrolidine ne possède aucune activité. La présence d'une amine basique est primordiale pour conserver une l'activité biologique. Un analogue comportant une chaîne éther de sept carbones sans groupement aromatique n'a pas l'activité anticancéreuse, ce qui permet d'affirmer que la présence du cycle aromatique est également crucial à l'activité de la molécule. Subséquemment, des analogues de différentes longueurs de chaînes aliphatiques comportant de six à dix carbones positionnés en para ont été synthétisés. La chaîne de huit carbones a la meilleure activité en comparaison avec les chaînes de six et de dix carbones. Aussi, les chaînes comportant une insaturation en position benzylique possèdent une activité légèrement réduite en comparaison avec les chaînes saturées. Ayant trouvé la structure optimale, tous les isomères de chacune des séries ont été synthétisés (**Figure 1.5 et 1.6**).

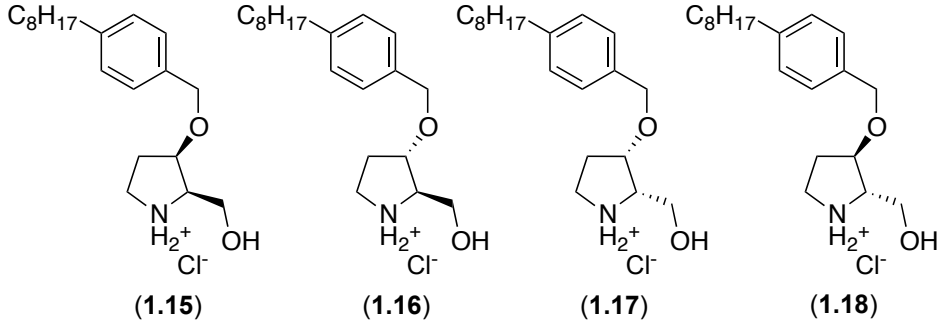


Figure 1.5. Structures des quatre isomères de la série des éthers benzyliques sur C-3 (Série 3).

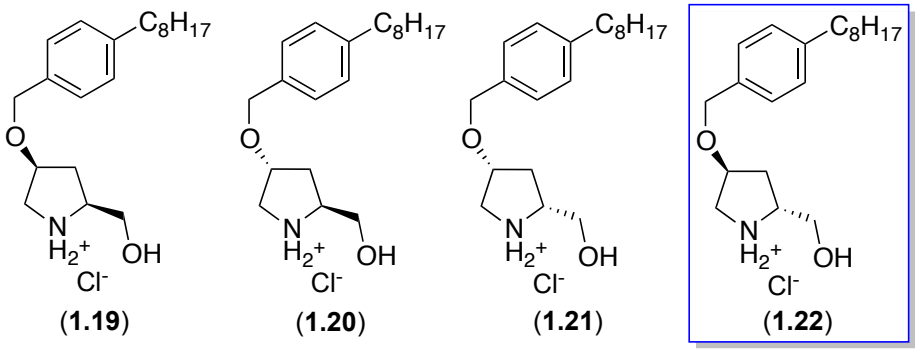


Figure 1.6. Structures des quatre isomères de la série des éthers benzyliques sur C-4 (Série 4).

Ces isomères ont ensuite été testés contre des cellules de leucémie aigüe lymphoblastiques (FL5.12 et SupB15). D'abord, les molécules de la série 4 possède une activité anticancéreuse supérieure ou égale à FTY720. Un candidat ressort toutefois du lot, le composé dérivé de la *trans*-4-hydroxy-D-proline (**1.22**). En effet, cette molécule tue les cellules cancéreuses 4 à 6 fois plus rapidement que les autres isomères de cette série prouvant ainsi que l'orientation relative de la fonction alcool ainsi que la fonction éther benzylique sont très importantes dans le mécanisme de reconnaissance du récepteur.

Ensuite, en analysant les données biologiques du composé **1.22** avec son homologue de la série 3 (**1.18**), nous remarquons une activité près de six fois inférieure pour la série 3 comparativement à la série 4. L'orientation relative, ainsi que la position relative des substituants sur le cycle pyrrolidine confère donc au composé **1.22** une structure unique, lui donnant ainsi une activité anticancéreuse supérieure. De plus, afin de prouver que le mécanisme d'action ne passe pas par la phosphorylation de nos composés pour ensuite se lier aux récepteurs S1P, interaction indésirable qui induit de l'arythmie cardiaque chez les patients, des analogues ne comportant aucun groupement phosphorylable ont été synthétisés (**Figure 1.7**).

Remarquablement, tous ces composés (**1.23**-**1.27**) possèdent une activité anticancéreuse. C'est donc dire que le mécanisme d'action, la réduction du transport des nutriments dans la cellule, ne passe pas par l'activation des récepteurs S1P ce qui rend ces molécules très intéressantes pour le traitement du cancer.

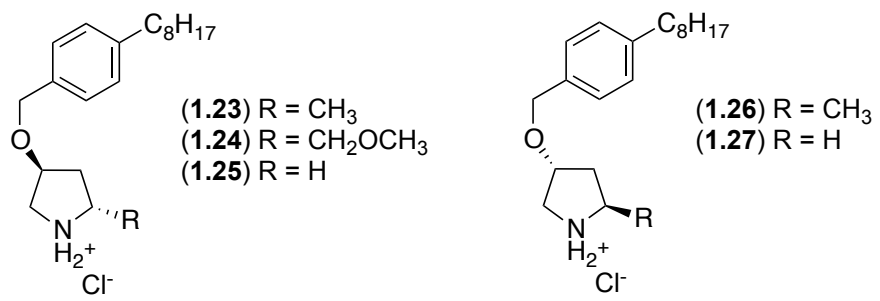


Figure 1.7. Structures des analogues **1.23**-**1.27**.

Les deux séries ont été synthétisées en utilisant la même stratégie, c'est à dire à partir de l'hydroxy D- ou L-proline (**Schéma 1.2**). Ce dérivé de la proline est très approprié pour la synthèse, puisqu'il est commercialement disponible et ce, pour ce qui est du dérivé de la 4-hydroxy-L-proline, très abordable. Étant donné l'activité anticancéreuse accrue du composé **1.22**, ce dernier fut synthétisé plus d'une fois à des fins d'analyses et pour des tests biologiques. La synthèse commence avec une protection de l'amine secondaire de la *trans*-4-hydroxy-D-proline (structure présentée dans le **Schéma 1.2**) en carbamate, suivie d'une réduction de l'acide carboxylique en alcool afin de former le diol **1.29** qui a par la suite été mono protégé en éther silylé **1.30**. Le traitement de l'alcool secondaire en position 4 avec de l'hydrure de sodium a permis la formation de l'alcoolate. Les alcoolates sont généralement des espèces très basiques, mais également très nucléophiles dû à la charge négative qu'ils possèdent. Lorsque mis en présence du bromure de 4-bromobenzyle, qui est un électrophile, une substitution nucléophile de type S_N2 se produit afin de former l'éther benzylique **1.31**. Le brome aromatique peut ensuite être utilisé afin de former un lien C-C par couplage de Suzuki.[23] Le couplage de Suzuki permet d'avoir une longue chaîne de huit carbones sur le cycle aromatique en une seule étape. Des réactions d'hydrogénation de l'alcène résultant du couplage, de déprotection de l'éther silylé ainsi que de déprotection du carbamate donnent le composé **1.22** en huit étapes à partir de la *trans*-4-hydroxy-D-proline.

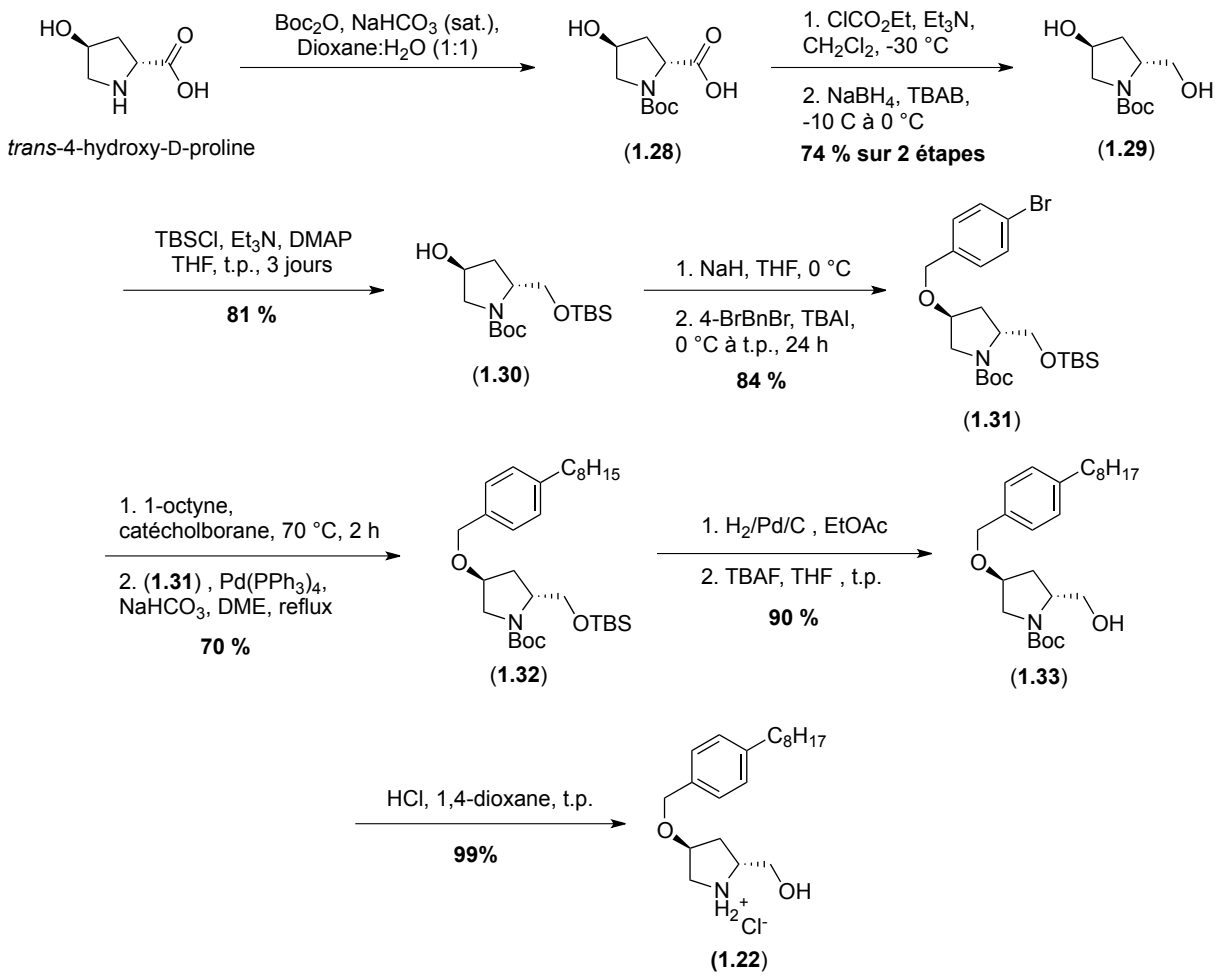


Schéma 1.2. Synthèse de l'éther benzylique **1.22** selon R. Fransson.

1.2.3 L'optimisation de la synthèse des éthers benzyliques

Lors de l'arrivée de l'auteur de ce mémoire dans le groupe du Pr.Hanessian, les études biologiques sur le composé **1.22** étaient toujours en cours et les biologistes du groupe de la Pr.Edinger avaient besoin de plus de matériel afin de les effectuer. Le mandat consistait alors à optimiser la route de Dr. Franson, une chercheuse postdoctorale du groupe Hanessian, vers la molécule cible et également d'en diminuer les coûts, puisque la *trans*-4-hydroxy-D-proline est très dispendieuse (Aldrich : 290$ par gramme). Pour ce faire, une stratégie couramment utilisée en chimie a été utilisée afind'inverser la configuration d'un alcool secondaire ; soit la réaction de Mitsunobu (**Schéma 1.3**).[24]

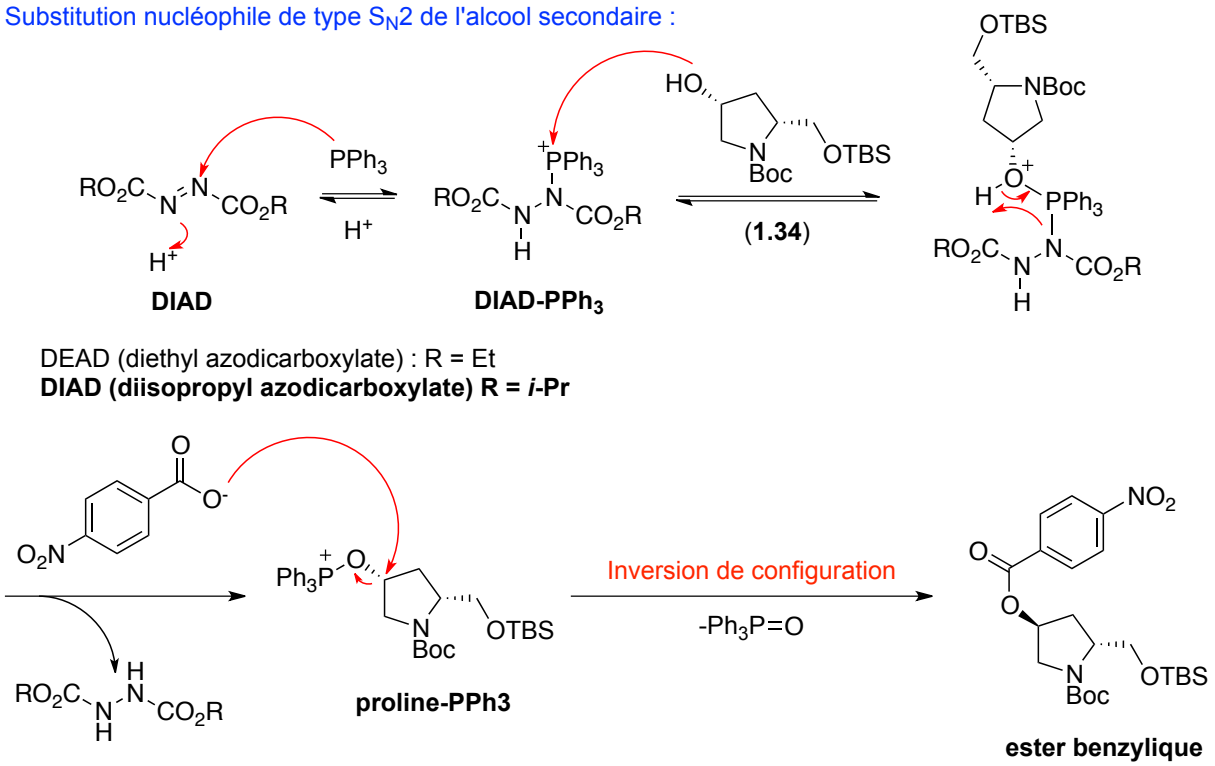


Schéma 1.3. Mécanisme de la réaction de Mitsunobu.

La méthodologie précédemment utilisée permet d'obtenir l'intermédiaire **1.30** en trois étapes avec un rendement global de 60%. Cette nouvelle stratégie semble la meilleure puisque le composé **1.30** (**Schéma 1.4**) a été synthétisé en cinq étapes avec un rendement global de 73% et ce en partant de la *cis*-4-hydroxy-D-proline, un composé beaucoup plus abordable (AK Scientific : 6$ par gramme) que la *trans*-4-hydroxy-D-proline. Pour ce qui est du reste de la synthèse, le protocole déjà établi a été suivi, mis à part deux changements. Premièrement, une

réduction de l'acide carboxylique au BH_3 donne de meilleurs résultats en plus d'éviter une étape de purification. Les conditions de protection de l'alcool primaire en éther silylé ont également été modifiées. En effet, l'utilisation de la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) lors de la réaction de protection du composé *cis* entraîne la formation du produit de monoprotection sur l'alcool secondaire de la molécule, un composé non désiré. De facon étonnante, l'intermédiaire **1.34** se trouve sous forme cristalline comparativement au diastéréoisomère **1.30** qui est une huile incolore. L'orientation *cis* du composé **1.34** confère à la molécule une orientation unique menant à la formation de mailles dimériques qui se trouvent sous forme cristalline (**Figure 1.8**).

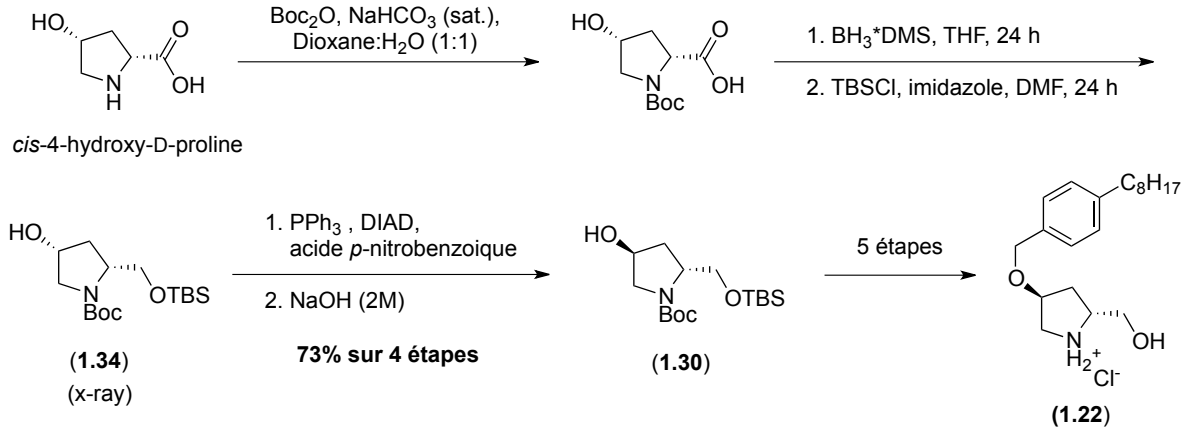


Schéma 1.4. Synthèse optimisée de l'éther benzylique **1.22** à partir de la *cis*-4-hydroxy-D-proline**.**

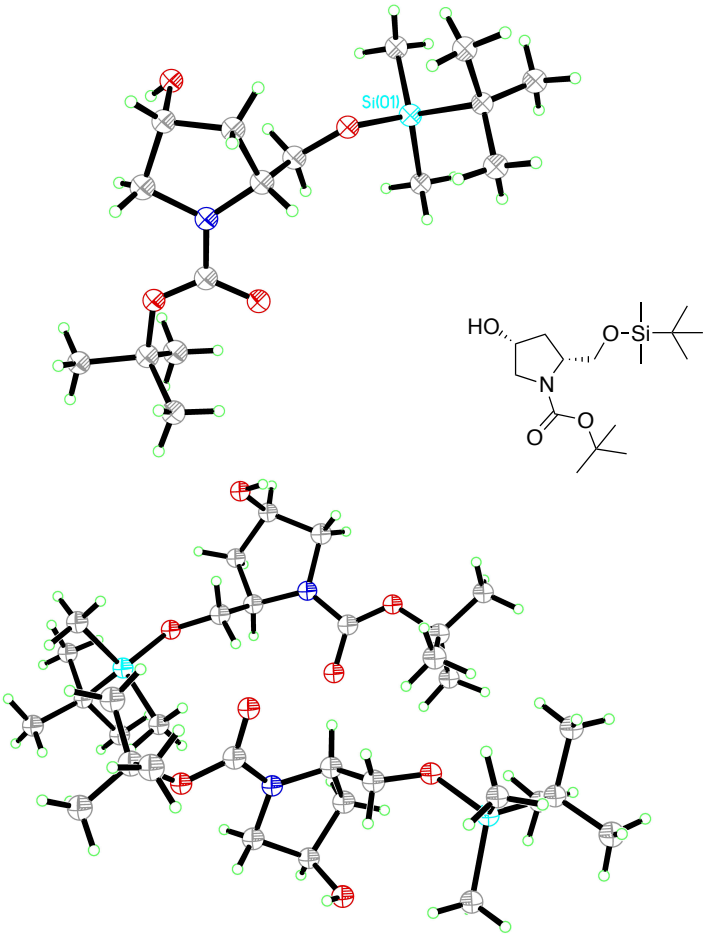


Figure 1.8. Structures rayon-X du composé **1.34** (gauche) ainsi que sa forme dimérique (droite).

1.3 La synthèse d'analogues phosphorés

1.3.1 L'importance des phosphates dans le mécanisme d'action des molécules

Dans le corps humain, les phosphates sont généralement sous forme d'ions libres appelés phosphates inorganiques. Cependant, la source première d'ions phosphate dans le corps provient de la dégradation des adénosines phosphates telles que l'ATP, l'ADP et l'AMP. En effet, ces molécules sont hydrolysées dans le corps humain afin de fournir à celui-ci une concentration suffisante d'ions phosphate. Ces ions sont principalement utilisés comme agents tampons dans le corps afin de prévenir les variations de pH dans le sang.

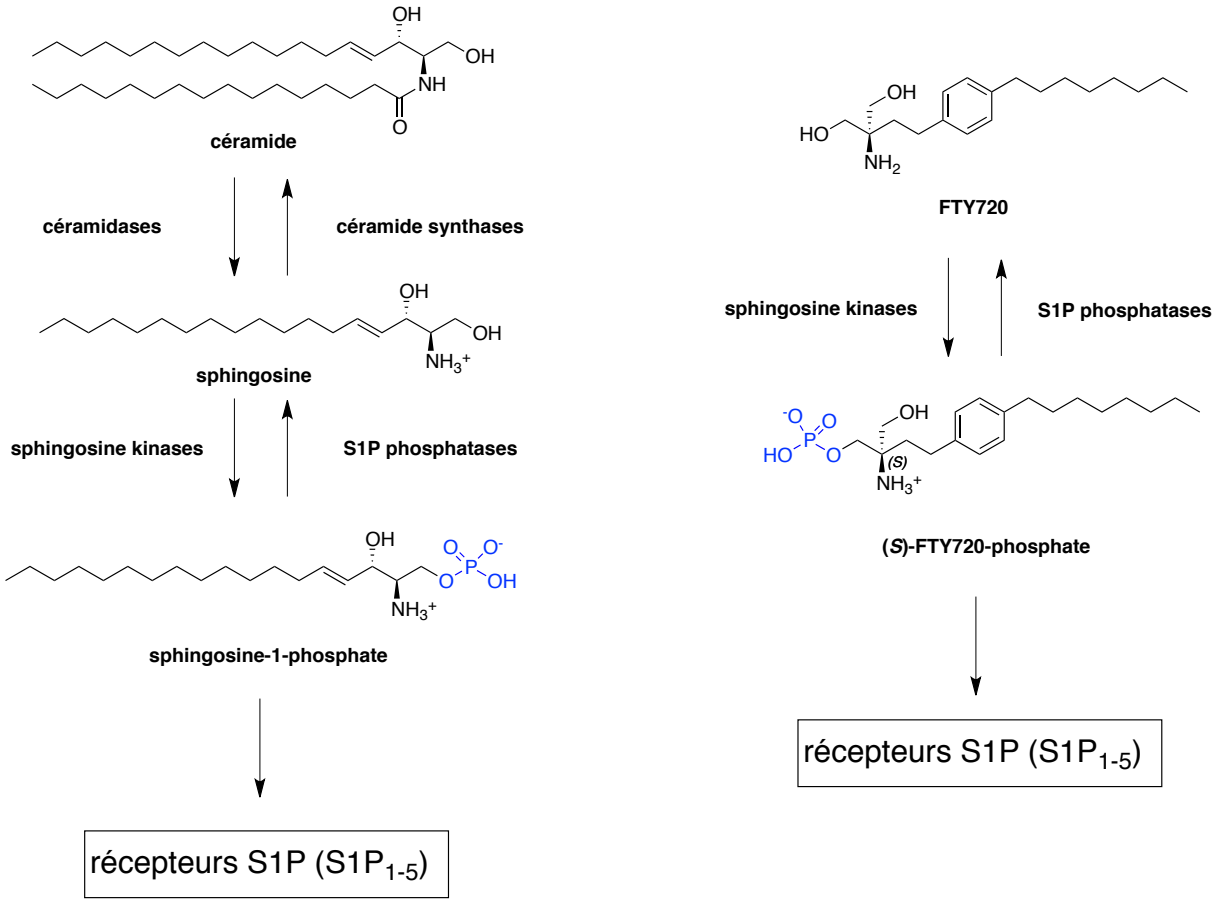


Schéma 1.5. Mécanisme de phosphorylation de la sphingosine et la molécule FTY720.

Tel que mentionné précédemment, le mécanisme d'action de FTY720 passe principalement par la phosphorylation de cette molécule par les SPHK1 et 2 en isomère pro-*S* qui permet au phosphate résultant d'avoir une interaction avec les récepteurs SP1 (**Schéma 1.5**). Le mécanisme inverse est également possible à l'aide de différentes enzymes appelées phosphatases. La phosphorylation de FTY720 est primordiale au mécanisme d'action puisque les cinq récepteurs $S1P_1$ à $S1P_5$ possèdent une très grande sélectivité pour les molécules telles que sphingosine et sphinganine (sphingosine saturée) des molécules similaires à nos analogues.

Il est important de noter que l'activation de chaque récepteur produit une réponse différente d'un récepteur à un autre. Par exemple, l'activation des récepteurs S1P1 et S1P3 peut causer une arythmie cardiaque chez les patients traités avec FTY720.[14]

1.3.2 La conception et la synthèse de la série des phosphates

La synthèse d'analogues rigides contenant un groupement phosphate (**Figure 1.9**) a été effectuée par G. Charron, un ancien étudiant de maîtrise du groupe Hanessian, puisque ces molécules pourraient avoir des propriétés biologiques intéressantes.

De plus, FTY720-phosphate a une activité biologique positive et contrairement à FTY720, FTY720-phosphate ne démontre aucune activation des récepteurs causant l'arythmie cardiaque (S1P1 et S1P3).[25] De plus, plusieurs synthèses de FTY720-phosphate ont été reportées dans la littérature[26-27] ce qui permet d'avoir plusieurs protocoles afin d'effectuer la synthèse de ces composés.

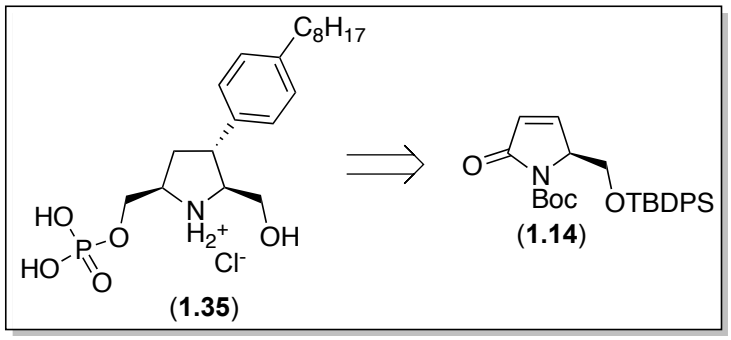


Figure 1.9. Rétrosynthèse de l'analogue phosphorylé **1.35** à partir du dérivé d'acide pyroglutamique **1.14**.

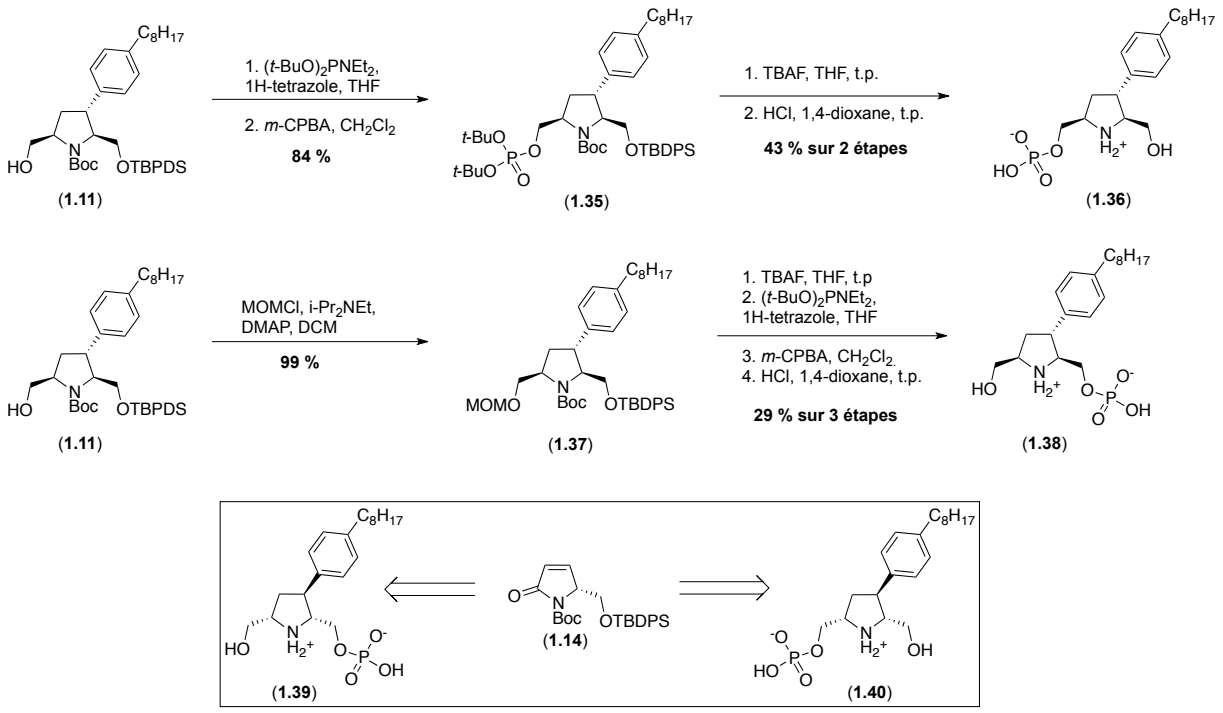


Schéma 1.6. Synthèse d'analogues rigides de FTY720-phosphate selon G. Charron.

La synthèse commence avec la phosphorylation de l'intermédiaire **1.11** en milieu basique afin de former l'ester phosphorique **1.35**. Celui-ci a par la suite été déprotégé afin de former la molécule finale **1.36**. La présence du groupement *tert*-butyle est très importante puisque l'hydrolyse est effectuée en milieu acide. En effet, des esters méthyliques et éthyliques ne sont pas hydrolysables dans de telles conditions justifiant l'utilisation d'un ester phosphorique dérivé du *tert*-butanol.

Afin de former le régioisomère correspondant (**1.38**), des réactions de protection-déprotection orthogonales ont été effectuées sur les deux alcools primaires du composé **1.11**. L'éther MOM a été utilisé puisque celui-ci peut être clivé lors de l'étape d'hydrolyse en milieu acide. Ces transformations ont permis d'obtenir le phosphate **1.38** en suivant les mêmes étapes de synthèse qu'utilisées précédemment. Un protocole similaire utilisant l'acide D-pyroglutamique permet également d'obtenir les énantiomères **1.39** et **1.40**.

Les composés dérivés de la *trans*-4-hydroxy-D et L-proline (**1.20** et **1.22**) ont une meilleure activité anticancéreuse que ceux dérivés de l'acide pyroglutamique. De ce fait, des analogues phosphorés de **1.20** et **1.22** ont été synthétisés dans le but de voir l'influence de l'ajout d'un groupement phosphate polaire ainsi que l'influence d'un ester phosphorique sur l'activité biologique (**Figure 1.10**).

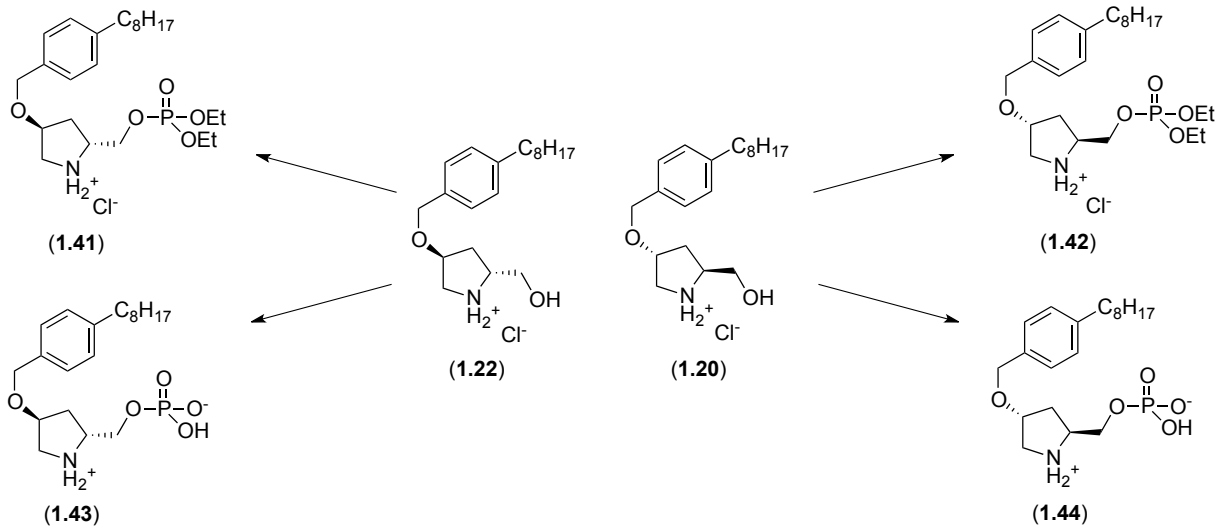


Figure 1.10. Structures des quatre isomères des analogues phosphorylés de la série des éthers benzyliques 4.

Les quatre analogues ont été synthétisés en utilisant la même stratégie, c'est-à-dire à partir de la *trans*-4-hydroxy-D- ou L-proline (**Schéma 1.7**). À partir de l'intermédiaire **1.33**, dont la synthèse a été présentée précédemment, on obtient différents esters phosphoriques. L'ester éthylique a été utilisé afin de former le composé **1.41**. Ceci permet de garder l'ester lors de la déprotection du carbamate en milieu acide.

Pour ce qui est de la synthèse du phosphate **1.43**, une alkylation de phosphite suivi de l'oxydation de ce phosphite permet d'obtenir l'ester **1.46** avec un rendement de 84 % qui lors de la déprotection en milieu acide donne le phosphate désiré (**1.43**). Tel qu'effectué lors des synthèses précédentes un protocole similaire utilisant la *trans*-4-hydroxy-L-proline permet d'obtenir les énantiomères **1.42** et **1.44**.

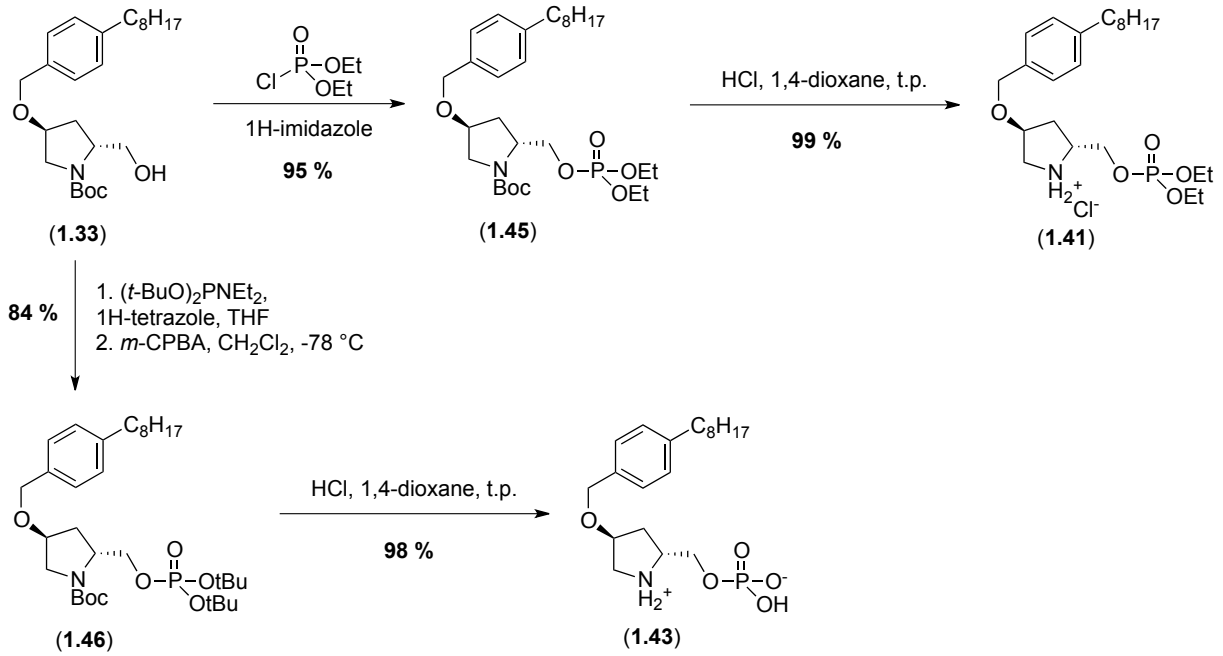


Schéma 1.7. Synthèses des analogues phosphorés **1.41-1.44** à partir de la *trans*-4-hydroxy-D et L-proline.

Ces isomères ont ensuite été testés contre des cellules de leucémie aigüe lymphoblastiques (SupB15) afin de pouvoir les comparer avec FTY720 et l'analogue rigide **1.22**. On observe une légère diminution de l'activité biologique de ces composés phosphorés comparativement aux analogues non phosphorés. Cette perte d'activité peut être dûe à deux facteurs. Le premier étant que le groupement phosphate est très polaire et que celui-ci empêcherait les molécules de pénétrer facilement dans la cellule, réduisant ainsi leur activité. La deuxième hypothèse est en lien avec la première. En effet, puisque les molécules seraient incapables de pénétrer dans la cellule, une phosphatase pourrait alors intervenir dans le processus en clivant le groupement phosphate installé sur les molécules. Celles-ci pourraient alors pénétrer la cellule, être de nouveau phosphorylées et retrouver une activité biologique. Ce processus entraînerait une diminution de l'activité biologique puisque le mécanisme d'action devrait passer par plusieurs étapes secondaires avant que la molécule atteigne le récepteur. Afin de prouver ces hypothèses, un analogue phosphoré non-clivable tel qu'un phosphonate devrait être synthétisé.

1.3.3 La conception et la synthèse de la série des phosphonates

En comparaison avec un groupement phosphate qui possède des liens consécutifs C-O-P, un phosphonate possède quant à lui des liens C-C-P. Cette fonction très polaire permet d'installer sur notre molécule un groupement très hydrophile qui augmentera grandement la solubilité de celle-ci. De plus, en supposant qu'une phosphatase intervienne dans le mécanisme d'action, ces phosphonates ne devraient pas être clivés dans la cellule. Nous pouvons ainsi obtenir une fonction imitant un phosphate, qui peut interagir avec les récepteurs sous une forme phosphorée. Précédemment, des analogues saturés de FTY720 portant un phosphonate ont été synthétisés sous forme racémique (**Figure 1.11**). Ces analogues possèdent une très grande affinité pour le récepteur S1P1. Étonnamment, les analogues **1.47 et 1.48** ont une affinité égale à celle des FTY720-phosphate.[27] C'est en 2009 que ces analogues ont été synthétisés de manière énantiopure par le groupe du Pr. Robert Bittman.[28-29] Cependant, les chercheurs rapportent une activité biologique ainsi qu'une affinité avec les récepteurs S1P comparable à celle du mélange racémique précédemment synthétisé.

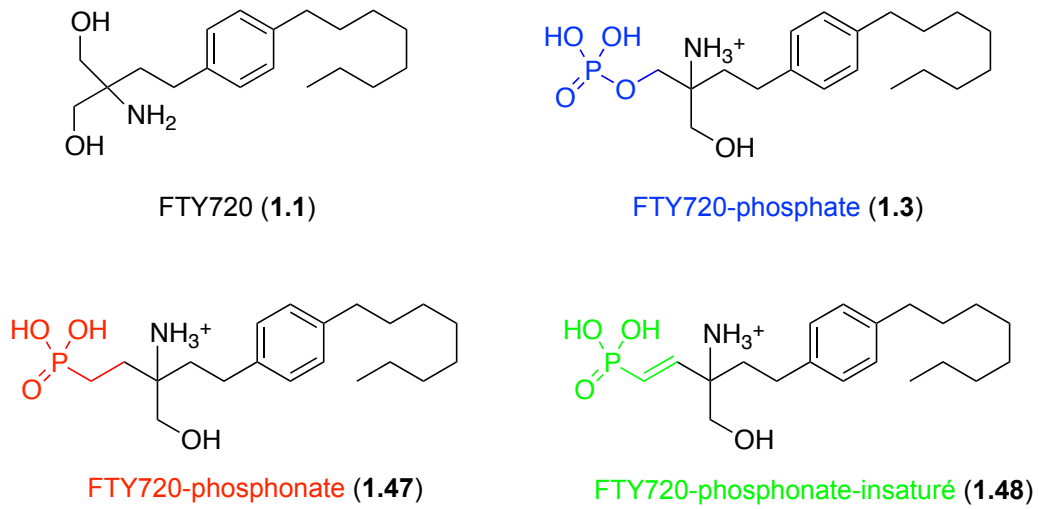


Figure 1.11. Structures des différents analogues phosphates et phosphonates de FTY720.

Sachant que les analogues rigides dérivés de la *trans*-4-hydroxy-D- et L-proline (**1.20** et **1.22**) possèdent une meilleure activité anticancéreuse que les analogues non-rigides dérivés de FTY720, la synthèse de deux séries de phosphonates rigides a été réalisée par l'auteur de ce mémoire afin de comparer leur effet sur les récepteurs S1P avec celui des phosphates **1.41**-**1.44** précédemment synthétisés. Quatres analogues portant soit un ester phosphonique (ester éthylique) ou un acide phosphonique dérivés des molécules **1.20** et **1.22** seront ainsi synthétisés. (**Figure 1.12**).

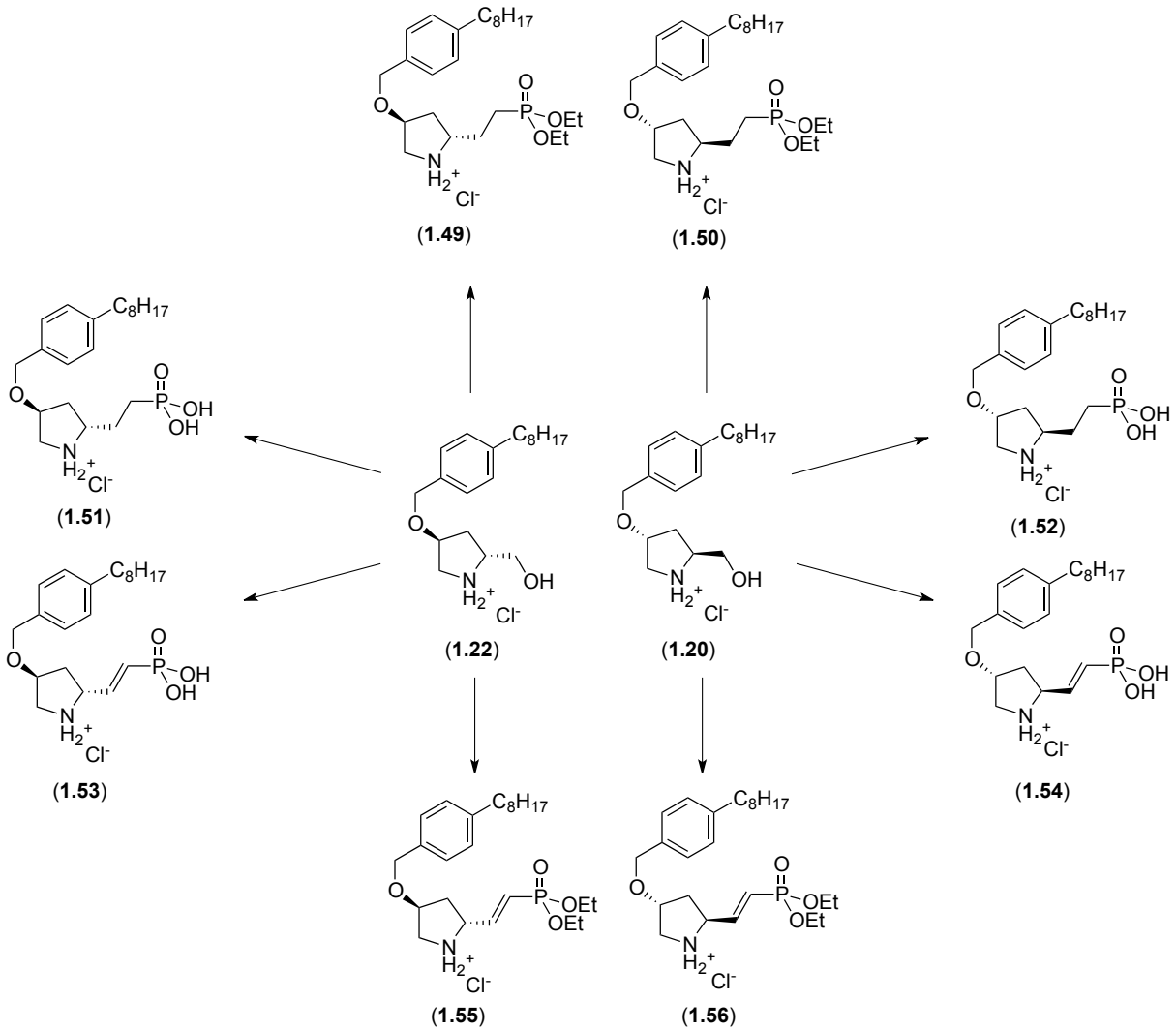


Figure 1.12. Structures des différents analogues rigides de FTY720 portant la fonction phosphonates (**1.49**-**1.56**).

La synthèse de ces analogues commence avec l'intermédiaire **1.33**, c'est à dire la version protégée sous forme de carbamate de la molécule **1.22** (**Schéma 1.8**). En traitant cet intermédiaire avec le periodinane de Dess-Martin, qui est un bon oxydant, on obtient l'aldéhyde **1.57** avec un rendement de 85-95%.

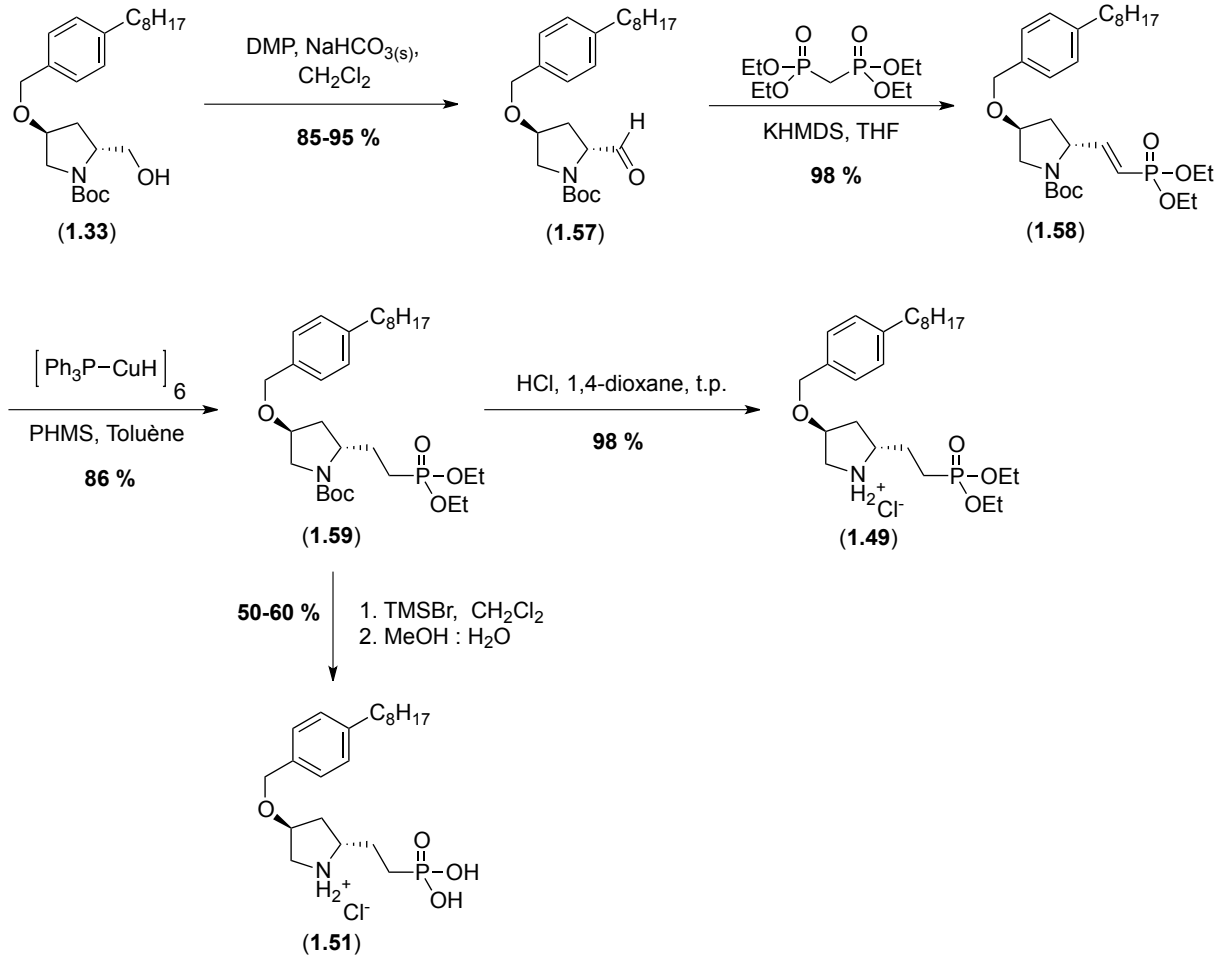
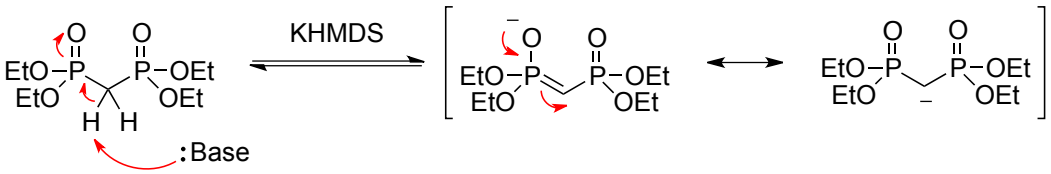


Schéma 1.8. Synthèses des analogues phosphorés **1.49-1.56** à partir de la *trans*-4-hydroxy-D et L-proline.

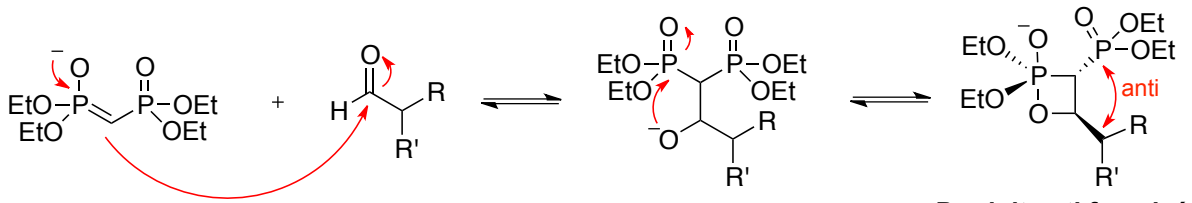
Cet aldéhyde est très réactif et susceptible à l'épimérisation du stéréocentre en alpha. Ceci dit, la réaction suivante se fait en présence d'une base forte, le KHMDS, ce qui pourrait entraîner une épimérisation. Heureusement pour nous, aucune épimérisation de l'aldéhyde a été observée après la réaction.

Déprotonation du tétraéthyle méthylènebis(phosphonate) :



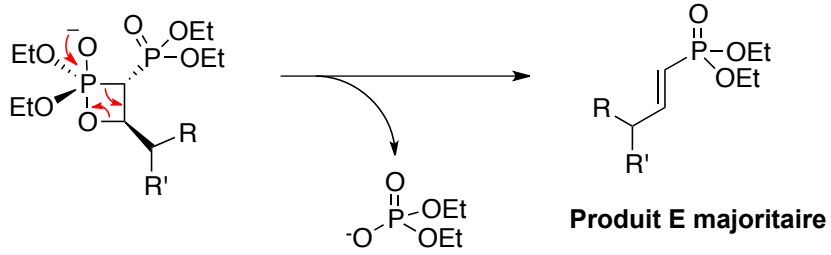
KHMDS = N,N-bis(triméthylsilyl)amidure de potassium

Attaque nucléophile de type 2 sur l'aldéhyde et formation de l'oxaphosphétane :



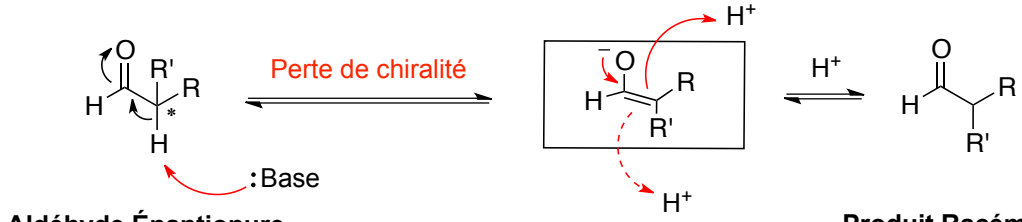
Produit anti favorisé

Élimination irréversible et formation de l'alcène désiré :



Produit E majoritaire

Réaction secondaire indésirable :



Aldéhyde Énantiopure **Produit Racémique**

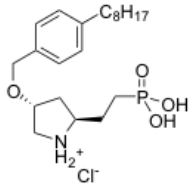
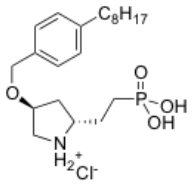
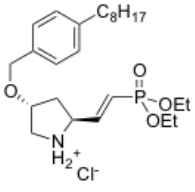
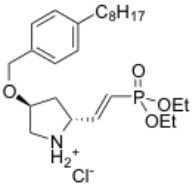
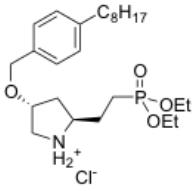
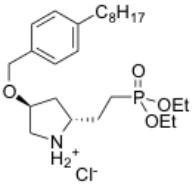
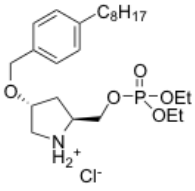
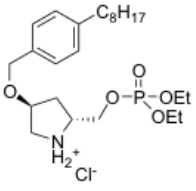
Schéma 1.9. Mécanisme de la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons.

Ensuite, une réduction-1,4 de l'alcène à l'aide d'un hydrure de cuivre nous permet d'obtenir le composé saturé **1.59**. Les réactions de réduction à l'aide de l'hydrure de cuivre sont très sensibles et sont dépendantes de la qualité du catalyseur utilisé. Les résultats de cette

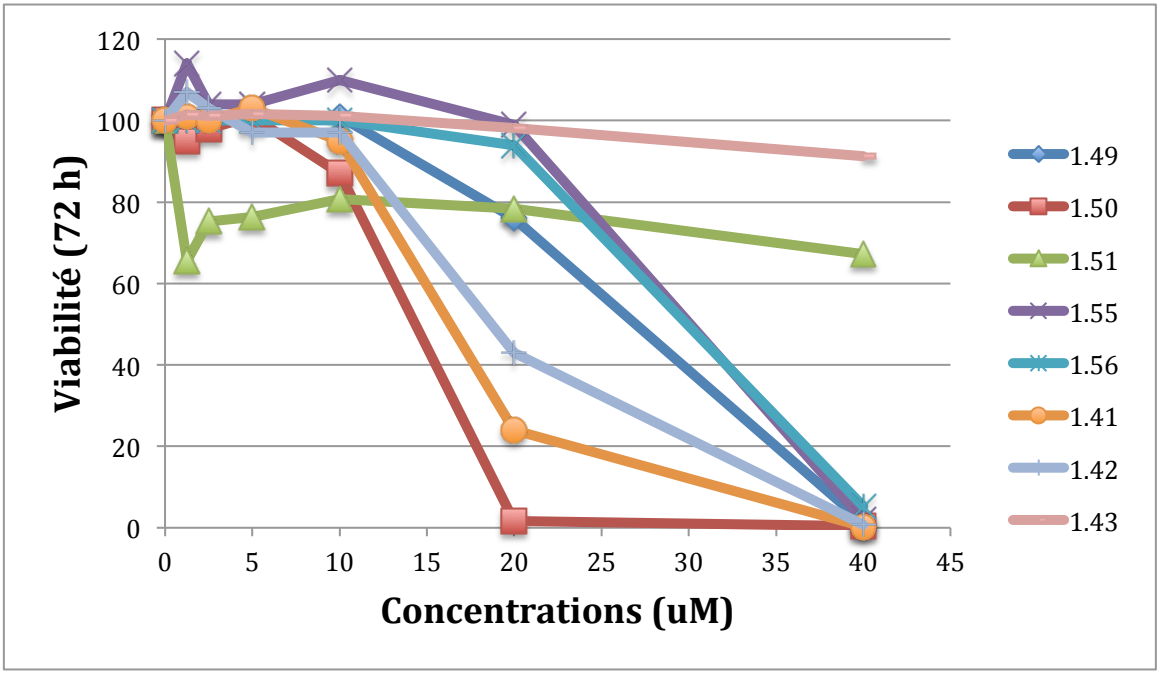
réaction sont donc très variables d'une fois à une autre. Afin de contrer ce problème, un excès (10 équivalents) de polyméthylhydrosiloxane (PHMS), un polymère possédant plusieurs liens Si-H (silane), est ajouté au mélange. Cet excès de H^- nous permet de régénérer le catalyseur plus rapidement et ce directement dans le milieu réactionnel; augmentant ainsi considérablement la reproductibilité de la réaction. La réduction de l'alcène a également été réalisée dans des conditions d'hydrogénation (H_2/Pd/C), mais l'hydrogénolyse de l'éther benzylique a aussi été observé.

À la suite d'une réaction de déprotection du carbamate en milieu acide nous obtenons les éthers phosphoniques **1.49**, **1.50**, **1.55** et **1.56**. Afin d'obtenir les acides phosphoniques correspondantes, une étape d'hydrolyse en présence d'un acide de Lewis (TMSBr) est nécessaire. Par la même occasion, l'acide généré lors de cette réaction est suffisant afin de déprotéger le carbamate et ainsi nous donner les composés **1.51**-**1.54** en une seule étape. Un traitement à l'acide chlorhydrique est nécessaire afin d'obtenir le produit sous forme de sel de chlorure. Le contre ion de la molécule ne devrait pas affecter les résultats biologiques puisque plusieurs anions interchangeables sont présents dans le corps humain. Toutefois, ce contre ion peut affecter la solubilité de la molécule. Il est donc important de faire le sel de chlorure pour tout les composés afin d'homologuer et de standardiser les résultats biologiques.

Tableau 1.1. Activité (IC_{50}) des composés phosphates/phosphonates sur des cellules cancéreuses (SupB15).

 (**1.52**)	 (**1.51**)	 (**1.56**)	 (**1.55**)
inactif	**inactif**	**28.1µM**	**25.9µM**
 (**1.50**)	 (**1.49**)	 (**1.42**)	 (**1.41**)
8.2µM	**15.2µM**	**18.2µM**	**15.5µM**

Ces isomères ont ensuite été testés par A. McCracken, une biologiste à l'université de Irvine en Californie dans le groupe du Pr. Edinger, contre des cellules de leucémie aigüe lymphoblastiques (SupB15) afin de pouvoir les comparer avec les résultats obtenus pour les phosphates. Les composés **1.51-1.54** ne démontrent aucune activité anticancéreuse. Pourtant, les composés **1.49**, **1.50**, **1.55** et **1.56** possède une activité anticancéreuse comparable à celle observée pour les phosphates. Il y a également une légère augmentation de l'activité pour les composés saturés en comparaison avec les composés insaturés.



Graphique 1. Viabilité (72 h) en fonction de la concentration des molécules sur des cellules SupB15.

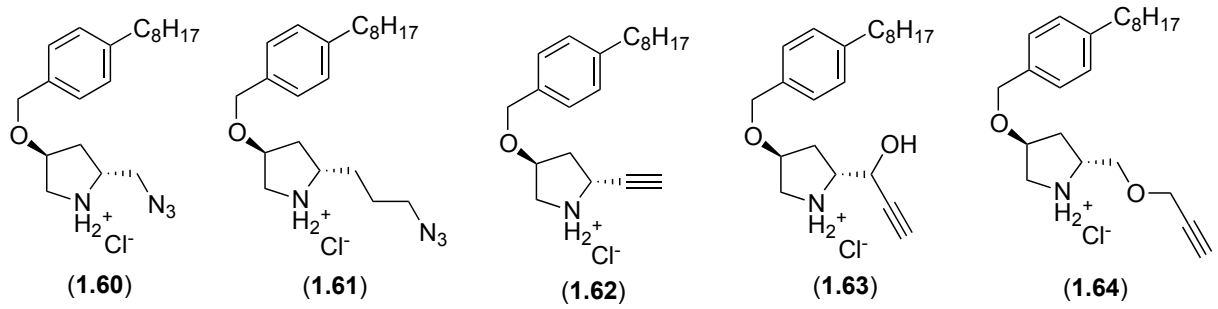
Nous pouvons donc conclure que les acides phosphoniques tel **1.51**, ne pénètrent pas les parois de la cellule dûe à leur grande polarité menant à une activité anticancéreuse très faible représentée sur le **graphique 1**. En comparaison, les acides phosphoriques sont aussi polaires et donc nous pouvons affirmer qu'une phosphatase est belle et bien impliquée dans le mécanisme d'action afin de permettrent à ces molécules de pénétrer la paroi cellulaire. Ceci dit, les analogues portant un groupement phosphate doivent d'abord passer par le clivage du lien O-P afin de pénétrer dans la cellule où ils seront phosphorylés de nouveau. Cependant, nous ne pouvons pas tirer la même conclusion pour les composés portant un ester puisque

ceux-ci ont probablement la capacité de pénétrer les parois cellulaires et agir en tant qu'agents mimétiques de la FTY720-phosphate.

1.4 La synthèse d'analogues comportant différentes fonctions

1.4.1 L'effet des groupements azotures et alcynes sur l'activité biologique des analogues

Ne sachant pas la nature du récepteur et en vue d'impliquer ces molécules dans un processus de bioconjugaison afin de tenter d'isoler une ou plusieurs protéines cibles à l'aide de la chimie clic, différents analogues portant la fonction azoture (**1.60** et **1.61**) ainsi que la fonction alcyne (**1.62**-**1.64**) ont été synthétisés. L'activité anticancéreuse de ces analogues se évaluée, afin de déterminer l'effet de l'ajout de ces fonctions.



(**1.60**) (**1.61**) (**1.62**) (**1.63**) (**1.64**)

Figure 1.13. Structures des différents analogues rigides de FTY720 portant la fonction azoture ou alcyne.

La synthèse des analogues portant un groupement azoture commence avec l'intermédiaire **1.33**, c'est-à-dire la version protégée sous forme de carbamate de la molécule **1.22**. Cet alcool peut par la suite être transformé en groupement partant (**OGP**) via différentes méthodologies. Celui-ci est par la suite remplacé par un azoture ($\mathbf{N_3}$) via une réaction de substitution nucléophile de type 2 (S_N2).

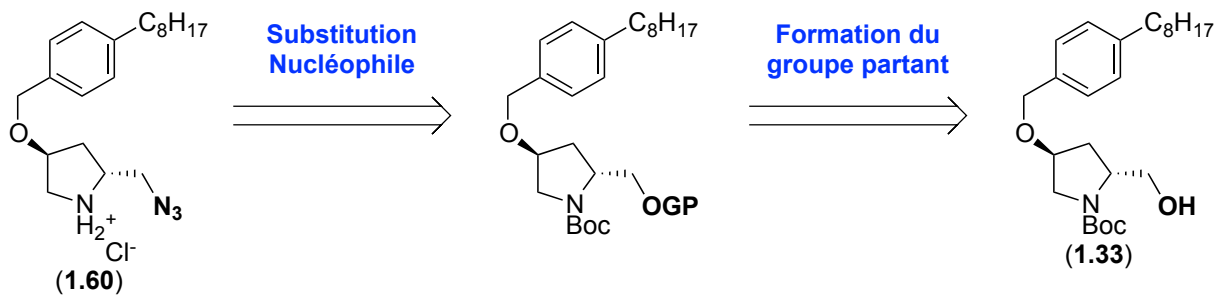


Figure 1.14. Analyse rétro-synthétique pour la synthèse des azotures à courte chaîne.

Tel que mentionné ci-dessus, la synthèse des analogues portant un groupement azoture commence avec l'intermédiaire **1.33**. Le groupement hydroxyle a d'abord été transformé en groupement partant triflate (OTf). Malheureusement, lors du traitement du triflate **1.65** avec le nucléophile, la formation du carbamate cyclique **1.66** est observée. Le triflate est un groupement beaucoup trop réactif et une cyclisation intramoléculaire peut être observé lorsque celui-ci est mis en solution.

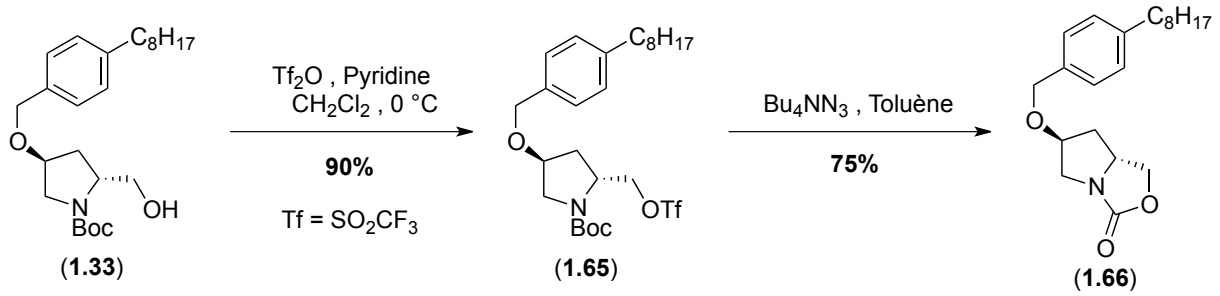


Schéma 1.10. Synthèse et réactivité du composé triflate (**1.65**).

Afin de palier à ce problème, un groupement partant moins réactif, c'est-à-dire un tosylate (OTs) a été installé sur la molécule. Lorsque celui-ci est traité avec le nucléophile, une réaction de substitution est observée et l'azoture **1.68** est isolé. Une réaction de déprotection du carbamate en milieu acide permet ensuite d'obtenir l'azoture **1.60**.

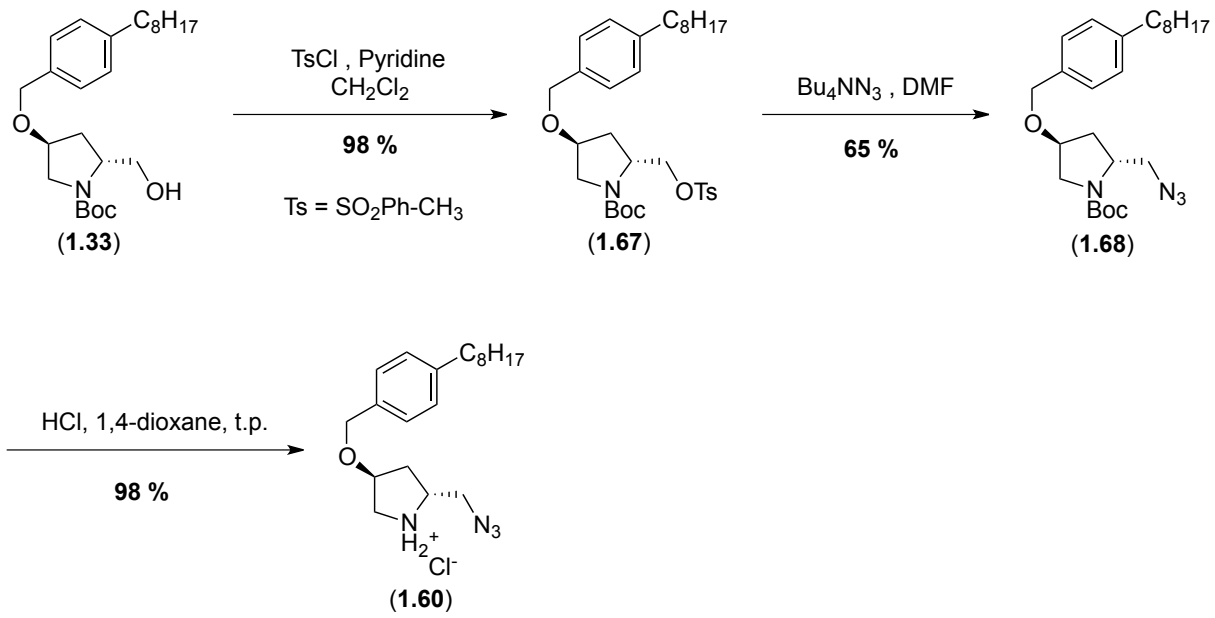


Schéma 1.11. Synthèse du composé **1.60** et réactivité du tosylate **1.67**.

Pour ce qui est de la formation de l'azoture à longue chaîne (**1.61**), une réaction de Wittig doit d'abord être effectuée sur l'aldéhyde **1.57** afin de permettre d'homologuer la molécule de 2 carbones. Par la suite, des réactions d'hydrogénation de la double liaison et de réduction de l'ester permettrons d'obtenir l'alcool primaire homologué qui pourra par la suite être transformé en azoture via la même stratégie que pour l'analogue à courte chaîne **1.60**.

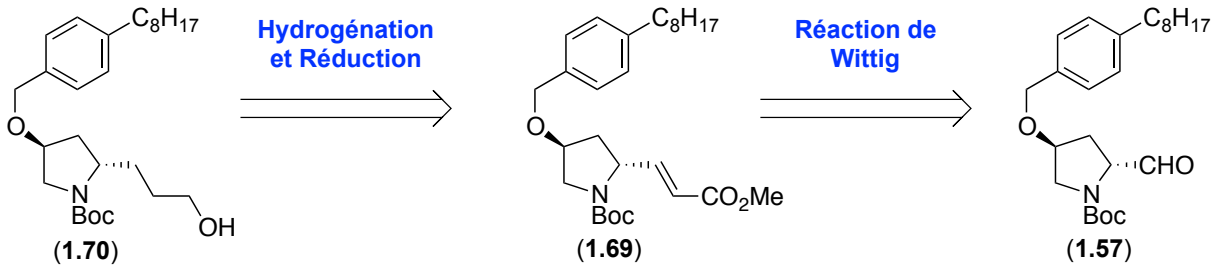


Figure 1.15. Analyse rétro synthétique pour la synthèse des azotures à longue chaîne.

Tel que mentionné ci-dessus, la synthèse des analogues à longue chaîne commence avec une réaction de Wittig sur l'aldéhyde **1.57** afin d'homologuer la molécule et de former l'ester α,β−insaturé **1.69**. Une réaction d'hydrogénation de la double liaison permet d'obtenir l'ester saturé qui est ensuite réduit à l'aide d'un hydrure de lithium aluminium afin d'obtenir

l'alcool primaire homologué **1.70**. En suivant le protocole établit, l'azoture **1.61** est obtenu via substitution nucléophile du tosylate **1.71**.

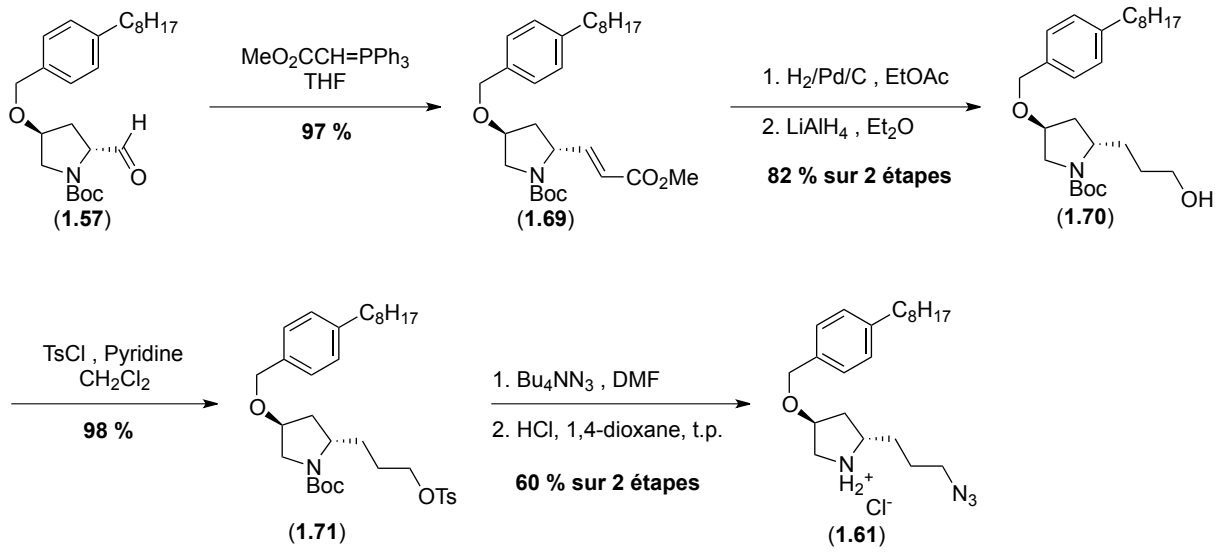


Schéma 1.12. Synthèse de l'azoture à longue chaîne **1.61**.

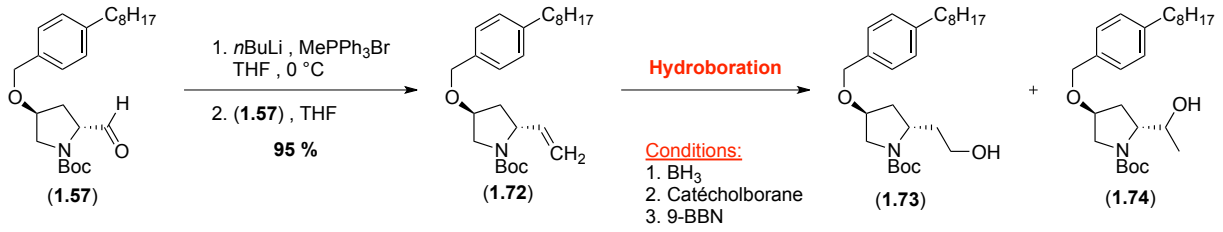


Schéma 1.13. Synthèse de l'azoture à chaîne intermédiaire **1.73**.

Pour ce qui est de la formation de l'azoture à chaîne intermédiaire, une réaction de Wittig doit d'abord être effectuée sur l'aldéhyde **1.57** afin de permettre d'homologuer la molécule d'un carbone. Une réaction d'hydroboration pourra ensuite être effectuée afin d'obtenir l'alcool primaire qui pourra être transformé en azoture selon le protocole établi. Malheureusement, la réaction d'hydroboration a mené à l'obtention d'un mélange des régio-isomères **1.73** et **1.74** en proportion 1:1 et ce même en présence de borane très encombré tel que le catécholborane et le 9-BBN (9-borabicyclo[3.3.1]nonane). Étant donné la difficulté à séparer les isomères cette méthode de synthèse a été mise de côté.

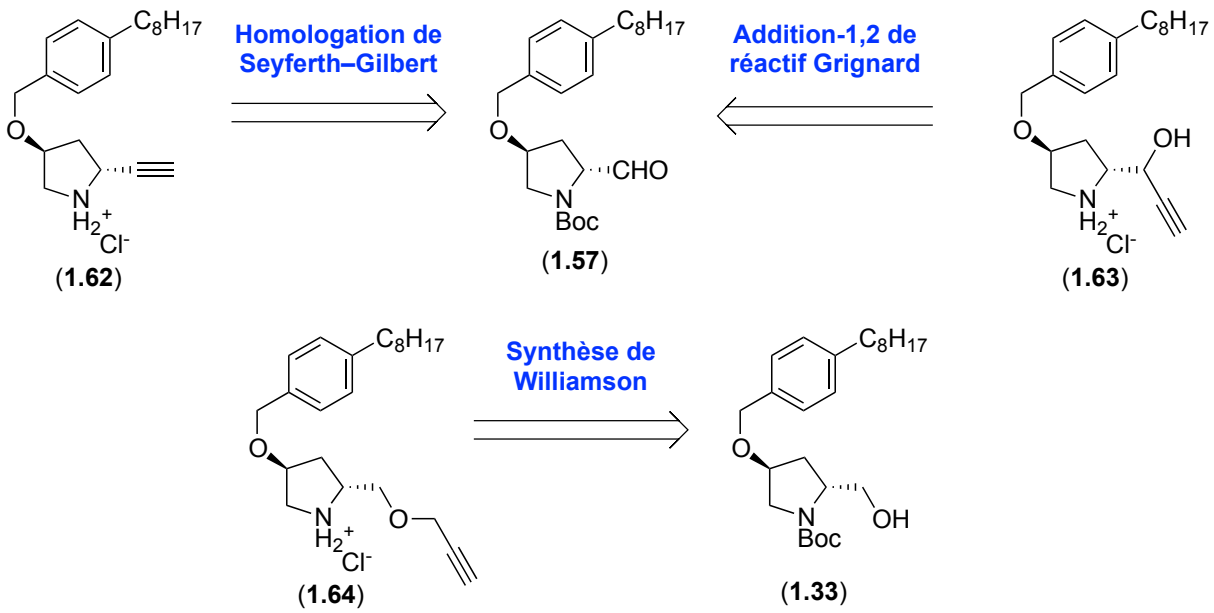


Figure 1.16. Analyse rétro synthétique pour la synthèse des différents analogues portant un alcyne.

La synthèse des analogues portant un groupement alcyne commence avec l'intermédiaire **1.57** (aldéhyde) ou l'intermédiaire **1.33** (alcool primaire) (**Figure 1.16**). Une réaction d'homologation sur l'aldéhyde **1.57** (**Schéma 1.14**) conduit au composé **1.75** qui est par la suite déprotégé afin de former l'alcyne **1.62**.

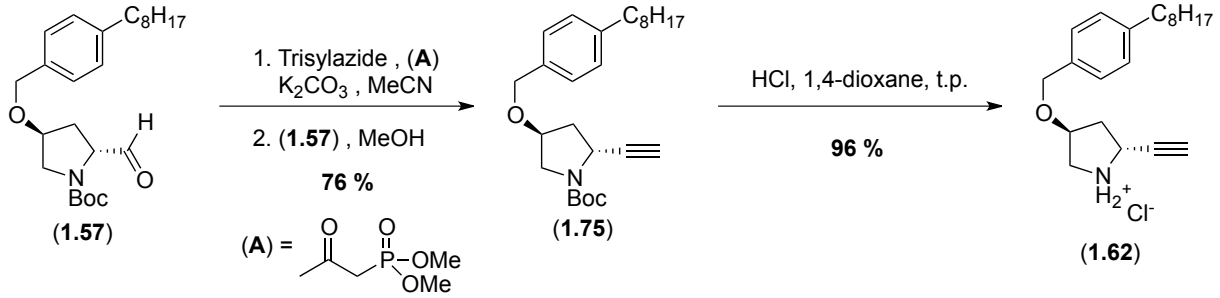


Schéma 1.14. Synthèse de l'alcyne **1.62**.

L'addition-1,2 d'un réactif de grignard sur l'aldéhyde **1.57** donne le composé **1.76**. Les diastéréoisomères sont séparés par chromatographie éclair. Ceux-ci sont ensuite déprotégés afin de former les alcynes **1.63** (**Schéma 1.15**). La détermination de la configuration absolue

de ces alcools secondaires n'a jamais été effectuée puisque ces deux entités sont biologiquement inactives ce qui est très surprenant considérant la similitude avec le composé **1.22**.

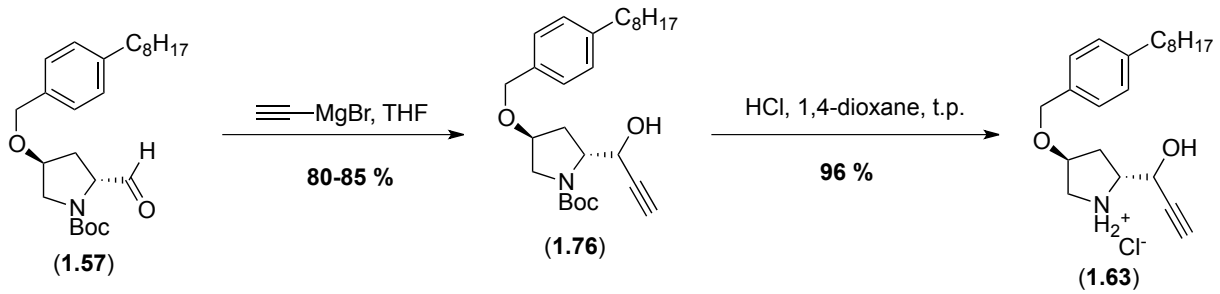


Schéma 1.15. Synthèse de l'alcyne **1.63**.

L'alcool **1.33,** quant à lui, est transformé en l'éther propargylique **1.77** via une éthérification de type Williamson.[32-33] Cet éther est par la suite déprotégé en milieu acide afin de former l'alcyne **1.64** (**Schéma 1.16**).

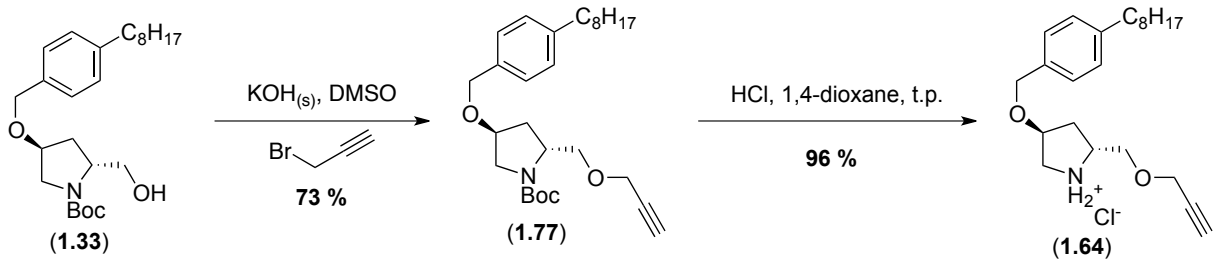


Schéma 1.16. Synthèse de l'éther propargylique **1.64**.

Ces isomères de fonction ont ensuite été testés contre des cellules de leucémie aigüe lymphoblastiques (FL5.12) afin de pouvoir les comparer avec les résultats obtenus pour FTY720. Ces tests vous sont résumés dans la **Figure 1.17**.

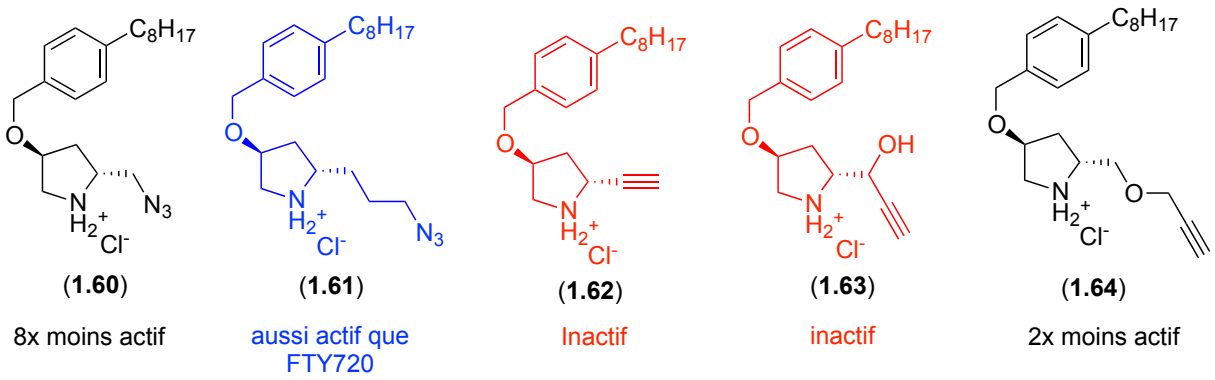
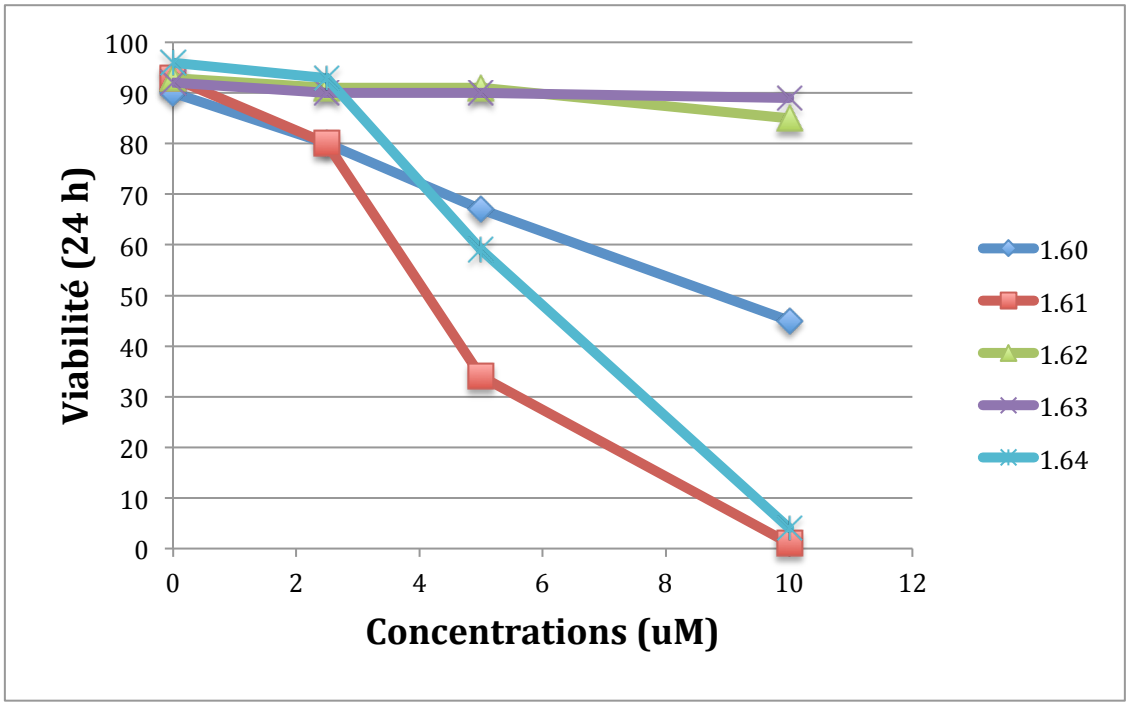


Figure 1.17. Activité (viabilité) des composés **1.60-1.64** contre des cellules lymphoblastiques (FL5.12).

À partir de ces résultats, réalisés par la biologiste A. McCracken, deux candidats potentiels ont été retenus en prévision du projet de ciblage et d'isolation du récepteur dû à leur activité biologique semblable à celle observée avec FTY720, c'est-à-dire les composés **1.61** et **1.64**. Toutefois, de part sa simplicité de synthèse (2 étapes à partir de l'alcool primaire) le modèle **1.64** sera utilisé pour des projets futurs (**section 2.4**), malgré le fait que celui-ci soit légèrement moins actif.



Graphique 1.2. Viabilité sur 24h en fonction de la concentration des molécules sur des cellules FL5.12.

1.4.2 L'effet des groupements alcools sur l'activité biologique des analogues

Encore une fois, ne sachant pas la nature du récepteur de notre molécule, plusieurs analogues comportant une fonction alcool (**1.78**-**1.81**) ont été synthétisés afin d'avoir une idée générale de l'effet de la structure des molécules sur le site actif du récepteur. Malencontreusement, tous les composés ci-dessous, mis à part la molécule **1.78**, s'avèrent à être moins actifs que FTY720 lorsque testés contre des cellules de leucémie aigüe lymphoblastiques (FL5.12).

Toutefois, il est important de noter que la perte de l'amine secondaire libre sur le composé **1.80** ne mène pas à la disparition totale de l'activité biologique. En effet, cette molécule garde toujours une activité, même si celle-ci s'avère être 4 fois plus petite que celle observée pour FTY720. Il est également important de noter que l'activité est grandement perdue lors de l'ajout d'un simple méthyle (composé **1.81**) sur la molécule. Ces résultats, bien que surprenants, sont en accord avec ceux observés pour le composé **1.63**.

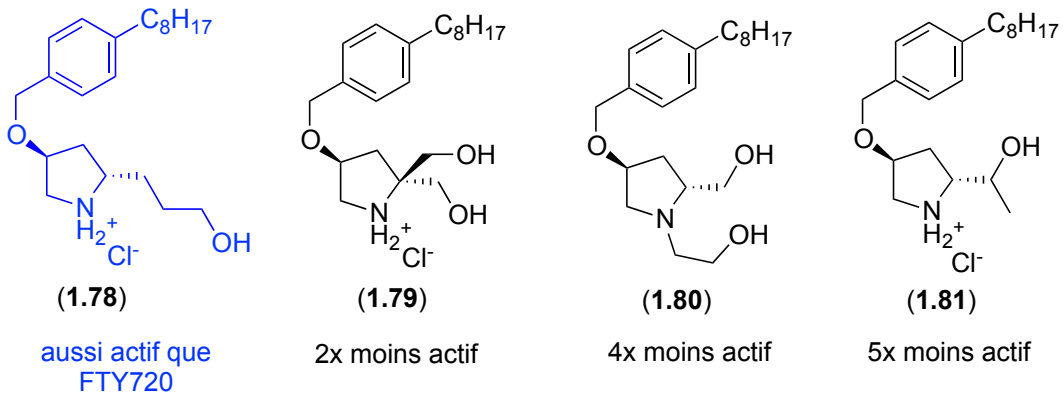
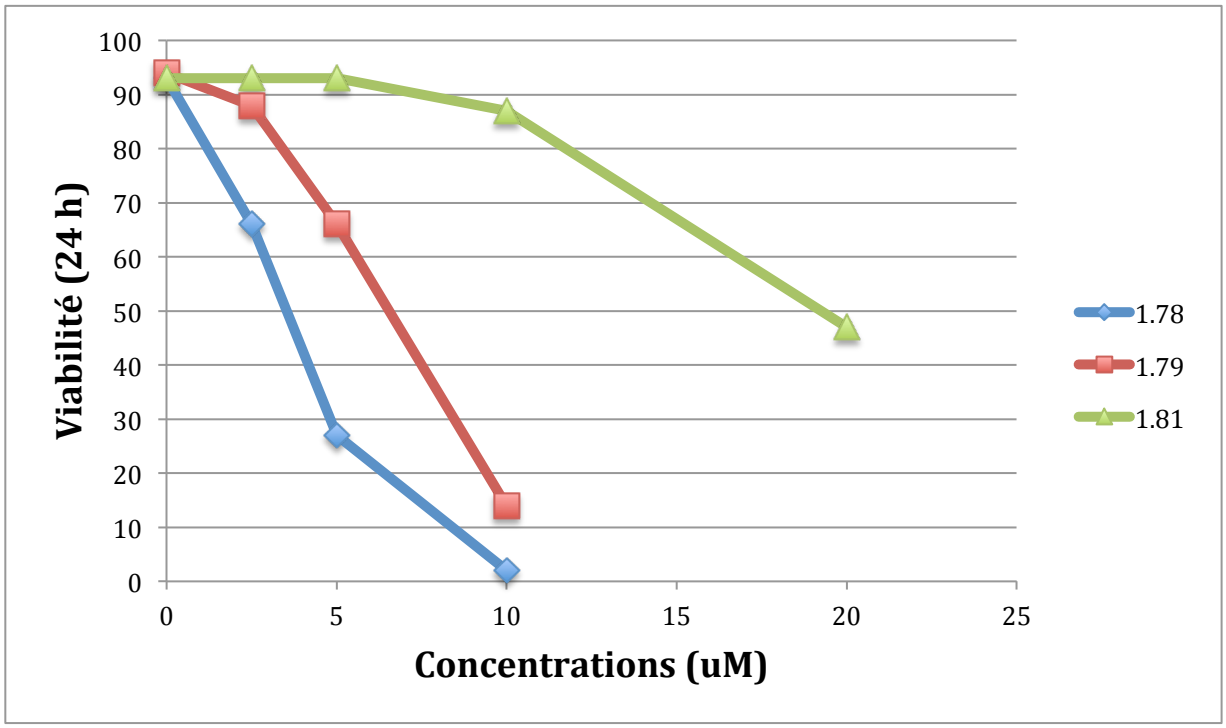


Figure 1.18. Structures et activité biologique des différents analogues portant une fonction alcool.



Graphique 1.3. Viabilité sur 24h en fonction de la concentration des molécules sur des cellules FL5.12.

1.5 Conclusions générales et perspectives

L'objectif de cette partie de ce mémoire était d'abord de démystifier le mécanisme biologique dans laquelle la molécule **1.22** est impliquée. Bien que plusieurs questions aient été éclaircies avec la synthèse des composés phosphorés, plusieurs phénomènes, tel que l'effet sur l'activité biologique de la conformation des analogues restent inexplicables. De ce fait, les travaux portant sur le ciblage et l'isolation de la protéine désirée via liaison d'une molécule photo-active au récepteur qui seront décrits dans le chapitre suivant pourraient mettre en lumière ces phénomènes que nous ne pourrions expliquer autrement. L'objectif secondaire était de synthétiser et d'optimiser la synthèse de la molécule **1.22**.

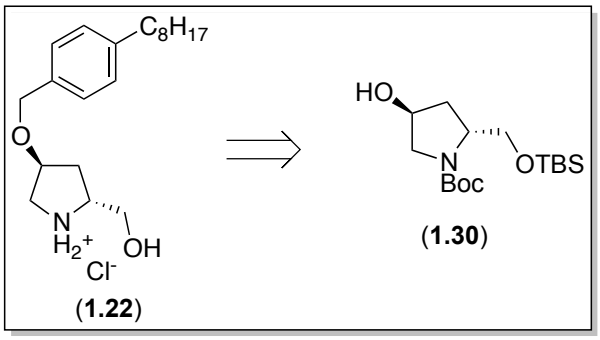


Figure 1.19. Synthèse optimisée de l'éther benzylique **1.22**.

Le développement d'une nouvelle stratégie a permis de synthétiser le composé **1.30** en cinq étapes avec un rendement globale de 68% et ce en partant de la *cis*-4-hydroxy-D-proline un composé beaucoup plus abordable que la *trans*-4-hydroxy-D-proline. Au final, cette méthodologie a permis, en collaboration avec Cuttle Pharmaceutical, de produire plus de 10 grammes de composé **1.22** et ainsi de pousser les tests biologiques à des études *in vivo* sur les souris. Les résultats de ces études se font attendre avec beaucoup d'impatience puisqu'ils permettront de déterminer si la molécule **1.22** pourrait un jour être utilisée sur les humains. Finalement, de nouvelles études qui ne sont toujours pas publiées ont été effectuées par Pr. Edinger. Celles-ci démontrent que la sphingosine posséde la capacité de former des vacuoles sur les cellules cancéreuses sans toutefois les détruire. Ce phénomène n'est toutefois pas observé de manière aussi significative avec la sphinganine. Les travaux futurs porteront sur la synthèse de nouvelles séries d'analogues (**Figure 1.20**) possédant différentes chaînes basées

sur la sphingosine et la sphinganine afin d'analyser l'influence de celles-ci sur la formation de vacuoles.

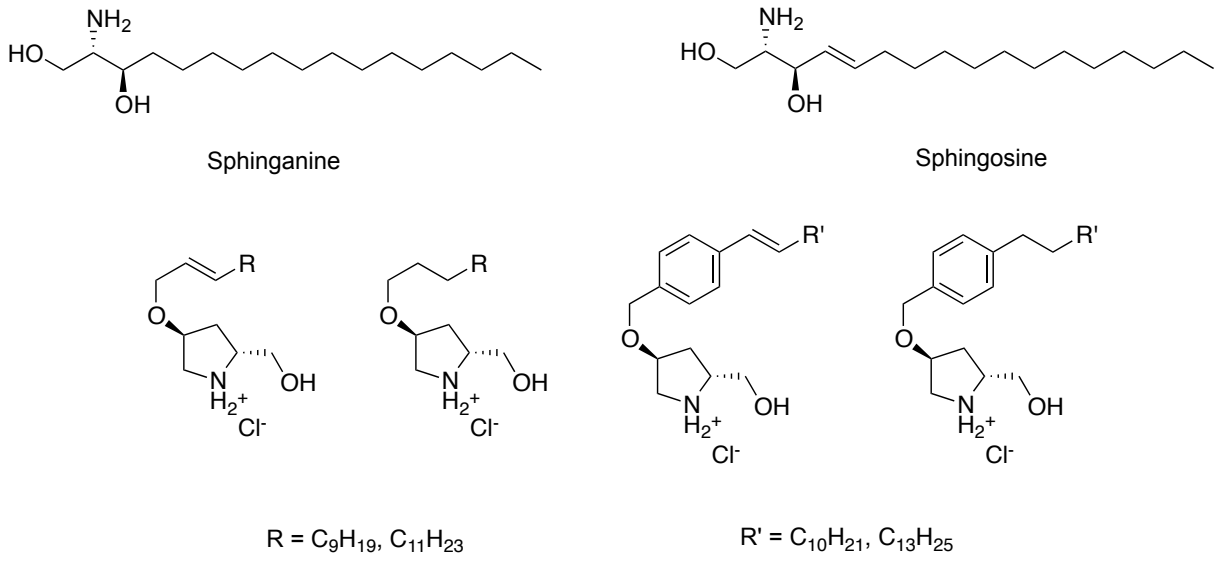


Figure 1.20. Structures des nouvelles séries basées sur la sphingosine et la sphinganine.

1.6 Références

(1) Confavreux C. ; Vukusic S. ; *Clin. Neurol. Neurosurg.* **2006**, 108, 327–332.

(2) a) Fujita T. ; Chiba K. ; *J. Antibiot*. **1994**, 47, 208-215 ; b) Adachi K. ; Fujita T. ; *Bioorg. Med. Chem.Lett.* **1995**, 5, 853–56.

(3) a) Adachi K. ; Chiba K. ; *Perspect. Medicin. Chem*. **2007**, 1, 11–23 ; b) Review : Brinkmann, V. ; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, 9, 883–897 ; c) Review : Strader C. R. *et al*. ; *J. Nat. Prod.* **2011**, 74 (4), 900–907.

(4) Billich A. ; Bornancin F. ; *J. Bio. Chem.* **2003**, 278, 48, 47408–47415.

(5) Brinkmann, V. ; Lynch, K. R. ; *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 21453–21457.

(6) Mandala S. ; Rosen H. ; *Science 2002*, 296, 346–349.

(7) Brinkmann V. ; Cyster J. G. ; *Am. J. Transplant*. **2004**, 4, 1019.

(8) Mcverry B. J. ; Garcia J. G. ; *Cell Signal*. **2005**, 17, 131.

(9) Lee T. K. *; Clin. Cancer Res*. **2005**, 11, 8458− 8466.

(10) Azuma H. ; Katsuoka Y. ; *Clin. Cancer Res.* **2002**, 62, 1410−1419.

(11) Chua C. W. ; Wong, Y. C. ; *Int. J. Cancer* **2005**, 117, 1039−1048.

(12) Azuma H. ; Katsuoka Y. ; *J. Urol.* **2003**, 169, 2372−2377.

(13) Neviani P. ; *J. Clin. Invest*. **2007**, 117, 2408−2421.

(14) Sanna M. G. ; Rosen H. *J. ; Biol. Chem*. **2004**, 279, 13839−13848.

(15) Romero Rosales K. ; Edinger A. L. ; *Biochem. J*. **2011**, 439, 299−311.

(16) Hanessian S. ; Charron G. ; *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2007**, 17, 491−494.

(17) *The "Chiron" Approach*, S. Hanessian, Pergamon Press, Oxford, UK, **2013.**

(18) Gilman H. ; Jones R. G. ; Woods L. A. ; *J. Org. Chem.* **1952**, 17, 12, 1630–1634.

(19) Grubbs R. H. ; *Tetrahedron* **2004**, 60, 7117 ; R. Roy, S. K. Das, *Chem. Commun.* **2000**, 519 – 529.

(20) Ettmayer P.; Nussbaumer P. ; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 1555.

(21) Kiuchi M. ; Chiba K. ; *Bioorg. Med. Chem*. **2005**, 13, 425

(22) Hanessian S. *; Fransson R. ; McCracken A. ; Edinger A.* ; *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, 4, 969−973

(23) Suzuki A. *; Miyaura N.* ; *Chemical Reviews, **1995,*** 95, (7): 2457–2483.

(24) Kumara Swamy K. C. ; Pavan Kumar K. V. P. ; *Chem. Rev*. **2009**, 109, 2551–2651.

(25) Mullershausen F. ; Seuwen K. ; *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 428 – 434.

(26) Hale J. J. ; Mandala S. ; *Bioorg. Med. Chem*. **2004**, 12, 4803–4807.

(27) Kiuchi M. ; *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 425–432.

(28) Mandala S.; Rosen H. ; *Science* **2002**, 296, 346–349.

(29) Lu X. ; Bittman R. ; *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 8, 3192–3195.

(30) Boutagy J. ; Thomas R. ; *Chem. Rev.* **1974**, *74*, 87.

(31) Wadsworth W. S. ; *Org. React.* **1977**, *25*, 73.

(32) A. W. Williamson ; « *Theory of Etherification* », *Philos. Mag.*, vol. 37, 1850, p. 350-356.

(33) Burke S. ; Marvin C. ; Voight E. ; *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5357.

Chapitre 2 : Ciblage et isolation du récepteur impliqué via liaison d'une molécule photo-active

2.1 La chimie bio-orthogonale

2.1.1 Le concept de bio-orthogonalité

Les chimistes ont de plus en plus d'intérêt à développer des méthodes afin d'étudier les molécules et leurs interactions avec les récepteurs biologiques dans leur milieu naturel. Récemment, de nouvelles innovations dans le domaine des protéines fluorescentes génétiquement codées ont prouvé leur utilité dans le domaine scientifique se voyant octroyer le Nobel de chimie en 2008.[1a-b] Toutefois, plusieurs molécules biologiquement actives, telles que les protéines et les lipides, ne peuvent pas être analysées en utilisant cette méthode de fluorescence, d'où l'utilité de la chimie bio-orthogonale.

Le terme chimie bio-orthogonale caractérise une réaction entre deux entités (groupements fonctionnels) qui se produit dans le corps humain sans interférer avec le milieu biologique et/ou les processus biologiques étudiés (**Figure 2.1**). Ce processus nous permettra de former un lien entre une molécule portant une sonde (bleu) et un groupement fonctionnel spécifique (vert) présent sur notre substrat (rouge) lié au récepteur (gris), afin de sonder/analyser une réaction chimique se produisant dans le corps humain ou afin d'isoler le récepteur. Ce processus est généralement précédé d'une réaction afin de lier le substrat (ligand) de manière irréversible au récepteur. Une réaction bio-orthogonale se doit donc de résister aux conditions chimiques du corps humain rendant ce domaine de la chimie très restreint par rapport aux types de réactions pouvant être utilisées.

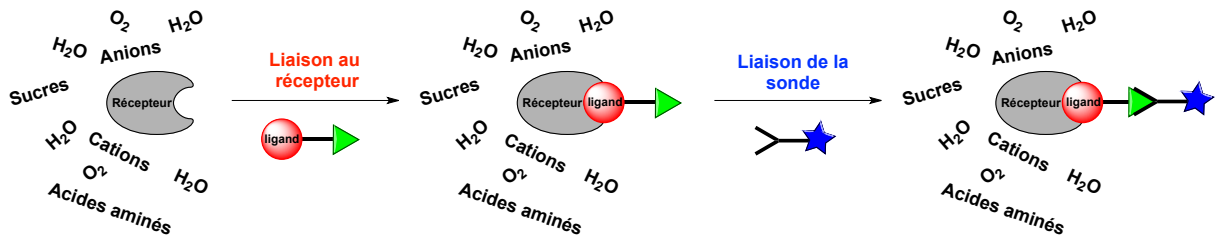


Figure 2.1. Illustration du principe général de bio-orthogonalité.

En effet, une cellule ou un organisme vivant contient de l'eau, de l'oxygène, des protéines, des graisses, des sucres, des ions inorganiques et plusieurs autres constituants pouvant intervenir dans le processus rendant le milieu incontrôlable et imprévisible par rapport à un milieu réactionnel en chimie organique classique où tous les paramètres (solvant, atmosphère inerte, etc.) sont méticuleusement contrôlés afin d'optimiser les chances de réussite de la réaction.

Ceci dit, une réaction bio-orthogonale doit également avoir une vitesse de réaction très élevée afin d'optimiser sa réactivité puisque les deux groupements fonctionnels se retrouveront à de très faible concentration in vivo.[2] Une cinétique rapide nous permettra également d'éviter les réactions secondaires indésirables. Le défi des chimistes est donc de trouver des réactions sélectives et reproductibles qui peuvent s'effectuer dans l'eau et se sans interférer avec le milieu intracellulaire.

2.2 La recherche de la réaction bio-orthogonale idéale

2.2.1 Réactions impliquant une modification directement sur la protéine

La chimie bio-orthogonale a beaucoup évoluée depuis plusieurs années. Alors que celle-ci servait principalement de méthode de caractérisation afin de déterminer la composition de la molécule, cette méthodologie est désormais reconnue comme une manière très puissante afin de déterminer les divers mécanismes se déroulant dans la cellule.

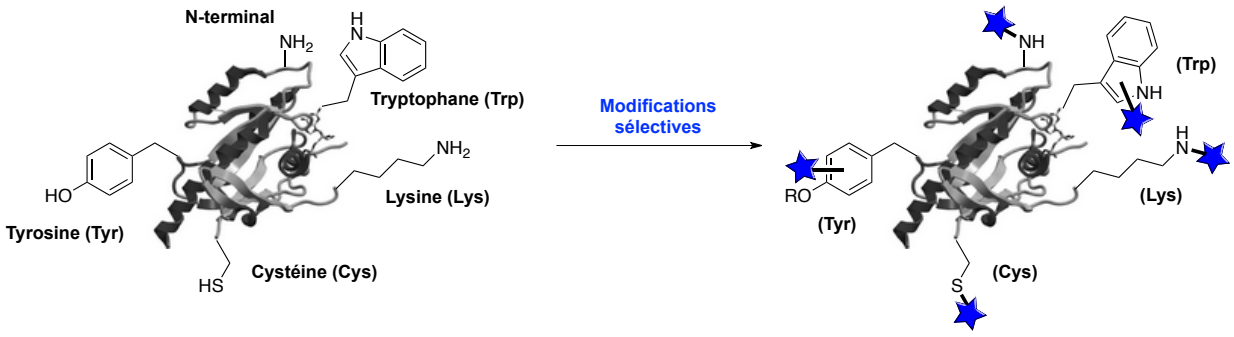


Figure 2.2. Modifications des différent acides aminés (Cys, Lys, Trp, et Tyr) et de la fonction N-terminale.

Les méthodes classiques qui sont utilisées depuis plusieurs années et qui, encore aujourd'hui, sont abondamment utilisées dans la chimie médicinale, impliquent une modification sélective et directe d'une protéine.[3] De part leurs fonctions, les acides aminés cystéine (thiol) et lysine (amine primaire) sont les plus fréquemment modifiés. Ces deux fonctions sont, de manière générale, très versatiles et les chimistes possèdent plusieurs méthodes efficaces afin de les modifier. Les résidus de cystéine sont généralement modifiés via alkylation afin de former un thioéther. Des modifications afin de former un lien disulfure sont également très utilisées. Les résidus de lysines sont, quant à eux, transformés en amides, sulfonamides, urées ou thiourées. De simples réactions d'alkylation de l'amine ou une réaction d'amination réductrice avec un aldehyde nous permettent d'obtenir les différents produits désirés.

Plus récemment, de nouvelles avancées dans le milieu ont permis la modification sélective des résidus cysteine, lysine, tyrosine, tryptophane ainsi que les résidus N-terminaux de certains acides aminés. La lysine est principalement modifiée par une réaction d'amination réductrice en utilisant un hydrure d'iridium comme agent réducteur.[4] La cystéine est modifiée par une procédure de marquage en deux étapes qui implique d'abord la transformation de la cysteine en déhydro-alanine. Par la suite, cet intermédiaire peut effectuer une addition de Michael avec un thiol afin de former le produit désiré.[5] Ce produit peut également être obtenu par réaction photochimique.[6] La tyrosine peut être modifiée par couplage radicalaire à l'aide d'un nickel (II),[7] par une réaction de Mannich à trois compsante[8] ou par une reaction de pi-allylation catalysée au palladium.[9] Le tryptophane peut quant à lui être modifié en utilisant une réaction impliquant un carbénoïde de rhodium.[10]

Finalement, la modification de l'extrémité N-terminale peut être effectuée de plusieurs manières. Des réactions de *trans*-amination,[11-13] des réactions d'oxydation par le periodate de la sérine et la thréonine,[14] des réactions de Pictet-Spengler,[15] des réactions de formation d'une lactame bicyclique[16] ainsi que des réactions avec des réactifs de type thioester[17] peuvent être envisageables. La plupart de ces modifications impliquent un métal qui servira de catalyseur pour la réaction.[18-20] Cependant, la plupart de ces modifications se limitent à l'application *in*

vitro et ne peuvent pas être effectuées *in vivo* du à la présence abondante d'acides aminés dans les cellules.

2.2.2 L'application de la réaction de Staudinger en chimie bio-orthogonale

Afin de contrer le problème de sélectivité une nouvelle classe de réaction bio-orthogonale a été développée. En effet, afin d'éviter les réactions secondaires dans les cellules des réactifs contenant des entités (groupement fonctionnel) totalement absents du milieu étudié ont été utilisés. À cet effet, des réactifs à bases d'azoture ($-N_3$) ont été envisagés afin d'être appliqués en milieu cellulaire puisque ce groupement est complètement absent des systèmes biologiques.[21] De plus, ce groupement est relativement petit et peut donc être installé sur une molécule tout en interférant très peu sur la topologie de la molécule. Cet aspect est particulièrement important dans ce domaine puisqu'un groupement trop encombrant peut changer radicalement le mécanisme d'action de la molécule étudiée ou tout simplement rendre la molécule inactive au récepteur.

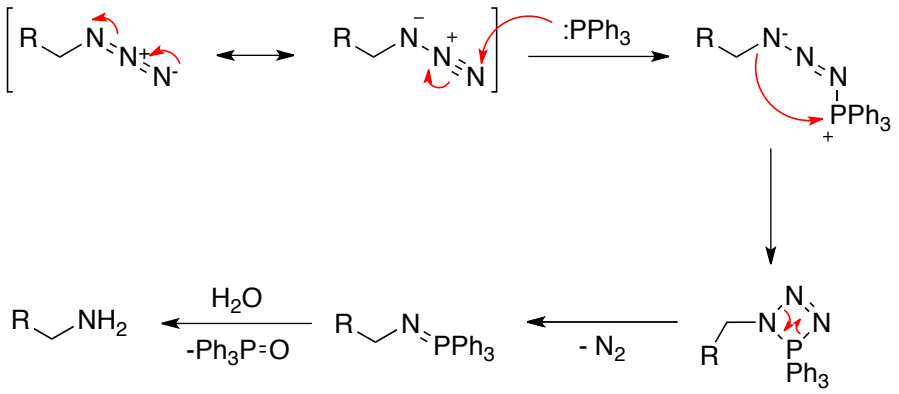


Schéma 2.1. Mécanisme de la réaction de Staudinger

Toutefois, ce n'est qu'en 2000 que les chercheurs du groupe de recherche de C. Bertozzi, qui est reconnue comme étant une pionnière dans le milieu de la chimie bio-orthogonale, a développé une réaction basée sur la réaction de Staudinger (**Schéma 2.3**) qui implique la réduction du groupement azoture avec la triphénylphosphine.[22] Ceux-ci ont surnommé cette réaction la ligature de Staudinger, du nom anglais *Staudinger Ligation*.[23]

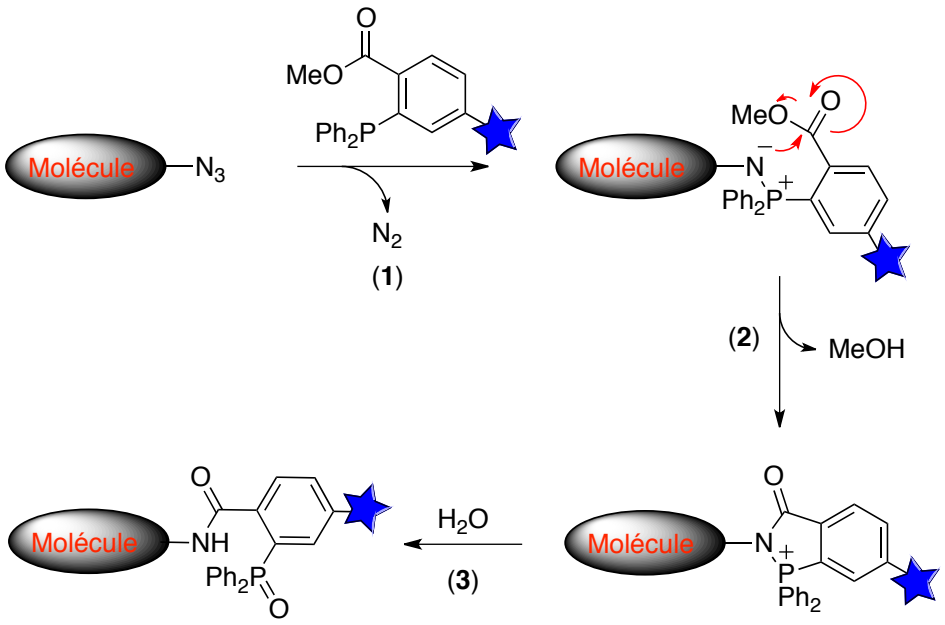


Schéma 2.2. Mécanisme de réaction pour la ligature de Staudinger.

Tout d'abord, le placement stratégique d'un ester sur l'un des substituants du cycle aromatique permet la formation intramoléculaire rapide d'un intermédiaire cyclique. Ensuite, en présence d'eau, ce qui est généralement le cas dans les cellules, on observe l'hydrolyse de l'intermédiaire afin de former une liaison amide. L'hydrolyse de l'intermédiaire donne un produit de ligature stable qui comprend l'oxyde de phosphine à l'intérieur de la structure. Cette étape est cruciale pour le fonctionnement de la réaction puisque sinon, l'iminophosphorane serait simplement hydrolysé pour donner l'amine correspondante ainsi qu'un dérivé contenant un oxyde de phosphine. Cette réaction n'est toutefois pas 100% bio-orthogonale puisque les thiols, présent sur la cystéine, ont la capacité de réduire les azotures.[24] De plus, les phosphines sont reconnues pour leur capacité à cliver des liens disulfures.[25] Cependant, la cinétique lente de la réaction est un inconvénient majeur de cette réaction. En effet, l'étape limitante de la réaction, qui est l'attaque nucléophile de la phosphine sur l'azoture, possède une cinétique très lente et demande de très grandes concentrations de phosphine ce qui est impossible en milieu cellulaire puisque ceux-ci sont généralement très dilués.[26] Plusieurs essais afin d'améliorer

celle-ci ont été tentés sans toutefois donner de résultats positifs. Aussi, les phosphines sont susceptibles de s'oxyder en milieu aérobique.

2.2.3 L'application du couplage azoture-alcyne en chimie bio-orthogonale

Afin de contrer le problème de cinétique trop lente, une nouvelle classe de réactifs bio-orthogonal a été développée. Toujours en utilisant l'azoture comme groupement fonctionnel, les chercheurs ont entrepris de modifier une réaction classique, c'est-à-dire la cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne conduisant à la formation d'un hétérocycle 1,2,3-triazole.

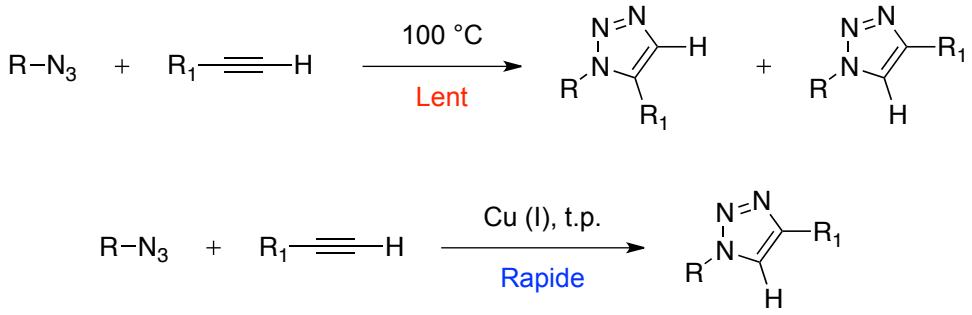


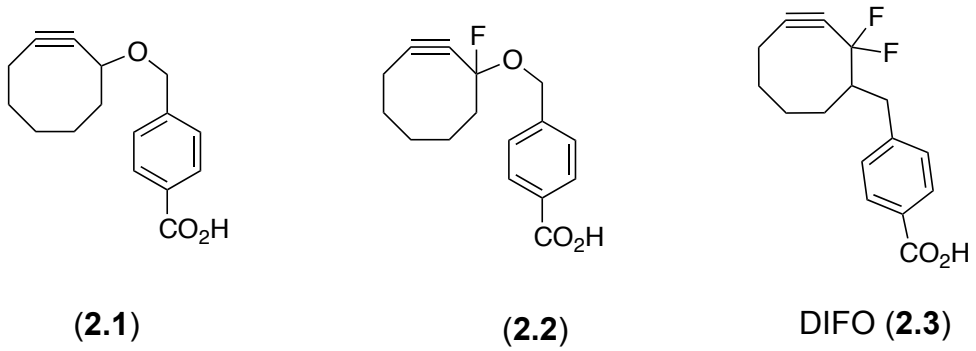
Figure 2.3. Cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne afin de former un 1,2,3-triazole.

Toutefois, le protocole initial de cette réaction proposé par Huisgen[27] requiert des températures élevés ce qui s'avère incompatible avec les milieux cellulaires. De ce fait, cette méthodologie a été abandonnée pendant plusieurs années. Ce n'est que cinquante ans plus tard que les groupes de recherche de Sharpless[28] et Meldal[29] ont développé la formation d'hétérocycle 1,2,3-triazole à l'aide d'une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne pouvait être catalysée par un réactif de cuivre (I) à température ambiante. Cette réaction catalysée par le cuivre, aussi connu sous le nom de chimie clic, s'avère être sept fois plus rapide que celle sans catalyseur.

Malheureusement, cette réaction implique un catalyseur de cuivre (I) qui possède une toxicité trop élevée pour être utilisée dans les cellules.[30] C'est donc avec l'idée de retirer le cuivre de la réaction que la professeure Bertozzi a développé une réaction de cycloaddition

entre un azoture et un cycloalcyne catalysée (induite) par le gain de stabilité produit par le relâchement de tension de cycle. Ce terme provient de l'anglais, *strain-promoted alkyne-azide cycloaddition* (SPAAC).

Cette découverte se base sur les travaux de Wittig et Krebs qui rapportent que le cyclooctyne, le plus petit cycle isolable (stable) pouvant contenir un alcyne, réagit de manière explosive lorsque mis en présence de phénylazide.[31] C'est donc en s'inspirant de ces travaux que différents cycloalcynes ont été synthétisés (**Figure 2.4**).



(**2.1**) (**2.2**) DIFO (**2.3**)

Figure 2.4. Structures des différents cycloalcynes de la nouvelle génération.

Aucune amélioration ou augmentation de la vitesse de réaction de cycloaddition n'a été observé avec le composé **2.1**. Toutefois, une augmentation radicale de la vitesse de réaction a été observée lors de l'ajout d'un groupement électro-attracteur (fluor) en position propargylique de la molécule. Le composé **2.3**, aussi connu sous le nom de DIFO, permet d'augmenter de soixante fois la vitesse de réaction.

De ce fait, la réaction de cycloaddition entre un azoture et un cycloalcyne est à ce jour une des meilleures méthodes disponibles en chimie bio-orthogonale. Nous avons donc procédé avec cette méthodologie dans le but de tenter d'isoler le récepteur. Toutefois, l'isolation du récepteur ne peut être accompli que si le substrat est lié de manière irréversible à celui-ci.

2.3 Conception d'une molécule photo-active afin de lier le récepteur

2.3.1 Le concept de photo-activité

Afin de déterminer la nature exacte de la protéine étudiée, une stratégie très simple est utilisée. Celle-ci consiste à prendre une molécule contenant un élément susceptible de former un nitrène, un carbène, un carbocation ou un radical lorsqu'irradiée à une longueur d'onde spécifique ce qui lui permettra par la suite, de réagir avec le récepteur. Les composés tels que les diazirines, les composés diazo, les sels de diazonium, les azotures aromatiques ainsi que les benzophénones sont généralement utilisés (**Figure 2.5)**.

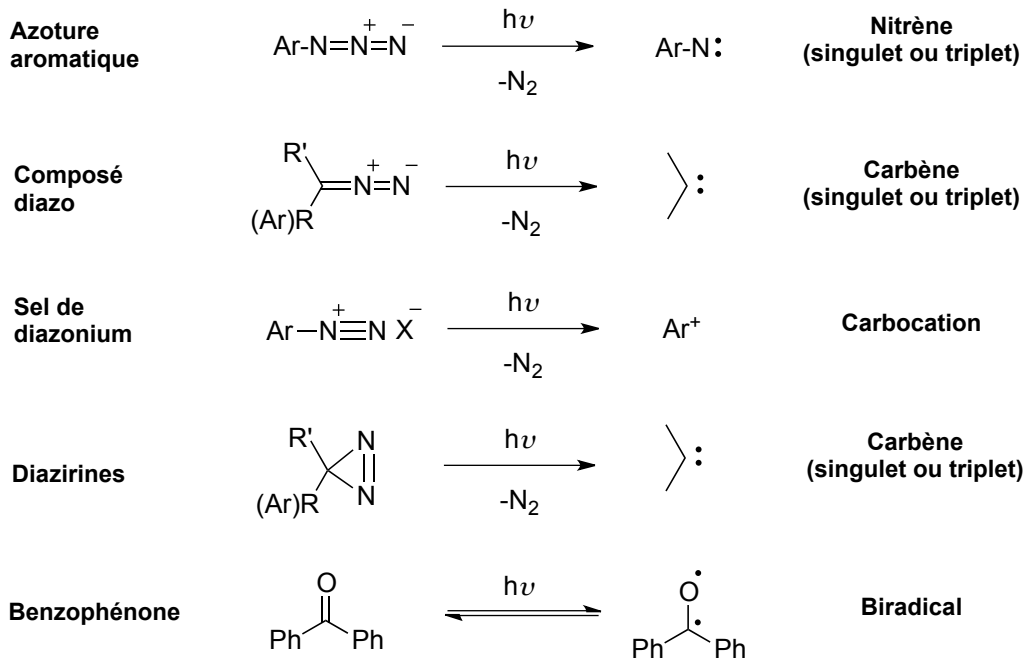


Figure 2.5. Structures des différentes fonctions photo-actives

En d'autre mot, le but est d'avoir une molécule qui peut être incorporée dans le site actif de la molécule cible. Ensuite, lors d'une irradiation avec de la lumière, la molécule peut se lier de manière irréversible à la protéine.[32] Il va sans dire que chacune des fonctions

illustrées ci-dessus possède un mécanisme d'activation et de propagation unique. Les fonctions benzophénone, diazirines ainsi que azoture aromatique seront étudiées plus en détail.

2.3.2 Les composés benzophénones ou cétones aromatiques

Les composés benzophénones sont très utilisés comme groupement photo-actif puisque ceux-ci peuvent être activés à des longueurs d'onde peu dommageables pour la structure primaire de la protéine, c'est-à-dire autour de 320 nm. Une fois activés, les benzophénones forment un état excité de nature biradicalaire (**Schéma 2.3**) qui peut par la suite réagir et s'insérer dans le lien C-H du carbone en position alpha de l'acide aminée glycine.[33]

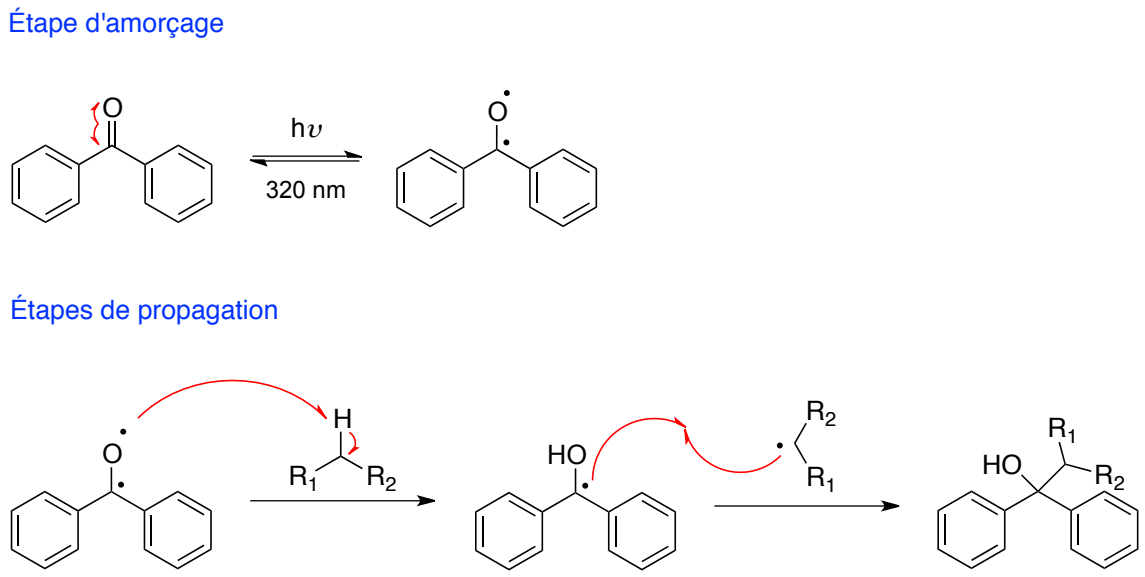


Schéma 2.3. Mécanisme d'insertion de la benzophénone* dans le lien C-H de la glycine.

Cette méthode est relativement efficace puisque le lien C-C formé lors de la réaction est très peu susceptible de se briser lors des analyses subséquentes afin d'analyser la protéine. Toutefois, la réaction produit également un alcool secondaire qui quant à lui peut être sujet d'une réaction de déshydrogénation catalysée par l'acide présent dans les cellules.[34] Ce groupement n'a pas été choisi pour effectuer les études sur le système puisque celui-ci est très volumineux. En effet, les benzophénones doivent être liés à la molécule étudiée afin de celle-ci soit dites photo-active. La grosseur du groupement causerait un trop grand changement au

niveau de la structure du substrat et pourrait avoir un effet sur l'activité biologique. Pour ces raisons, des petits groupements facilement installables sur la molécule tels que les diazirines et les azotures aromatiques seront utilisés.

2.3.3 Les composés contenant la fonction diazirine

Les diazirines sont également très utilisés comme groupement photo-actif puisque ceux-ci, comme les benzophénones, peuvent être activés à des longueurs d'onde peu dommageable pour la structure primaire de la protéine, c'est-à-dire autour de 350 nm. Une fois activé, on observe la perte irréversible d'une molécule d'azote (N_2), sous-produit non nuisible au milieu cellulaire, ainsi que la formation d'un carbène.[35] Les composés diazo peuvent également réagir de la sorte, mais les diazirines sont plus souvent utilisées dû à une meilleure stabilité chimique. Les récentes avancées en chimie ont permis, avec l'ajout d'un groupement électro-attracteur (CF_3), de rendre le carbène formé après irradiation plus stable en milieu cellulaire.

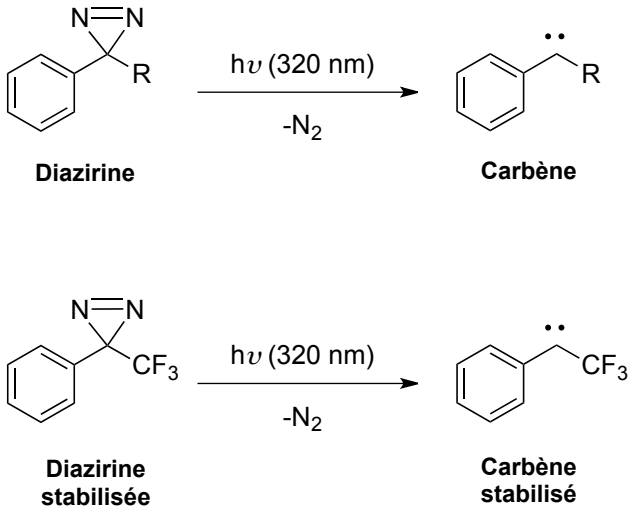


Figure 2.6. Structures des différentes diazirines ainsi que les carbènes formés après irraditation.

La caractéristique principale du carbène est qu'il possède la capacité de former rapidement une liaison covalente avec le molécule-cible via insertion dans un lien C-C, C-H, O-H ou X-H (X). Les rendements d'isolation de protéine sont généralement très bas pour ce qui a trait aux diazirines puisque le carbène formé est instable et réagit rapidement avec l'eau.

Toutefois, ceci est un avantage puisque seulement les molécules ayant une très grande affinité avec le récepteur seront isolées. De part leur facilité de synthèse et leur grande réactivité, une série d'analogues rigides incorporant la fonction diazirine a été synthétisée. Ces résultats seront décrits plus en détail dans la section **2.4.1**.

2.3.4 Les composés contenant un azoture aromatique

Les composés possédant un azoture aromatique ne sont généralement pas beaucoup utilisés dans ce domaine puisque ceux-ci doivent être activés à des longueurs d'onde très basse autour de 250 nm. Une fois irradié, on observe la perte irréversible d'une molécule d'azote (N_2), ainsi que la formation d'un nitrène dans l'état singulet (^1N) ou triplet (^3N). Celui-ci pourra ensuite réagir avec la tyrosine ou avec une amine (lysine) (**Schéma 2.4**).

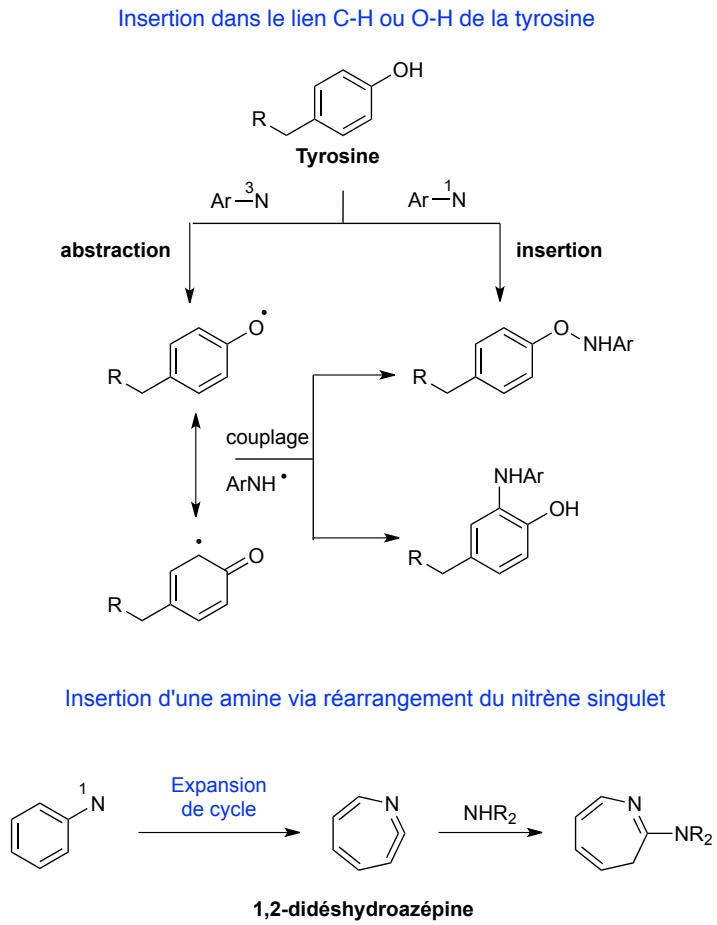


Schéma 2.4. Illustration des différents mécanismes d'insertion du nitrène.

Malgré les basses longueurs d'onde requises afin d'exciter ces azotures aromatiques, leur facilité de synthèse et leur grande réactivité nous ont poussé à synthétiser une série d'analogues rigides portant cette fonction. Ces résultats seront décrits plus en détail dans la section **2.4.2**.

2.4 Conception de la molécule afin de lier et isoler la protéine cible

2.4.1 La synthèse d'analogues diazirine-alcyne

Sachant que les groupements diazirines et azotures sont très utiles afin de lier le récepteur, nous avons entrepris de synthétiser des analogues rigides portant ces fonctions. Ces fonctions nous permettront de lier le récepteur, que nous pourrons ensuite isoler grâce au couplage alcyne-azoture tel que présenté précédemment.

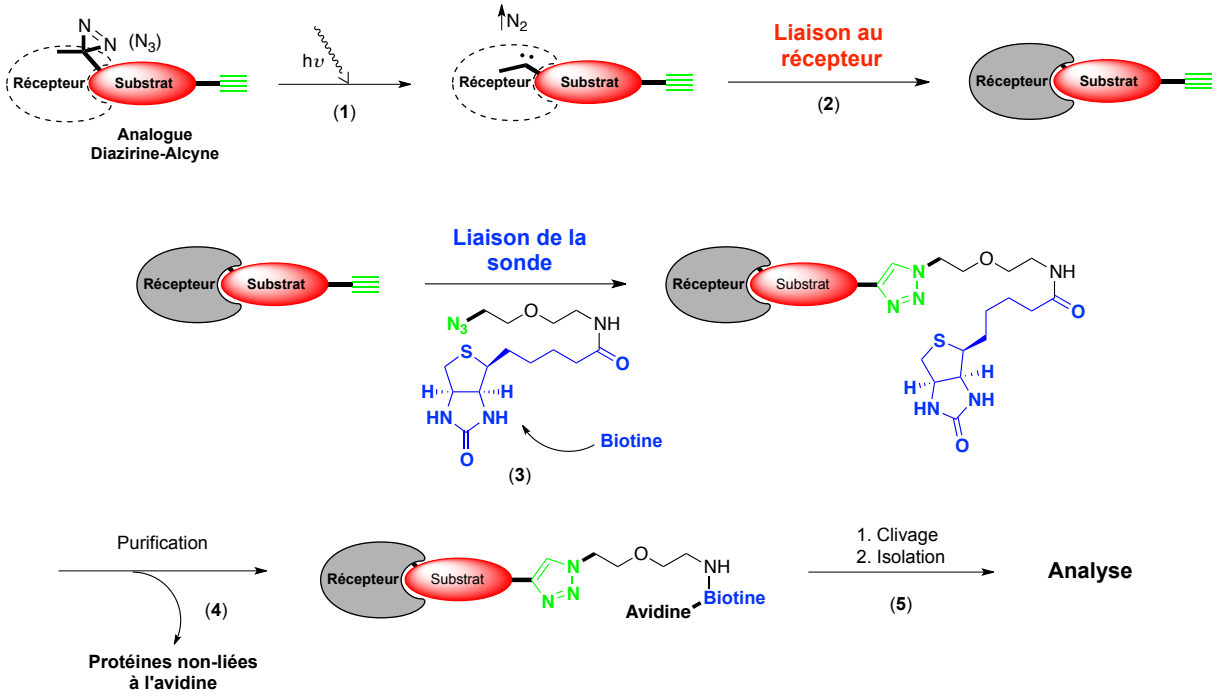


Schéma 2.5. Illustration du mécanisme de liaison et d'isolation du récepteur.

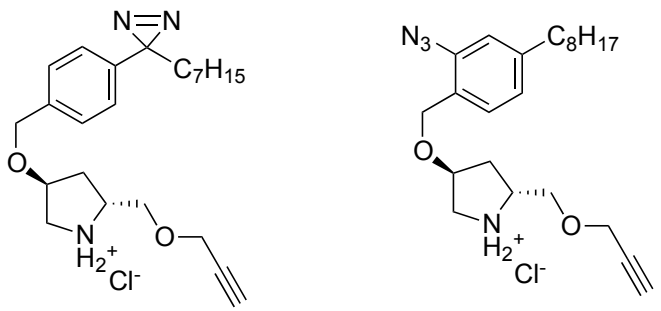
Les étapes afin d'isoler la protéine sont très simples et suivent une méthodologie qui est fréquemment utilisée en chimie médicinale (**Schéma 2.5**). Tout d'abord, la molécule

portant la sonde est mise en présence du récepteur et ira se loger dans le site actif de celui-ci. Il est primordial que la molécule possède une bonne activité biologique afin d'effectuer ce processus sans quoi aucune liaison ne se fera au niveau du site actif. La sonde, qui dans notre cas est constituée d'une diazirine ou d'un azoture aromatique, et le récepteur sont mis en contact. Ensuite, on irradie le milieu avec de la lumière UV (**1**), ce qui aura pour effet de former le carbène qui, de part sa proximité avec la protéine, se liera de manière irréversible avec celle-ci (**2**).

Deuxièmement, le groupement alcyne installé sur la molécule nous servira de bras afin de lier une branche contenant un azoture ainsi qu'une entité semblable à la biotine. Le groupement azoture nous permettra d'abord de former, à l'aide d'une cycloaddition [2+3], un hétérocycle 1,2,3-triazole (**3**). Ce cycle nous servira de connecteur entre la protéine et le groupement biotine. Ce groupement est très important puisqu'il possède une très grande affinité avec l'avidine.

En effet, celle-ci possède la capacité de se lier à quatre molécules de biotine, ce qui rend cette interaction idéale pour les stratégies de purification. Sachant que seules les entités possédant un groupement biotine seront reconnues par l'avidine, une purification à l'aide d'une colonne chromatographique contenant cette protéine est effectuée (**4**). Nous évacuons ainsi toutes les protéines indésirables du milieu ne laissant que celle liées à notre molécule. Par la suite, un simple clivage du connecteur nous permet de récupérer la protéine cible liée à notre molécule et d'analyser la séquence d'acide aminé correspondante au récepteur par spectrométrie de masse (**5**).

Afin d'effectuer cette méthodologie, deux analogues rigides de FTY-720 ont été synthétisés, soit le composé **2.4** portant une diazirine, ainsi que le composé **2.5** qui possède un azoture aromatique. Ces deux composés possèdent également une branche alcyne afin de les connecter avec l'entité biotine.



(**2.4**) (**2.5**)

Figure 2.7. Structure des différents analogues comportants les différentes sondes photo-actives.

Les deux molécules sont synthétisées de manière très différente. La stratégie utilisée pour le composé **2.4**, développée avec Bin Chen un étudiant au doctorat de notre groupe, est linéaire alors que celle utilisée afin de synthétiser l'azoture aromatique **2.5** est convergente. Une synthèse est dite linéaire lorsque celle-ci débute avec un produit qui sera modifié progressivement au cours de la synthèse. Une synthèse dite convergente implique la synthèse simultanée de deux blocs formant la molécule finale qui seront assemblés afin de former la molécule finale. Une synthèse convergente permet l'obtention de meilleurs rendements de réaction et permet également une synthèse beaucoup plus rapide et efficace des produits désirés puisqu'elle diminue le temps de mise à l'échelle.

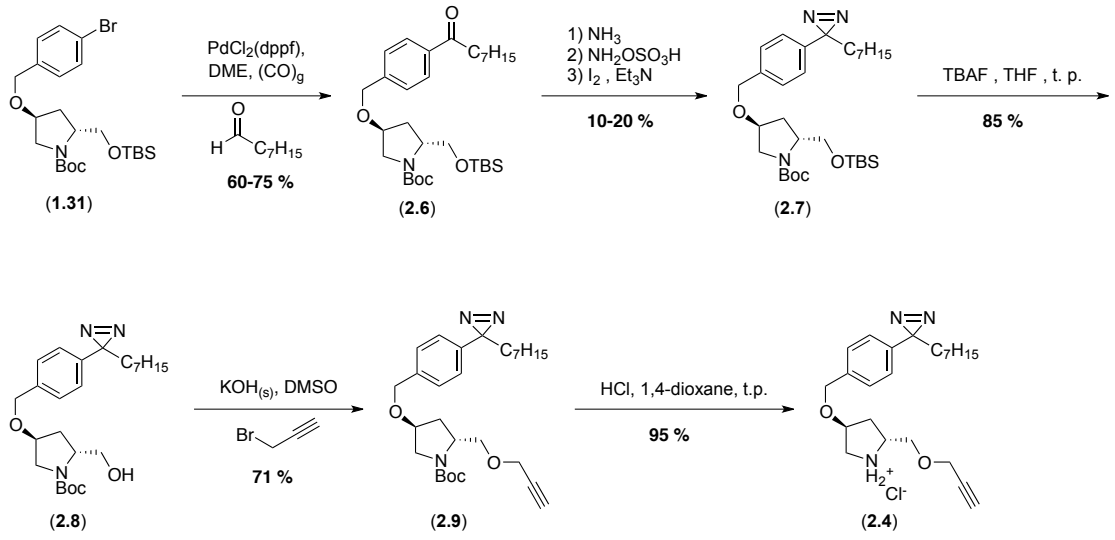


Schéma 2.6. Synthèse linéaire de l'analogue **2.4** à partir de la *trans*-4-hydroxy-D-proline.

Néanmoins, le composé comportant la diazirine a été synthétisé de manière linéaire (**Schéma 2.6**). À partir du composé **1.31** que nous avons précédemment synthétisé, nous arrivons à former le composé **2.6** à l'aide d'un couplage. Cette cétone aromatique peut ensuite être mise en présence d'ammoniac afin de former un imine qui est par la suite transformé en diaziridine (-NH-NH-). Celle-ci est ensuite oxydée en diazirine **2.7** à l'aide de l'iode et la triéthylamine. Les étapes de formation de la diazirine sont très peu reproductibles et il n'est pas rare d'observer des rendements de moins de 25% pour cette réaction. Ensuite, une étape de déprotection de l'éther silylé permet d'obtenir l'alcool primaire **2.8** qui est alkylé afin de former l'intermédiaire diazirine-alcyne protégé **2.9**. Une simple étape de déprotection du carbamate en milieu acide permet d'obtenir la molécule **2.4**. Au vue des rendements peu reproductibles et très bas de la formation de la diazirine, un nouvel analogue comportant cette fonction a été synthétisée.

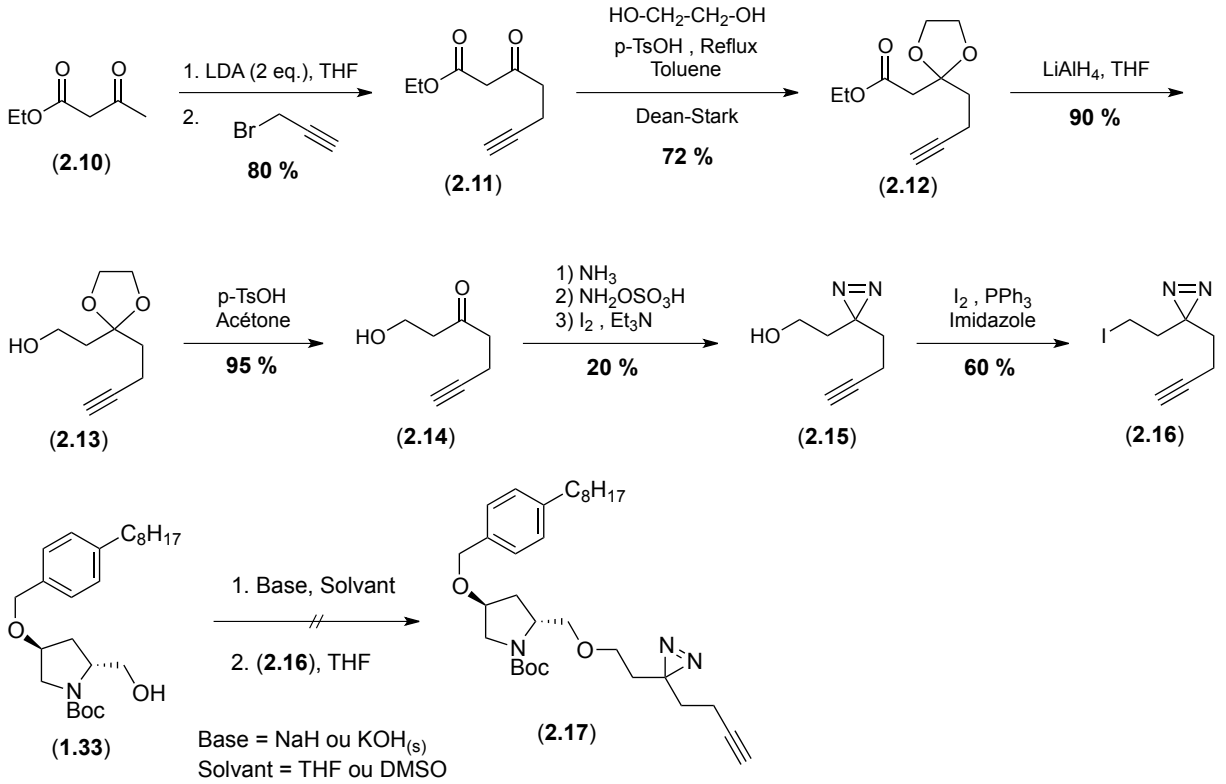


Schéma 2.7. Synthèse convergente de l'analogue **2.17** à partir de la *trans*-4-hydroxy-D-proline.

En suivant une méthodologie connue,[36] nous avons synthétisé un analogue via une synthèse convergente (**Schéma 2.7**). Celle-ci nous permet de diminuer la perte de produit très avancé dans la synthèse comme c'était le cas lors de la formation de la diazirine **2.7**. La nouvelle stratégie implique une alkylation entre l'alcool primaire du composé **1.33** et le composé **2.16** qui est facilement obtenu en 6 étapes à partir du précurseur **2.10**. Malheureusement, le produit désiré (**2.17**) n'a pas été obtenu lors de la réaction. Au lieu de former l'éther **2.17**, la molécule forme le carbamate cyclique **2.18** par cyclisation intramoléculaire sur le groupement protecteur (**Schéma 2.8**).

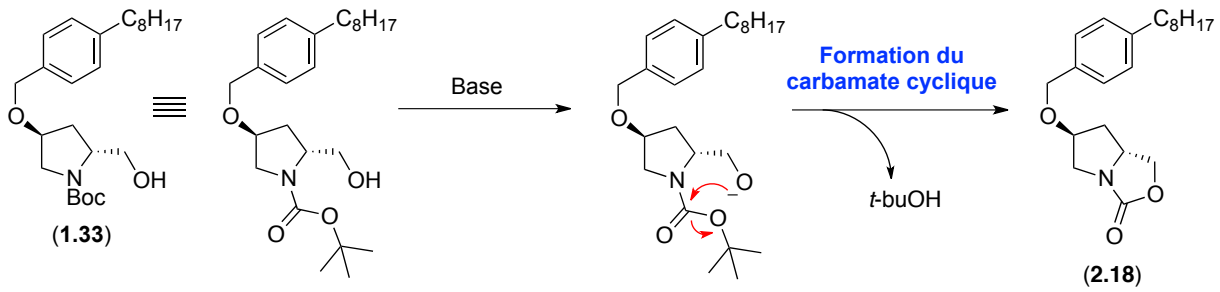


Schéma 2.8. Mécanisme de cyclisation intramoléculaire afin de former le carbamate cyclique **2.18**.

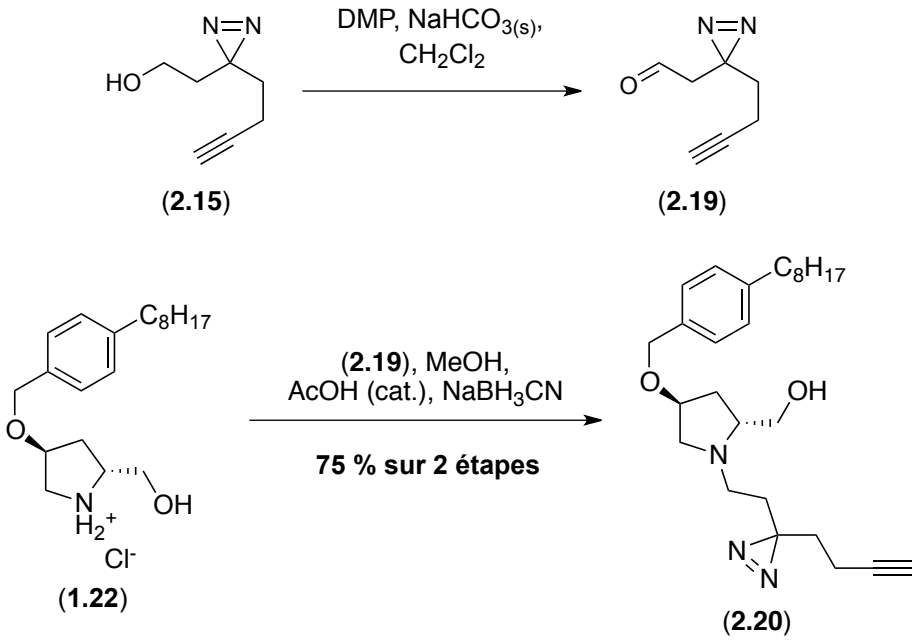


Schéma 2.9. Réaction d'amination réductrice afin de former le composé **2.20**.

Plusieurs variations de la base ainsi que du solvant ont été effectuées sans succès. Nous avons donc décidé de former un nouvel intermédiaire **(2.20)** via une réaction d'amination réductrice entre l'amine secondaire **1.22** et l'aldéhyde **2.19** qui provient de l'oxydation au periodinane de Dess-Martin de l'alcool primaire **2.15**. Malheureusement, dû à la perte de l'amine secondaire et de la modification trop importante de la molécule, le composé **2.20** ne possède qu'une très faible activité anticancéreuse. En comparaison avec FTY720, le composé possède une activité quatre fois moins grande. Toutefois, le composé **2.4** est plus actif et des études sont présentement en cours afin d'isoler le récepteur. Le problème de mise à l'échelle très difficile de ce composé nous a tout de même poussé à synthétiser l'analogue **2.5**.

2.4.2 La synthèse de l'analogue azoture aromatique-alcyne

Les composés photo-actifs comportant un azoture aromatique ont souvent été laissé de côté dû à la longueur d'onde très basse requise afin de former le nitrène. Toutefois, en 2005, un analogue azido-FTY720 (**Figure 2.8**) a été synthétisé.[37]

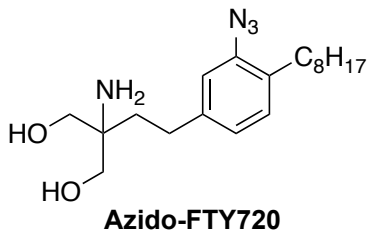


Figure 2.8. Structure de l'analogue azido-FTY720.

C'est en se basant sur ces travaux et à l'aide d'une stratégie de synthèse convergente que le composé **2.5** a été synthétisé. En effet, le but était de synthétiser un composé aromatique contenant un précurseur d'azoture aromatique (**2.23**), qui est obtenu à partir de l'acide commercial **2.21,** et de coupler celui-ci à l'alcool secondaire **1.30** en présence de base (**Schéma 2.10**). La réaction d'alkylation n'a toutefois pas donnés les résultats attendus ne donnant qu'un très faible rendement de 5 - 10%.

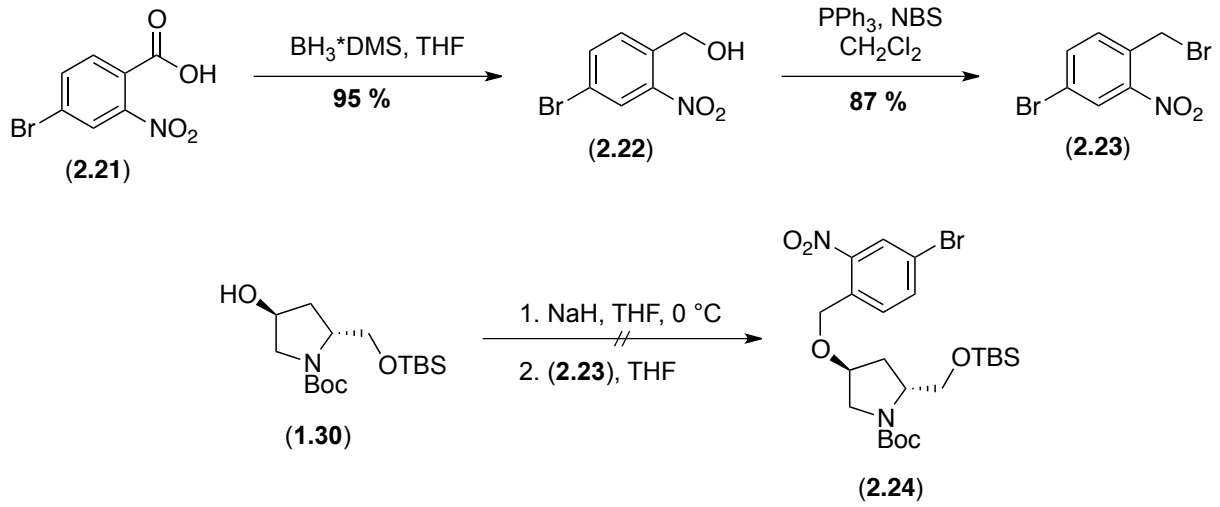


Schéma 2.10. Réactions impliquées dans la formation du composé **2.24.**

Sachant que les groupements nitro aromatiques peuvent causer problème en présence de base forte, nous avons entrepris de former l'azoture avant de coupler les fragments ensemble. La réaction d'alkylation entre l'azoture aromatique **2.26**, qui est obtenu en deux étapes à partir du composé **2.23**, et l'alcool **1.30** a donné de bien meilleurs résultats qu'avec le composé nitro, confirmant que le nitro causait bel et bien des problèmes lors de la réaction en présence de base forte.

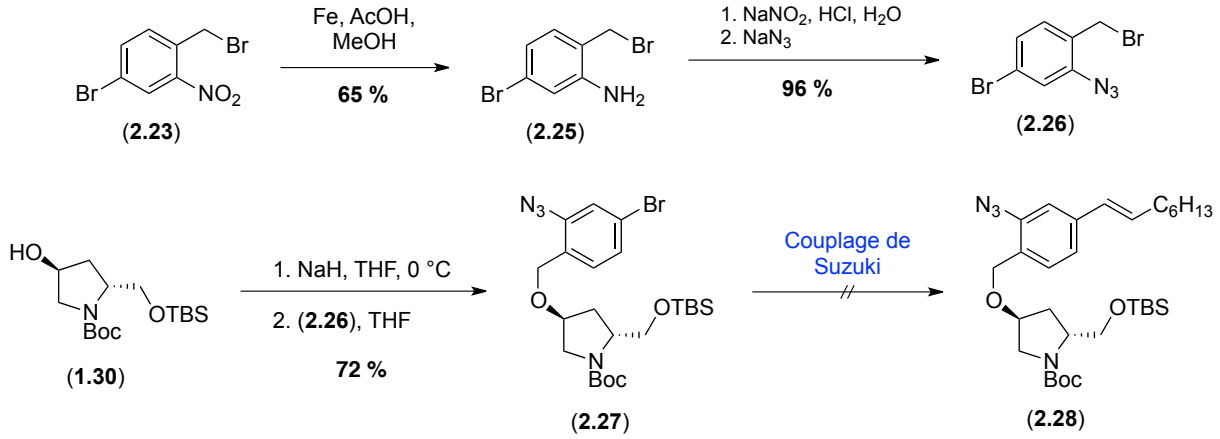


Schéma 2.11. Synthèse des composés **2.26** et **2.27**

Malencontreusement, la réaction du bromure aromatique **2.27** dans un couplage de Suzuki ne procure pas le produit désiré (**2.28**). Les très faibles rendements (0-5 %) sont dûs à

la réaction secondaire entre l'azoture aromatique présent sur la molécule et la phosphine (PPh_3) provenant des ligands du catalyseur de palladium. Nous avons donc effectué la réaction de couplage avant l'alkylation (**Schéma 2.12**). Le couplage de Sonogashira est possible dans ce cas puisque le bromure aromatique (**2.22**) est très pauvre en électron dû au groupement nitro électro-attracteur qui facilite l'insertion du Pd dans le lien C-Br. Ce couplage ne pouvait pas être effectué sur les intermédiaires précèdents dû à l'absence de groupement électro-attracteur, justifiant l'utilisation du couplage de Suzuki.

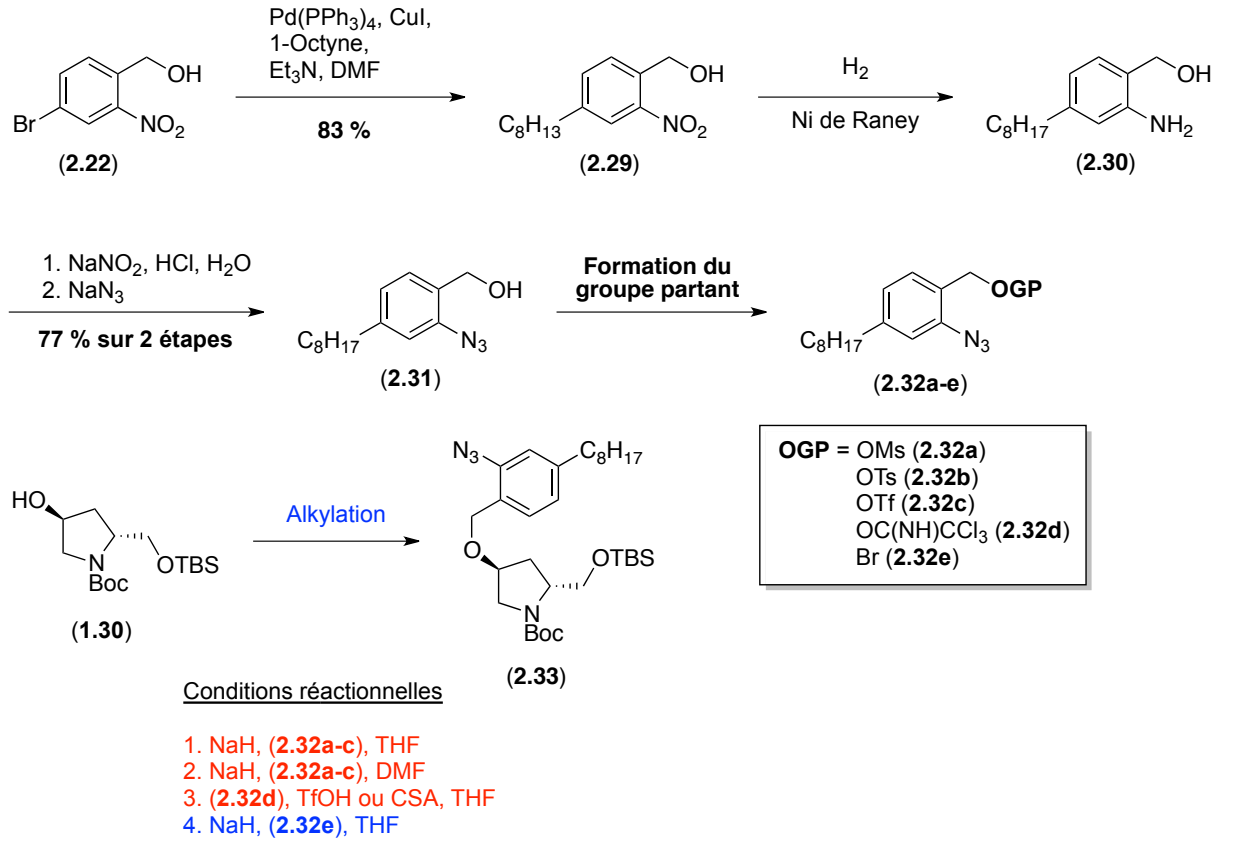
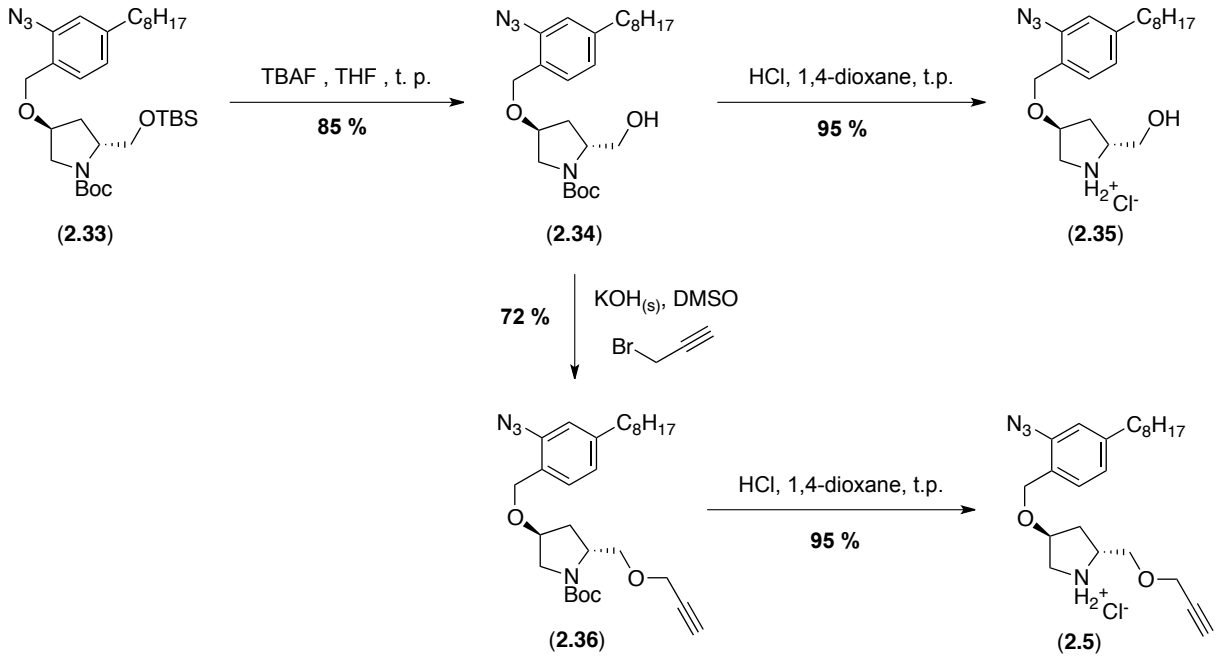


Schéma 2.12. Synthèse de l'azoture aromatique (**2.33**) via différentes conditions d'alkylation.

L'alcool benzylique de la molécule **2.31** est ensuite transformé en bon groupe partant afin de permettre l'addition nucléophile du composé **1.30**. Différents groupements partant ont été synthétisés afin d'effectuer cette réaction. Seul le bromure benzylique **2.32e** permet la réaction d'alkylation avec un rendement de 60 % sur 2 étapes. Aucune réactivité n'a été observée avec les composés **2.32a** et **2.32b** et ce, même à des températures plus élevées (40-

70 °C). À ces températures, la décomposition des molécules était observée. Le composé **2.32c** était quant à lui beaucoup trop réactif et la décomposition rapide de celui-ci a été observée à des températures plus basse que celles requises pour l'alkylation (-60 °C). Quant à la réaction impliquant le composé **2.32d**, les conditions réactionnelles acides (TfOH, CSA) nécessaires afin d'activer le groupe partant causaient problème. En effet, ces conditions entraînent également la déprotection de l'éther silylé ainsi que la déprotection du carbamate menant à plusieurs produits indésirables lors de la réaction.



(**2.33**) (**2.34**) (**2.35**) (**2.36**) (**2.5**)

Schéma 2.13. Synthèse des azotures aromatiques **2.35** et **2.5**.

Une fois l'azoture aromatique **2.33** obtenu, des réactions de déprotection permettent d'obtenir le composé **2.35** qui sera préalablement testé afin de confirmer que la présence de l'azoture n'affecte pas le mécanisme d'action de celle-ci. Ensuite, une alkylation suivi de la déprotection du carbamate permet d'obtenir la molécule **2.5** qui servira de sonde afin de tenter d'isoler le récepteur. De plus, aucune toxicité cellulaire n'a été observée avec celle-ci, comparativement à la molécule azido-FTY720 lorsque testée contre des cellules de leucémie aigüe lymphoblastiques (FL5.12 et SupB15).

2.4 Conclusions générales et perspectives

L'objectif de cette deuxième branche du projet était de démystifier le mécanisme biologique dans laquelle notre molécule est impliquée à l'aide d'outils tels que la chimie bio-orthogonale. Dans cette optique, deux sondes ont été synthétisées. Celles-ci ont passées le premier test qui était qu'elles possèdent toujours une activité biologique malgré les modifications apportées. Ensuite, ces sondes ont été incorporées dans les cellules et des résultats préliminaires nous poussent à croire que le récepteur pourra bel et bien être isolé et analysé dans un avenir rapproché.

Toutefois, il est encore trop tôt pour tirer des conclusions quant à la nature du récepteur. Afin d'augmenter les chances d'isolation d'un récepteur, une nouvelle molécule (**2.37**) imitant l'analogue **1.12** sera synthétisée à partir de l'intermédiaire connu **1.8** selon la route synthétique décrite dans le Schéma **2.14**.

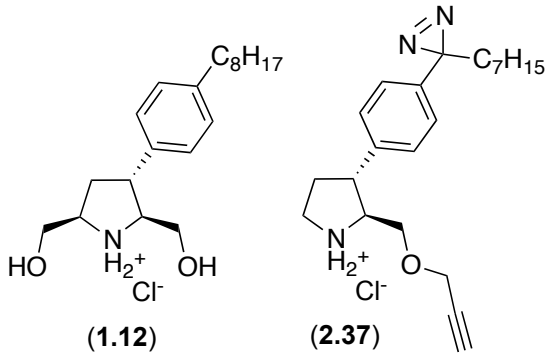


Figure 2.9. Structure des analogues **1.12** et **2.37**.

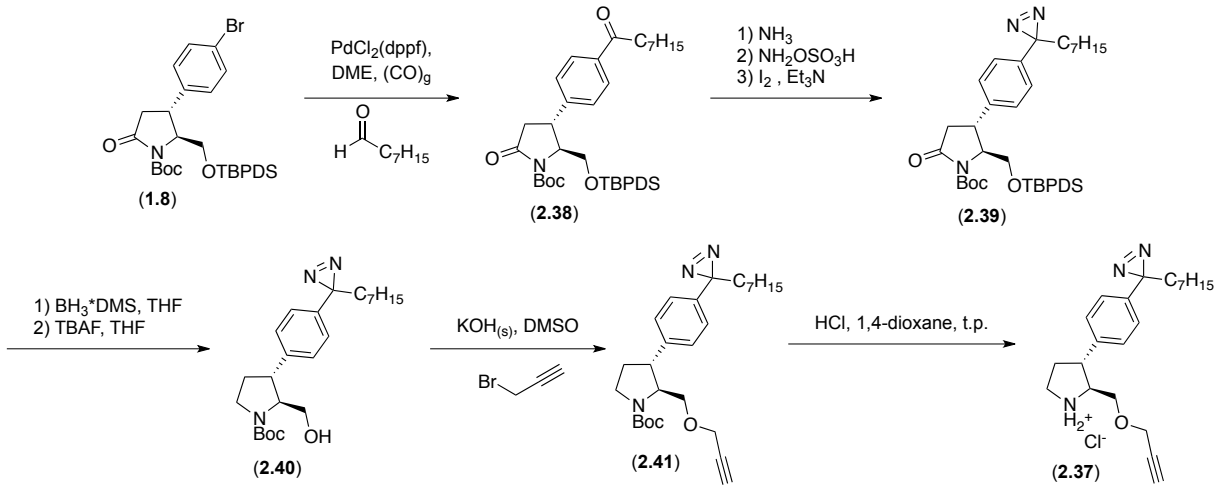


Schéma 2.13. Route envisagée pour la synthèse de l'analogue **2.37**.

2.5 Références

(1) a) Nienhaus G. U. ; *Angew. Chem.* **2008**, 120, 9130. b) Nienhaus G. U. ; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8992.

(2) Sletten E. M. ; Bertozzi C. R. ; *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 666–676.

(3) Glazer A. N. ; *Annu. Rev. Biochem*. **1970**, 39, 101.

(4) McFarland J. M.; Francis M. B. ; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 13490.

(5) Davis B.G. ; *J. Am. Chem. Soc*. **2008**, 130, 5052.

(6) Dondoni A. ; *Angew. Chem.* **2008**, 120, 9133.

(7) Joshi N. S. ; Whitaker L. R.; Francis M. B. ; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15942.

(8) Kodadek T. ; Duroux-Richard I. ; Bonnafous J. C. ; *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, 26, 210.

(9) Tilley S. D. ; Francis M. B. ; *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1080.

(10) Antos J. M. ; Francis M. B. ; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10256.

(11) Cennamo C.; Carafoli B. ; Bonetti E. P. ; *J.Am.Chem.Soc.* **1956**, 78, 3523.

(12) Dixon H. B. F. ; *Biochem. J.* **1964**, 92, 661.

(13) Francis M. B. ; *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5433.

(14) Geoghegan K. F. ; Stroh J. G. ; *Bioconjugate Chem.* **1992**, 3, 138.

(15) Tam J. P. ; *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 4069.

(16) Miao Z. M. ; Tam J. P. ; *Biopolymers* **1999**, 51, 311.

(17) Dawson P. E. ; Muir T. W. ; Clarklewis I. ; Kent S. B. H. ; *Science* **1994**, 266, 776.

(18) Antos J. M. ; Francis M. B. ; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 253.

(19) Hackenberger C. P. R. ; Schwarzer D. ; *Angew. Chem.* **2008**, 120, 10182

(20) Hackenberger C. P. R. ; Schwarzer D. ; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 10030.

(21) Griffin R. J. ; *Prog. Med. Chem.* **1994**, 31, 121.

(22) Staudinger H. ; *J. Meyer, Helv. Chim. Acta* **1919**, 2, 635.

(23) Saxon E. ; Bertozzi C. R. ; *Science* **2000**, 287, 2007.

(24) Cartwright I. L. ; Armstrong V. W. ; *Nucleic Acids Res*. **1976**, 3, 2331.

(25) Burns J. A. ; Butler J. C. ; Moran J. ; Whitesides G. M. ; *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2648.

(26) Bertozzi C. R. ; *J. Am. Chem.* Soc. **2005**, 127, 2686.

(27) Huisgen R. ; *Angew. Chem.* **1963**, 75, 604.

(28) Sharpless K. B. ; *Angew. Chem*. **2002**, 114, 2708.

(29) Meldal M. ; *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057.

(30) Wolbers F. ; Van den Berg A. ; *Electrophoresis* **2006**, 27, 5073.

(31) Wittig G. ; Krebs A. ; *Chem. Ber.* **1961**, 94, 3260.

(32) Goeldner, M. ; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 1296- 1312.

(33) Galardy R. E. ; Printz M. P. ; *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, 3510-3518.

(34) Egnaczyk G. F. ; Maggio J. E. ; *Biochemistry* **2001**, 40, 11706–11714.

(35) Bayley H. ; *Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology* Elsevier, Amsterdam, **1983**.

(36) Yao S. Q. *et al.* ; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 8551-8556.

(37) Bittman R. ; *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 2200-2202.

Chapitre 3 : Partie Expérimentale

3.1 Conditions réactionnelles et provenance des produits

Tous les produits ont été achetés des compagnies Sigma-Aldrich Corp., Alfa Aesar, AK Sci., A&C American Chem. Ltd, Anachemia et CDN Isotopes Inc. L'éther diéthylique, le tétrahydrofurane, le dichlorométhane et le toluène anhydres ont été séchés sur des colonnes d'alumine activée avec un système SDS. Le méthanol (MeOH) et l'acétonitrile (MeCN) ont été distillés avec du magnésium activé. Les autres solvants anhydres proviennent de VWR International ou de Sigma-Aldrich Corp.

3.2 Instrumentation

L'acquisition des spectres de résonance magnétique nucléaire de protons ^{1}H et de carbones ^{13}C a été effectuée à l'aide un appareil Bruker AV-400 utilisant des sondes BBFO. Les déplacements chimiques sont exprimés en parties par million (ppm) selon l'échelle δ et ont été calibrés par rapport au signal du solvant résiduel non deutéré. L'abréviation suivante a été employée pour rapporter la multiplicité des signaux: s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet. Les constantes de couplage sont exprimées en Hertz (Hz).

Les mesures de masses exactes ont été effectuées sur un instrument LC-MSD-TOF d'Agilent Technologies en mode d'ionisation positif par électronébuliseur.

La spectroscopie infrarouge a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre FTIR Perkin-Elmer Spectrum One et les bandes d'absorption importantes ont été rapportées en cm^{-1}.

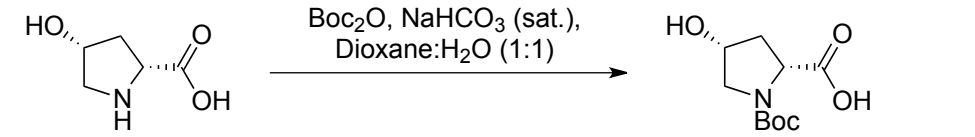
Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés avec un polarimètre Perkin-Elmer 343 à la longueur d'onde du sodium de 589 nm.

Annexe

Annexe I – Partie expérimentale

FTY-720 Analogues: The *O*-Benzyl Series

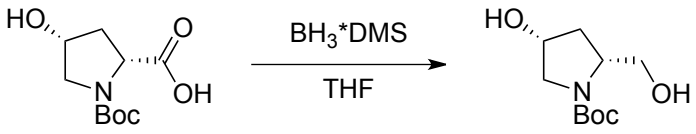
N-boc-*cis*-4-hydroxy-D-proline



***cis*-4-hydroxy-D-proline** ***N-boc-cis*-4-hydroxy-D-proline**

To a solution of ***cis*-4-hydroxy-D-proline** (10g, 76.3 mmol) in dioxane and water (1:1, 160 mL) was added $NaHCO_3$ (sat.) (160 mL). The solution was cooled to 0 °C and $(Boc)_2O$ (35 mL, 152.7 mmol) was added drop wise. The mixture was stirred at room temperature until TLC show total conversion of starting material. The pH was ajusted to 3 by slow addition of 2M HCl and the reaction mixture was extracted three times with EtOAc. The organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The **N-boc-*cis*-hydroxy-D-proline** is taken without further purification in the next step.

N-boc-cis-4-hydroxy-D-prolinol

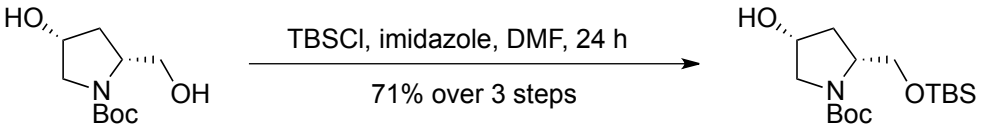


***N-boc-cis*-4-hydroxy-D-proline** ***N-boc-cis*-4-hydroxy-D-prolinol**

To a crude solution of ***N-boc-cis*-4-hydroxy-D-proline** (76.3 mmol) in THF (380 mL) at 0°C was slowly added BH3*DMS (10M in BH_3, 229 mmol, 23 mL). The solution was stirred overnight at room temperature. Then, the solution was quenched with a dropwise addition of

MeOH at 0 °C. The solvent was removed under reduced pressure and the residue of ***N-boc-cis*-4-hydroxy-D-prolinol** was taken without further purification in the next step.

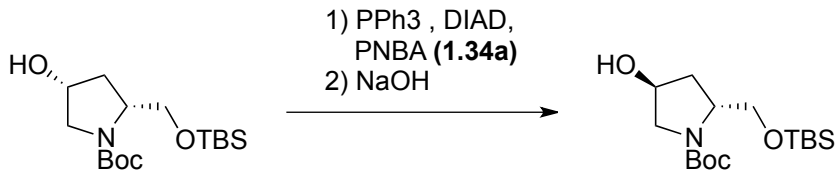
Cis-Boc-2-(*tert*-butyldimethylsilyloxymethyl)-4-hydroxypyrrolidine (1.34)



***N-boc-cis*-4-hydroxy-D-prolinol** (**1.34**)

To a crude solution of ***N-boc-cis*-4-hydroxy-D-prolinol** (76.3 mmol), Imidazole (10.4g , 152.6 mmol) and dry CH_2Cl_2 (0.2 M) was added TBDMSCl (12.7 g, 84 mmol) at 0°C under Ar atmosphere. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 12 h for completion as indicated by TLC. The reaction was diluted with Et_2O and the organic phase was washed with water 2 times and dried over $NaSO_4$. The solvent was removed under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 3:1) to give (**1.34**) (12.25 g, 71% over 3 steps) as a white solid. The [1] H-NMR and optical rotation data obtained was in agreement with the values previously reported by Aoyagi *et. al*.[1]

***Trans*-Boc-2-(*tert*-butyldimethylsilyloxymethyl)-4-hydroxypyrrolidine (1.30)**



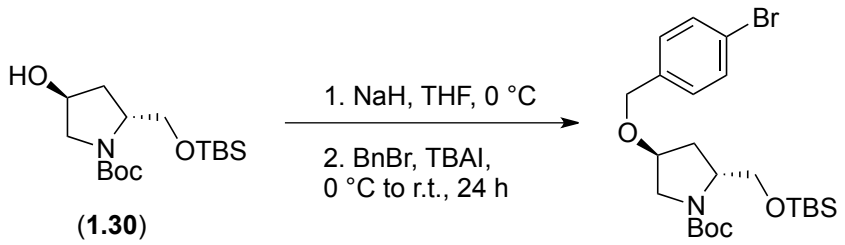
(**1.34**) **(1.30)**

To a solution of (**1.34**) (1.0 g, 3.0 mmol) in THF (15mL) cooled at 0 °C was added PPh_3 (875mg, 3.32 mmol), *p*-NitroBenzoicAcid (PNBA) (1.0 g, 6.04g) and Diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) (0.72 mL, 3.6 mmol). The solution is stirred at room temperature

[1] Aoyagi, Y. Williams, R. M.; *Tetrahedron*, **1998**, 54, 13045-13058.

overnight. The product is concentrated under reduce pressure and the residue purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 9:1) to give compound (**1.34a**) as a yellow oil. To a solution of (**1.34a**) in MeOH: THF (1: 1) at 0 °C was added a 2 M NaOH solution (1 mL). The solution is stirred at 0 °C for 3 h before H_2O was added. The organic phase and the water phase were separated and the water phase was extracted with CH_2Cl_2 3 times. The organic phases were combined, dried and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was then purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 3:1) to give (**1.30**) (863 mg, 86% over 2 steps) as a colorless oil. The ^{1}H-NMR and optical rotation data obtained were in agreement with the values previously reported by Zlatopolskiy *et. al*.[2]

Boc-4-((4-bromobenzyl)oxy)-2-(*tert*-butyldimethylsilyloxymethyl)-pyrrolidine (**1.31**)



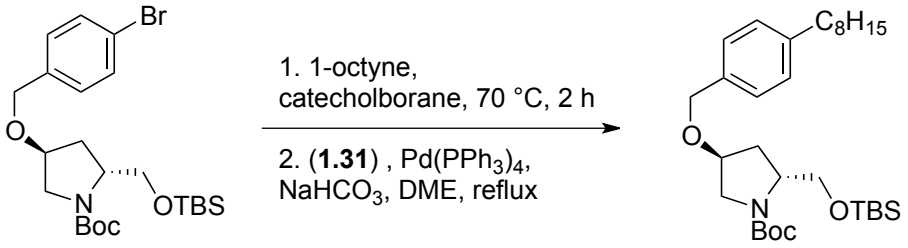
(**1.30**) (**1.31**)

Compound (**1.30**) (495 mg, 1.5 mmol) was dissolved in dry THF (10 mL), purged with Ar and cooled to 0°C before NaH (60% in mineral oil, 180 mg, 4.5 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min before 4-bromobenzyl bromide (562 mg, 2.25 mmol) and Tetrabutylamonnium iodide (TBAI) (55 mg, 0.15 mmol) were sequentially added. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and the mixture was stirred overnight. The reaction was quenched with water, diluted with EtOAc and washed with water and brine 2-3 times, dried over $NaSO_4$ and filtrated. The solvent was removed under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 9:1) to give (**1.31**) (578 mg, 77%) as a colorless oil.^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) 7.45 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.19

[2] Zlatopolskiy, B, D.; Kroll, H.; Melotto, E.; Meijere,. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4492-4502.

(d, J = 8.2 Hz, 2H), 4.55-4.33 (m, 2H), 4.28-4.09 (m, 1H), 4.08-3.85 (m, 2H), 3.75-3.33 (m, 3H), 2.28 -2.11 (m, 1H), 2.10- 1.94 (m, 1H), 1.54-1.37 (m, 9H), 0.85 (s, 9H), 0.01 (brs, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) 154.7, 154.5, 137.4, 131.7, 129.4, 129.3, 121.6, 79.6, 79.4, 76.5, 70.5, 64.4, 63.6, 57.8, 52.5, 51.7, 35.2, 34.1, 28.7, 27.4, 26.0, 18.3, -5.3; $[\alpha]_D$ +23.2 (c = 2.17, $CHCl_3$); HRMS calcd. for $C_{23}H_{38}BrNNaO_4Si$: 522.16457, found 522.16551.

Boc-4-((4-octenylbenzyl)oxy)-2-(*tert*-butyldimethylsilyloxymethyl)-pyrrolidine (1.32)

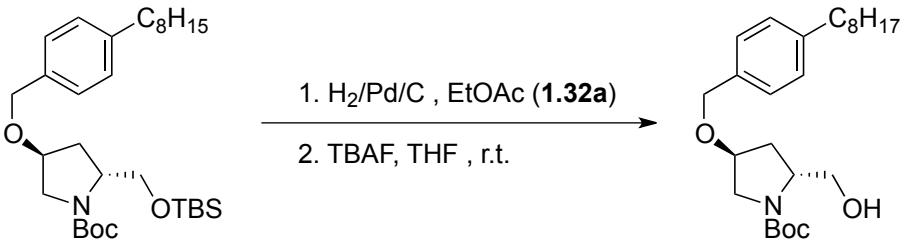


(**1.31**) (**1.32**)

A solution of 1-octyne (1.0 mL, 6.85 mmol) and cathecolborane (1.0 M in THF, 8 mL, 7.99 mmol) was refluxed at 90 °C for 2 hours under Ar atmosphere. The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature before a solution of (**1.31**) (1.14 g, 2.28 mmol) in DME (23 mL) was added to the reaction mixture followed by $Pd(PPh_3)_4$ (100 mg) and 1M $NaHCO_3$ (aq.) (23 mL). The reaction mixture was refluxed with vigorous stirring over night (4-6 hours). The mixture was cooled down to room temperature and a brine solution was added. The mixture was extracted 3 times with Et_2O and the combined organic layers were dried over $NaSO_4$ and filtrated. The solvent was removed under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 9:1) to give (**1.32**) (1.09 g, 88%) as a colorless oil. The ^{1}H-NMR and optical rotation data obtained were in agreement with the values previously reported by Hanessian et *al*.[3]

[3] Hanessian, S.; *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, 4, 969-973

Boc-4-((4-octenylbenzyl)oxy)-2-(hydroxymethyl)-pyrrolidine (1.33)



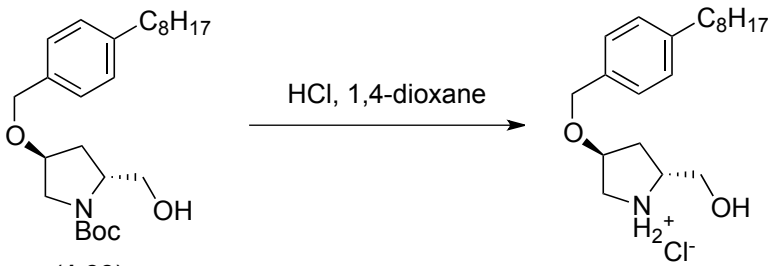
(**1.32**) (**1.33**)

Compound (**1.32**) (1.09 g, 2.05 mmol) was dissolved in EtOAc and Pd/C (10%) was added. The air was pumped out of the flask and replaced by H_2. Upon completion as indicated by MS (3-4 hours), the reaction was stopped and the reaction mixture was filtered through Celite. The solvent was removed under reduced pressure to give (**1.32a**) (1.06 mg, 98%) as a yellow oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 7.23 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.14 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 4.54-4.39 (m, 2H), 4.28-4.16 (m, 1H), 4.05-3.86 (m, 2H), 3.72-3.49 (m, 2H), 3.48-3.37 (m, 1H), 2.63-2.55 (m, 2H), 2.23-2.14 (m, 1H), 2.12-1.97 (m, 1H), 1.63-1.54 (m, 2H), 1.46, 1.45 (s, 9H), 1.36-1.22 (m, 10H), 0.93-0.83 (m, 12H), 0.06- -0.02 (m, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) 154.7, 142.6, 135.5, 129.0, 128.6, 128.4, 128.0, 127.9, 79.5, 79.2, 76.1, 71.2, 71.1, 64.5, 63.6, 57.8, 57.7, 52.5, 51.8, 35.8, 35.3, 34.1, 29.6, 29.5, 29.4, 28.7, 26.1, 22.8, 18.3, 14.2, -5.3; $[\alpha]_D$ +21.2 (c = 0.17, $CHCl_3$); HRMS calcd. for $C_{31}H_{55}NNaO_4Si$: 556.37926, found 556.38076.

Then, to a crude solution of (**1.32a**) in dry THF (45 mL) was added TBAF (1.0 M in THF, 3.52 mL, 3.51 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 3 hours. When no more starting material was visible on TLC the reaction mixture was quenched with $NaHCO_3$ (sat.) and extracted 3 times with CH_2Cl_2. The organic layers were combined, dried over $NaSO_4$ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 6:4) to give the alcohol (**1.33**) (720 mg, 1.72 mmol, 88% over 2 steps) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 7.22 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.15 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.54-4.40 (m, 2H), 4.19-4.08 (m, 1H), 4.09-4.00 (m, 1H),

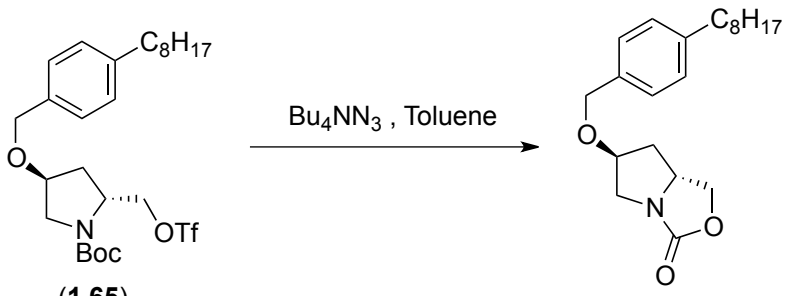
3.78-3.59 (m, 2H), 3.55 (dd, J = 11.4, 7.2 Hz, 1H), 3.46-3.33 (m, 1H), 2.62-2.54 (m, 2H), 2.23-2.13 (m, 1H), 1.66-1.53 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.35-1.22 (m, 10H), 0.91-0.85 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) 157.2, 142.8, 135.1, 128.7, 127.8, 80.7, 76.0, 70.9, 67.4, 59.3, 53.1, 35.8, 34.7, 32.0, 31.7, 29.6, 29.5, 29.4, 28.6, 22.8, 14.2 ; $[\alpha]_D$ +20.32 (c = 1.3, $CHCl_3$); HRMS calcd. for $C_{25}H_{41}NNaO_4$: 442.29278, found 442.29391.

2-(Hydroxymethyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)-pyrrolidine hydrochloride salt (1.20)



Compound (**1.33**) (60 mg, 0.14 mmol) was dissolved in 4 M HCl in dioxane (1 mL) and stirred 1-2 hours. TLC analysis of the crude mixture showed only the desired compound. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in pure dioxane and the solvent was evaporated again. The residue was purified by flash chromatography (EtOH: CH_2Cl_2, 1:9) to give (**1.20**) (25 mg, 50% yield) as a white solid. The compound can also be crashed in Et_2O at 0 °C to afford a white solid. ^{1}H NMR (400 MHz, MeOD) 7.27 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.17 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.53 (s, 2H), 4.39-4.33 (m, 1H), 3.95-3.83 (m, 2H), 3.63 (dd, J = 11.8, 6.4 Hz, 1H), 3.46-3.32 (m, 2H), 2.64-2.56 (m, 2H), 2.30 (dd, J = 13.9, 6.6 Hz, 1H), 1.91 (ddd, J = 14.7, 10.5, 4.5 Hz, 1H), 1.66-1.54 (m, 2H), 1.37-1.20 (m, 10H), 0.89 (t, J = 6.9 Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) 143.9, 136.2, 129.5, 129.1, 78.4, 71.9, 61.5, 61.3, 51.8, 36.6, 33.6, 33.0, 32.7, 30.6, 30.4, 30.3, 23.7, 14.4; $[\alpha]_D$ -4.62 (c = 0.26, MeOH); HRMS calcd. for $C_{20}H_{34}NO_2$: 320.25841, found 320.25937

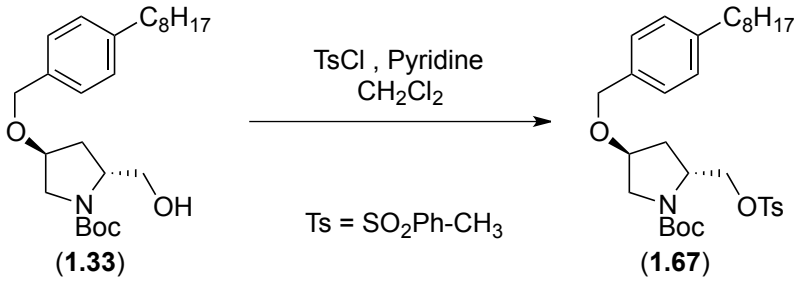
(6*S*,7a*R*)-6-((4-Octylbenzyl)oxy)tetrahydropyrrolo[1,2-*c*]oxazol-3(1*H*)-one (1.66)



(**1.65**) (**1.66**)

To a solution of (**1.65**) (18 mg, 0.033 mmol) in toluene (2 mL) was added tetrabutylammonium azide (14.1 mg, 0.05 mmol). The mixture is stirred at r.t. overnight. No reaction was observe so the mixture was heated to 60 °C for another 12 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 6:14) to give (**1.66**) (8.4 mg, 74%) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.2 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.2 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.5 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.5 (s, 2H), 4.3 (td, *J* = 5.9, 1.7 Hz, 1H), 4.2 – 4.1 (m, 2H), 3.9 (dd, *J* = 12.7, 5.9 Hz, 1H), 3.2 (dd, *J* = 12.7, 2.4 Hz, 1H), 2.7 – 2.5 (m, 2H), 2.2 (dd, *J* = 13.2, 5.4 Hz, 1H), 1.7 – 1.5 (m, 2H), 1.4 – 1.2 (m, 4H), 0.9 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 143.0, 134.8, 128.7, 127.9, 79.4, 77.2, 71.5, 67.3, 58.0, 53.2, 37.6, 35.8, 34.6, 32.0, 31.6, 29.6, 29.5, 29.4, 27.1, 22.8, 14.3. ; IR (neat, cm^{-1}) 2933, 2865, 2365, 1736. ; $[\alpha]_D$ +16.0 (c = 1, $CHCl_3$); HRMS calcd. for $C_{21}H_{31}NO_3$: 346.2377, found 346.2387.

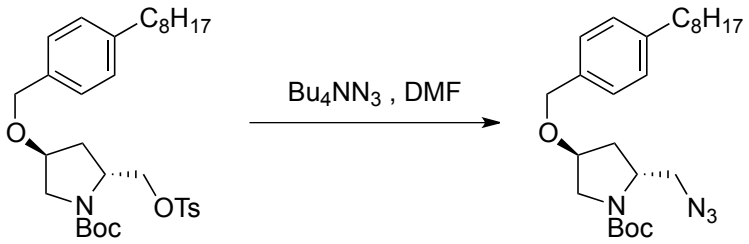
(2*R*,4*S*)-*Tert*-butyl 4-((4-octylbenzyl)oxy)-2-((tosyloxy)methyl)pyrrolidine-1-carboxylate (1.67)



(**1.33**) (**1.67**)

To a solution of (**1.33**) (33 mg, 0.079 mmol) in CH_2Cl_2 (2.5 mL) and dry pyridine (26 uL, 0.358 mmol) was added TsCl (30.1 mg, 0.158 mmol) at 0 °C. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and the mixture was stirred overnight. To this mixture was added HCl 2N to quench the reaction, then the organic phase and the water phase were separated and the water phase was extracted with CH_2Cl_2 2 more times. The organic phases were combined, dried and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 8:2) to give (**1.67**) (42.5 mg, 0.074 mmol, 94 %) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.7 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.3 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 7.2 – 7.1 (m, 4H), 4.4 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.2 – 4.0 (m, 3H), 3.8 – 3.6 (m, 1H), 3.6 – 3.4 (m, 1H), 3.4 – 3.2 (m, 1H), 2.6 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.4 (d, *J* = 6.6 Hz, 4H), 2.3 (d, *J* = 5.5 Hz, 0H), 2.2 – 2.0 (m, 2H), 1.6 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.5 – 1.2 (m, 22H), 0.9 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 142.3, 132.4, 129.5, 128.1, 127.5, 127.4, 127.4, 76.0, 75.2, 70.7, 70.6, 70.1, 69.9, 69.2, 54.4, 54.3, 53.2, 35.3, 31.5, 31.1, 29.1, 28.9, 28.9, 28.0, 27.9, 22.3, 21.2, 13.7. ; IR (neat, cm^{-1}) 2932, 2863, 1699, 1396, 1368. ; $[\alpha]_D$ +16.1 (c = 1, $CHCl_3$); HRMS calcd. for $C_{32}H_{47}NO_6S$: 596.3016, found 596.3040.

(2*R*,4*S*)-*Tert*-butyl 2-(azidomethyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidine-1-carboxylate (1.68)

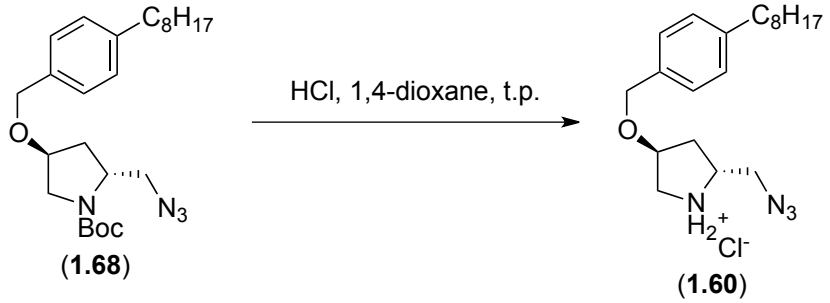


(**1.67**) (**1.68**)

To a solution of (**1.67**) (42.5 mg, 0.074 mmol) was dissolved in DMF (1.4 mL) and tetrabutylammonium azide (215 mg, 0.74 mmol) was added. The mixture is stirred at r.t. overnight. To this mixture was added H_2O to quench the reaction, then the organic phase and the water phase were separated and the water phase was extracted with Et_2O 3 more times. The organic phases were combined, dried and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 9:1)

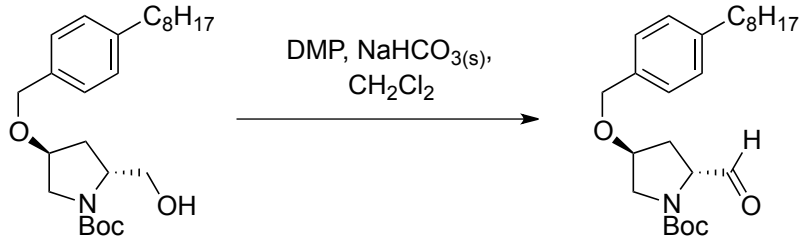
to give (**1.68**) (18.4 mg, 57 %) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.2 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.2 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.5 – 4.4 (m, 2H), 4.2 – 4.0 (m, 2H), 4.0 – 3.8 (m, 1H), 3.6 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 3.5 – 3.2 (m, 2H), 2.6 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.3 – 2.1 (m, 1H), 2.0 (dt, *J* = 12.9, 6.0 Hz, 1H), 1.7 – 1.6 (m, 3H), 1.5 (d, *J* = 9.4 Hz, 9H), 1.3 (d, *J* = 15.1 Hz, 11H), 0.9 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H). ; For ^{13}C data see deprotected compound (**1.60**) ; IR (neat, cm^{-1}) 2932, 2861, 2105, 1698, 1395. ; $[\alpha]_D$ -11.5 (c = 1, $CHCl_3$); HRMS calcd. for $C_{25}H_{40}N_4NaO_3$: 467.2993, found 467.3003.

(2*R*,4*S*)-2-(Azidomethyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidin-1-ium chloride (**1.60**)



Compound (**1.68**) (18 mg, 0.041 mmol) was dissolved in 4 M HCl in dioxane (1 mL) and stirred 1-2 hours. TLC analysis of the crude mixture showed only the desired compound. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in pure dioxane and the solvent was evaporated again. The residue was crashed in Et_2O at 0 °C to afford a white solid (**1.60**) (8 mg, 50 %). ^{1}H NMR (400 MHz, Deuterium Oxide) δ 7.2 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.0 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.5 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.3 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.2 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 3.9 – 3.5 (m, 3H), 3.5 – 3.2 (m, 2H), 2.4 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.1 – 2.0 (m, 1H), 1.7 (td, *J* = 10.0, 9.6, 5.2 Hz, 1H), 1.5 (s, 2H), 1.3 (s, 10H), 0.9 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 143.1, 134.1, 128.8, 128.1, 77.2, 76.0, 71.2, 57.7, 51.0, 50.3, 35.8, 35.1, 32.0, 31.6, 29.6, 29.5, 29.4, 22.8, 14.3. ; IR (neat, cm^{-1}) 2922, 2853, 2106, 1290, 1079. ; $[\alpha]_D$ -4.8 (c = 1, $CHCl_3$); HRMS calcd. for $C_{20}H_{32}N_4NaO$: 367.2468, found 367.2471.

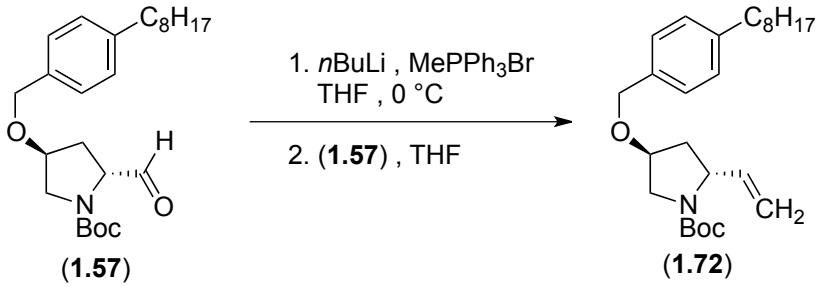
(2*R*,4*S*)-*Tert*-butyl 2-formyl-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidine-1-carboxylate (1.57)



(**1.33**) (**1.57**)

To a solution of (**1.33**) (43 mg, 0.103 mmol) in CH_2Cl_2 (0.5 mL) was added solid $NaHCO_3$ (43 mg). Then DMP (57 mg, 0.133 mmol) was slowly added at 0 °C and the mixture was stirred from 0 °C to r.t. until TLC show complete disappearance of the starting material (3 h). The excess DMP is quench with an aqueous solution of sodium thiosulfate (1N) and the water the water phase was extracted with DCM 3 times. The organic phases were combined, dried and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 8:2) to give (**1.57**) (42.3 mg, 98 %) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.5 (d, *J* = 45.9, 3.8 Hz, 1H), 7.2 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.2 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.5 (t, *J* = 10.4 Hz, 2H), 4.4 – 4.2 (m, 1H), 4.1 (s, 1H), 3.8 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 3.6 – 3.4 (m, 2H), 2.6 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.4 – 2.1 (m, 1H), 2.0 – 1.8 (m, 1H), 1.6 (h, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.4 (d, *J* = 16.3 Hz, 9H), 1.3 – 1.2 (m, 12H), 0.9 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 200.0, 199.7, 154.1, 142.9, 134.8, 128.7, 127.9, 127.9, 81.2, 80.7, 77.2, 76.7, 75.8, 71.2, 71.1, 63.8, 63.5, 52.5, 52.1, 35.8, 33.7, 32.4, 32.0, 31.6, 29.6, 29.5, 29.4, 28.5, 28.4, 22.8, 14.2. ; IR (neat, cm^{-1}) 2923, 2855, 1736, 1695, 1512, 1458, 1392. ; $[\alpha]_D$ +38.1 (c = 1, $CHCl_3$)

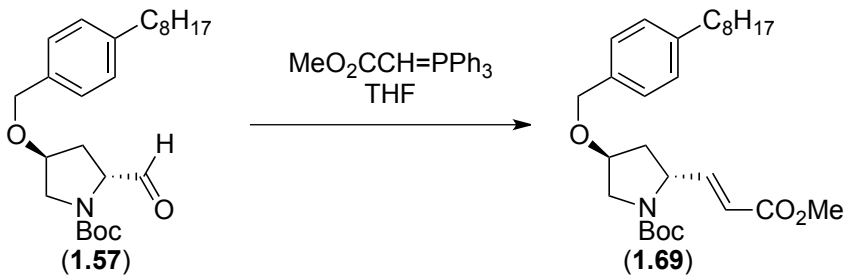
(2*R*,4*S*)-*Tert*-butyl 4-((4-octylbenzyl)oxy)-2-vinylpyrrolidine-1-carboxylate (1.72)



(**1.57**) (**1.72**)

$MePPh_3Br$ (60 mg, 0.168 mmol) is dissolved in dry THF (0.5 mL) then a solution of nBuLi (0.06 mL, 015 mmol, 2.5 M in hexane) was slowly added at 0 °C. The mixture is stirred until a yellow colored is seen (15 min). Then to this mixture was slowly added a solution of aldehyde **1.57** (20 mg, 0.048 mmol) in THF (0.75 mL) at 0 °C. The mixture is stirred from 0 °C to r.t. overnight. Then, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 7:3) to give (**1.72**) (12.5 mg, 18 %) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.2 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.1 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 5.7 (s, 1H), 5.2 – 4.9 (m, 2H), 4.6 – 4.2 (m, 3H), 4.1 (p, *J* = 4.8 Hz, 1H), 3.8 – 3.4 (m, 2H), 2.7 – 2.5 (m, 2H), 2.3 – 2.1 (m, 1H), 1.9 (dt, *J* = 12.3, 5.7 Hz, 1H), 1.6 (q, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.4 (s, 9H), 1.3 – 1.2 (m,121H), 0.9 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 142.6, 142.5, 135.1, 128.4, 128.4, 127.7, 114.1, 79.5, 71.1, 35.7, 31.9, 31.9, 31.5, 29.7, 29.5, 29.3, 29.3, 28.4, 22.7, 22.7, 14.2, 14.1. ; IR (neat, cm^{-1}) 2921, 2853, 1695 ; $[\alpha]_D$ -5.8 (c = 1, $CHCl_3$); HRMS calcd. for C26H41NNaO3: 438.2979, found 438.2995.

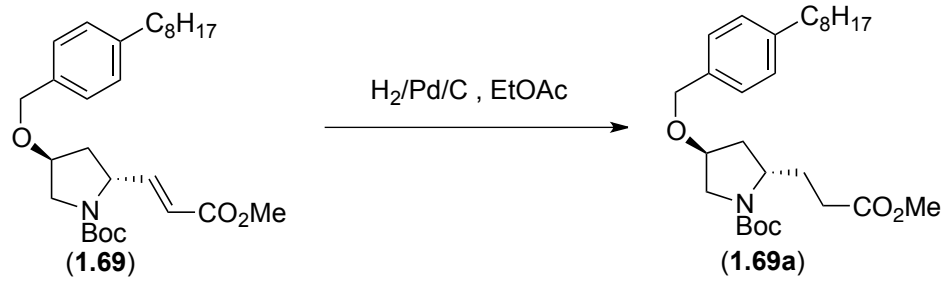
(2*R*,4*S*)-*Tert*-butyl 2-((*E*)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidine-1-carboxylate (1.69)



To a solution of (**1.57**) (16.5 mg, 0.048 mmol) in THF (0.5 mL) was added $MeO_2CCH=PPh_3$ (17.7 mg, 0.053 mmol) . This mixture is stirred at r.t. for 12 h. Then, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 7:3) to give (**1.69**) (12 mg, 54 %) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.2 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.1 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.9 – 6.7 (m, 1H), 5.9 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 4.8 – 4.3 (m, 3H), 4.1 – 4.0 (m, 1H), 3.7 (s, 3H), 3.7 – 3.4 (m, 2H), 3.0 – 2.4 (m, 2H), 2.2 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 1.9 (q, *J* = 5.9 Hz, 1H), 1.6 – 1.6 (m, 2H), 1.5 – 1.4 (m, 9H), 1.3 (dd, *J* = 12.8, 5.9 Hz, 11H), 0.9 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 166.9, 154.7, 142.8, 135.0, 128.7, 127.9, 120.2, 80.2, 77.2, 75.7, 71.1, 57.1, 51.7, 51.4, 35.8, 32.0, 31.6,

29.6, 29.4, 29.4, 28.5, 22.8, 14.2. ; IR (neat, cm^{-1}) 2922, 2853, 1725, 1698, 1458, 1390. ; $[\alpha]_D$ +15.3 (c = 1, $CHCl_3$); HRMS calcd. for C28H43NNaO5: 496.3033, found 496.3033.

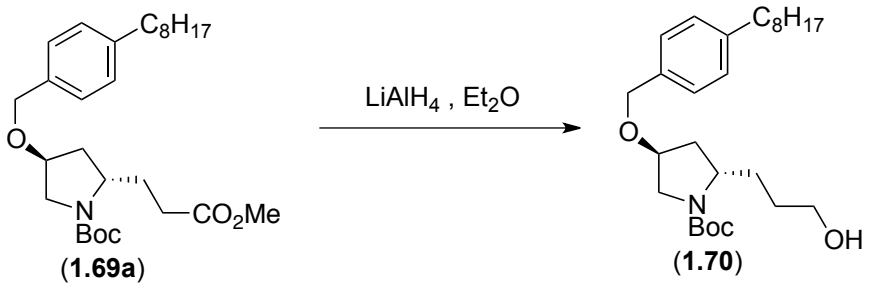
(2*S*,4*S*)-*Tert*-butyl 2-(3-methoxy-3-oxopropyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidine-1-carboxylate (1.69a)



(**1.69**) (**1.69a**)

First, compound (**1.69**) (118 mg, 0.248 mmol) was dissolved in EtOAc (2.5 mL) then Pd/C (11.8 mg, 10 w%) was added. The air was pumped out of the flask and replaced by H_2. Upon completion as indicated by MS (3-4 hours), the reaction was stopped and the mixture was filtered through Celite. The solvent was removed under reduced pressure to give (**1.69a**) (116.5 mg, 98 %) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.2 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.1 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.4 (d, *J* = 16.3 Hz, 2H), 4.1 (s, 1H), 4.0 – 3.8 (m, 2H), 3.7 (s, 3H), 3.3 (s, 1H), 2.6 (t, *J* = 8.3 Hz, 2H), 2.3 (s, 2H), 2.2 – 2.0 (m, 2H), 1.8 – 1.7 (m, 2H), 1.6 – 1.6 (m, 3H), 1.5 (s, 10H), 1.3 (d, *J* = 14.2 Hz, 12H), 0.9 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 173.8, 155.1, 142.7, 135.2, 128.6, 128.6, 127.9, 127.2, 79.7, 77.2, 76.1, 71.0, 55.6, 51.7, 35.8, 32.0, 31.6, 29.6, 29.4, 29.4, 28.6, 22.8, 14.2. ; IR (neat, cm^{-1}) 2924, 2855, 1738, 1692, 1390. ; $[\alpha]_D$ +10.3 (c = 1, $CHCl_3$); HRMS calcd. for C28H45NNaO5: 498.3189, found 498.3193.

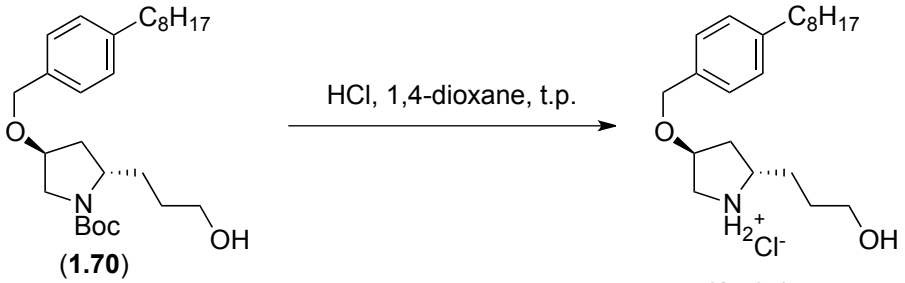
(2*S*,4*S*)-*Tert*-butyl 2-(3-hydroxypropyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidine-1-carboxylate (1.70)



(**1.69a**) (**1.70**)

Compound (**1.69a**) (65 mg, 0.136 mmol) was dissolved in dry Et_2O (1.5 mL) and put at 0 °C. To this solution was slowly added LAH (5mg, 0.136 mmol). The mixture is stirred for 15 min before wet Na_2SO4 is added. The ether is then remove carefully. The solid is washed 3 times with ether. The combined ether fractions are evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 6:4) to give (**1.70**) (50 mg, 82 %) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.2 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.1 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 4.5 (s, 2H), 4.1 – 4.1 (m, 1H), 4.0 – 3.9 (m, 1H), 3.6 (s, 2H), 3.5 (dd, *J* = 54.4, 13.6 Hz, 2H), 2.6 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.2 (dd, *J* = 14.0, 5.8 Hz, 1H), 2.0 – 1.7 (m, 2H), 1.6 (q, *J* = 7.7 Hz, 3H), 1.5 (s, 10H), 1.3 (d, *J* = 14.9 Hz, 11H), 0.9 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 155.1, 142.7, 135.3, 128.6, 127.8, 79.5, 77.2, 71.1, 62.6, 39.8, 38.5, 37.1, 35.8, 32.0, 31.6, 29.6, 29.4, 29.4, 28.9, 28.6, 22.8, 14.2. ; IR (neat, cm^{-1}) 2924, 2856, 1688, 1456, 1397. ; $[\alpha]_D$ +11.3 (c = 1, $CHCl_3$); HRMS calcd. for C27H45NNaO4: 470.3241, found 470.3241.

(2*S*,4*S*)-2-(3-Hydroxypropyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidin-1-ium chloride (**1.70a**)

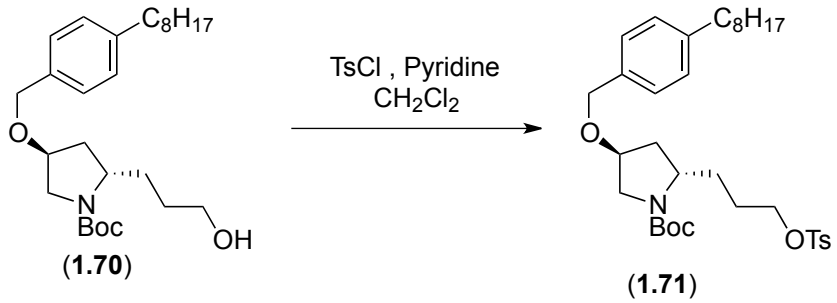


(**1.70**) (**1.70a**)

Compound (**1.70**) (18 mg, 0.04 mmol) was dissolved in 4 M HCl in dioxane (1 mL) and stirred 1-2 hours. TLC analysis of the crude mixture showed only the desired compound. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in pure dioxane and the solvent was evaporated again.The residue was crashed in Et_2O at 0 °C to afford a white solid (**1.70a**) (15.7 mg, 99 %). ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 6.8 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 6.7 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.0 (t, 2H), 3.9 (t, *J* = 4.6 Hz, 1H), 3.1 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.0 – 2.9 (m, 2H), 2.8 – 2.8 (m, 1H), 2.1 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.9 (dd, *J* = 13.9, 6.1 Hz,1H), 1.4 – 1.3 (m, 2H), 1.3 (ddd, *J* = 15.2, 11.5, 4.5 Hz, 1H), 1.2 – 1.1 (m, 3H), 1.0 – 0.8 (m, 10H), 0.4 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H). ; ^{13}C

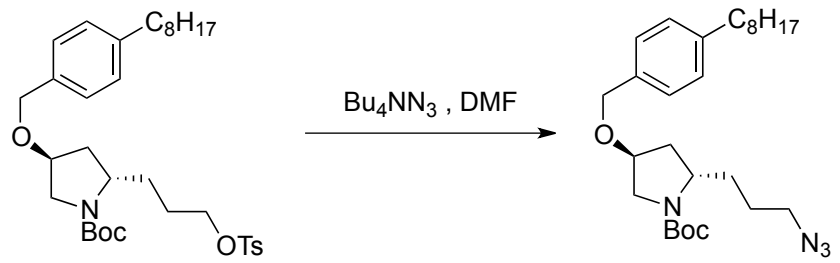
NMR (101 MHz, MeOD) δ 143.9, 136.2, 129.5, 129.1, 78.1, 71.9, 62.0, 60.5, 51.6, 49.0, 37.9, 36.6, 33.0, 32.7, 30.6, 30.4, 30.3, 30.0, 23.7, 14.4. ; IR (neat, cm^{-1}) 3380, 2925, 2854. ; $[\alpha]_D$ +2.3 (c = 1, $CHCl_3$); HRMS calcd. for C22H38NO2: 348.2897, found 348.2908.

(2*S*,4*S*)-*Tert*-butyl 4-((4-octylbenzyl)oxy)-2-(3-(tosyloxy)propyl)pyrrolidine-1-carboxylate (1.71)



To a solution of (**1.70**) (30 mg, 0.067 mmol) in CH_2Cl_2 (2.1 mL) and dry pyridine (44 uL, 0.268 mmol) was added TsCl (51 mg, 0.268 mmol) at 0 °C. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and the mixture was stirred overnight. To this mixture was added HCl 2N to quench the reaction, then the organic phase and the water phase were separated and the water phase was extracted with CH_2Cl_2 2 more times. The organic phases were combined, dried and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 8:2) to give (**1.71**) (35 mg, 86 %) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.8 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.3 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.2 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.1 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.5 – 4.4 (m, 2H), 4.1 – 4.0 (m, 3H), 3.9 – 3.8 (m, 2H), 3.6 – 3.1 (m, 2H), 2.6 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.4 (s, 3H), 2.1 (s, 1H), 1.9 – 1.5 (m, 4H), 1.4 (s, 10H), 1.3 – 1.2 (m, 10H), 0.9 (t, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 155.0, 142.7, 135.2, 133.3, 130.0, 128.6, 128.0, 79.5, 77.2, 71.1, 55.6, 35.8, 32.0, 31.7, 29.6, 29.5, 29.4, 28.6, 22.8, 21.8, 14.2. ; IR (neat, cm^{-1}) 2923, 2855, 1690, 1456, 1393. ; $[\alpha]_D$ +11.1 (c = 1, $CHCl_3$); HRMS calcd. for C34H51NNaO6S: 624.3329, found 624.3327.

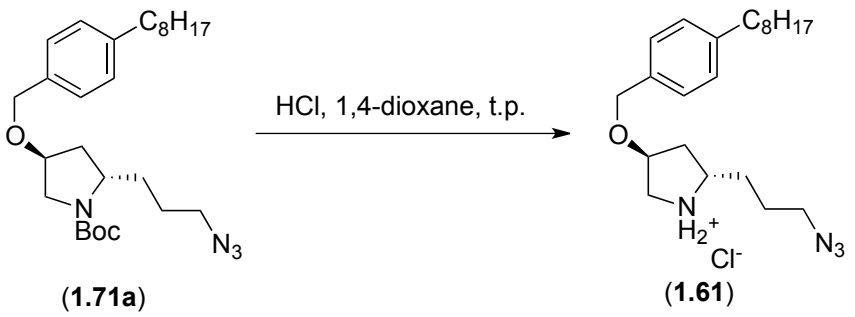
(2*S*,4*S*)-*Tert*-butyl 2-(3-azidopropyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidine-1-carboxylate (1.71a)



(**1.71**) (**1.71a**)

To a solution of (**1.71**) (20 mg, 0.033 mmol) was dissolved in DMF (0.5 mL) and tetrabutylammonium azide (100 mg, 0.33 mmol) was added. The mixture is stirred at r.t. overnight. To this mixture was added H_2O to quench the reaction, then the organic phase and the water phase were separated and the water phase was extracted with Et_2O 3 more times. The organic phases were combined, dried and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 9:1) to give (**1.71a**) (12.6 mg, 82 %) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.2 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.1 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.5 (s, 2H), 4.1 – 4.1 (m, 1H), 4.0 – 3.7 (m, 2H), 3.6 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H), 3.3 (dt, *J* = 26.1, 5.5 Hz, 3H), 2.7 – 2.5 (m, 2H), 2.2 (dd, *J* = 11.8, 7.7 Hz, 1H), 2.0 – 1.7 (m, 2H), 1.6 (s, 5H), 1.5 (s, 11H), 1.3 – 1.2 (m, 11H), 0.9 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 142.7, 135.3, 128.6, 127.9, 77.2, 55.8, 51.5, 35.8, 32.0, 31.7, 29.6, 29.5, 29.4, 28.7, 22.8, 14.3. ; IR (neat, cm^{-1}) 2926, 2856, 2095, 1693, 1392. ; $[\alpha]_D$ +17.5 (c = 1, $CHCl_3$); HRMS calcd. for C27H44N4NaO3: 495.3306, found 495.3321.

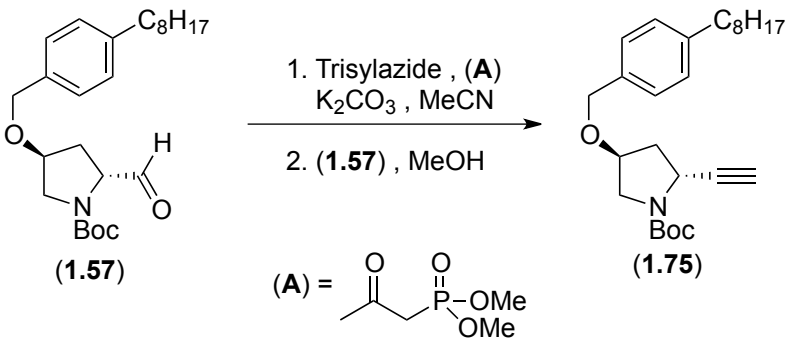
(2*S*,4*S*)-*Tert*-butyl 2-(3-azidopropyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidine-1-carboxylate (1.61)



(**1.71a**) (**1.61**)

Compound (**1.71a**) (12.6 mg, 0.028 mmol) was dissolved in 4 M HCl in dioxane (1 mL) and stirred 1-2 hours. TLC analysis of the crude mixture showed only the desired compound. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in pure dioxane and the solvent was evaporated again. The residue was crashed in Et_2O at 0 °C to afford a white solid (**1.61**) (11 mg, 98 %). ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.3 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.2 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 4.5 (s, 2H), 4.4 (s, 1H), 3.4 (dd, J = 11.7, 4.8 Hz, 4H), 3.3 (s, 1H), 2.6 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.5 (dd, J = 13.9, 6.1 Hz, 1H), 2.0 – 1.5 (m, 8H), 1.3 – 1.3 (m, 12H), 0.9 (t, J = 6.6 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 143.9, 136.2, 129.5, 129.1, 78.1, 72.0, 60.2, 52.0, 51.7, 37.8, 36.6, 33.0, 32.7, 30.3, 27.2, 23.7, 14.4. ; IR (neat, cm^{-1}) 2931, 2863, 2699, 2100, 1703. ; $[\alpha]_D$ +3.1 (c = 1, MeOH); HRMS calcd. for C22H37N4O: 373.2962, found 373.2976.

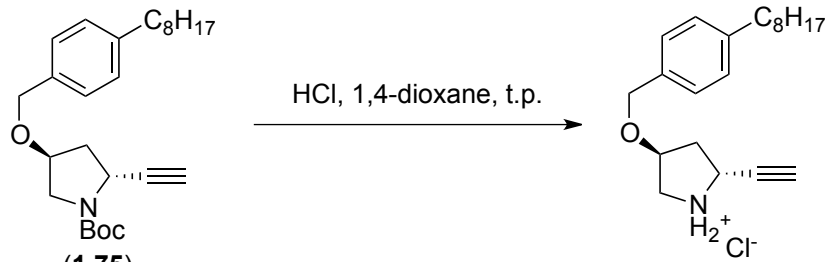
(2*R*,4*S*)-*Tert*-butyl 2-ethynyl-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidine-1-carboxylate (1.75)



(**1.57**) (**1.75**)

First, compound (**A**) (11.6 uL, 0.084 mmol) was added to a suspension of K_2CO_3 (29 mg, 0.21 mmol) and trisylazide (26 mg, 0.084 mmol) in MeCN (1 mL). The mixture was stirred at r.t. for 2 hours before a solution of (**1.57**) (30 mg, 0.07 mmol) in MeOH (0.2 mL) was added. This mixture is stirred overnight at r.t. The solvent was evaporated and the residue was dissolve in Et_2O. The organic phase was washed 2 times with water and 2 times with brine. The organic phase was dried and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 9:1) to give (**1.75**) (11 mg, 38 %) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.3 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.2 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 4.5 (s, 2H), 4.4 (s, 1H), 3.4 (dd, J = 11.7, 4.8 Hz, 4H), 3.3 (s, 1H), 2.6 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.5 (dd, J = 13.9, 6.1 Hz, 1H), 2.0 – 1.5 (m, 8H), 1.3 – 1.3 (m, 12H), 0.9 (t, J = 6.6 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 143.9, 136.2, 129.5, 129.1, 78.1, 72.0, 60.2, 52.0, 51.7, 37.8, 36.6, 33.0, 32.7, 30.3, 27.2, 23.7, 14.4. ; IR (neat, cm^{-1}) 2964, 2936, 2861, 2357, 1701, 1400. ; $[\alpha]_D$ +28.6 (c = 1, $CHCl_3$); HRMS calcd. for C26H39NO3: 436.2822, found 436.2828.

(2*R*,4*S*)-2-Ethynyl-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidin-1-ium chloride (**1.62**)

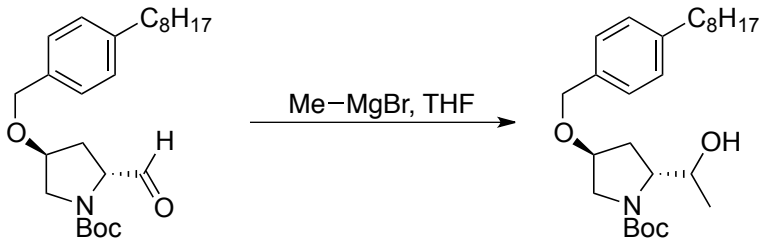


(**1.75**) (**1.62**)

Compound (**1.75**) (11 mg, 0.027 mmol) was dissolved in 4 M HCl in dioxane (1 mL) and stirred 1-2 hours. TLC analysis of the crude mixture showed only the desired compound. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in pure dioxane and the solvent was evaporated again. The residue was crashed in Et_2O at 0 °C to afford a white solid (**1.62**) (9.4 mg, 95 %). ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.3 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.2 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 4.6 (d, J = 10.9 Hz, 2H), 4.4 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 3.5 (dd, J = 12.7, 4.4 Hz, 1H), 3.5 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 3.4 (d, 1H), 2.6 (dt, J = 19.7, 7.0 Hz, 3H), 2.2 (ddd, J = 14.6, 10.1, 4.5 Hz, 1H), 1.6 (p, J = 7.6 Hz, 2H), 1.3 (dd, J = 10.3, 4.1 Hz, 11H), 0.9 (t, J = 6.7 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 143.7, 135.7, 129.3, 128.9, 78.8, 77.4, 71.8, 51.6, 49.0, 39.1, 36.3, 32.7, 32.4,

30.3, 30.1, 23.4, 14.1. ; IR (neat, cm^{-1}) 2926, 2861, 2711, 1082. ; $[\alpha]_D$ -2.4 (c = 1, MeOH); HRMS calcd. for C21H33NO: 314.2286, found 314.2286.

(2*R*,4*S*)-*Tert*-butyl 2-((*S*)-1-hydroxyethyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidine-1-carboxylate (1.74)

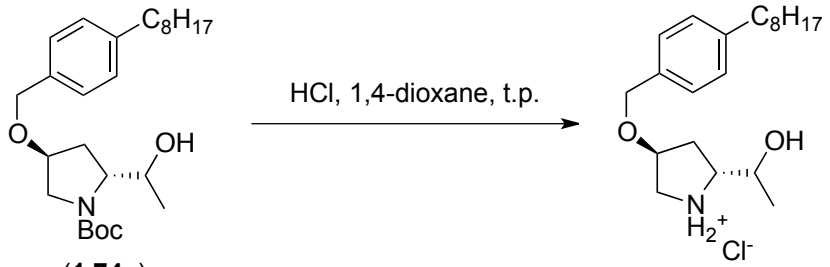


(**1.57**) (**1.74**)

The aldehyde **1.57** (62 mg, 0.149 mmol) was dissolved in dry THF (1 mL) then at -78 °C the methyl grignard (0.24 mL, 0.74 mmol, 3M in Et_2O) was added slowly. The mixture is slowly warmed to r.t. then H_2O was added to quench the reaction, then the organic phase and the water phase were separated and the water phase was extracted with Et_2O 3 more times. The organic phases were combined, dried and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2: Acetone, 9.75:0.25) to give one dia. (**1.74a**) (26 mg, 40 %) as a colorless oil ; ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.2 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.1 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.6 (s, 1H), 4.5 (s, 2H), 4.2 – 3.7 (m, 4H), 3.3 – 3.2 (m,1H), 2.6 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.2 – 2.0 (m, 1H), 1.9 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 1.6 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.5 (d, *J* = 5.0 Hz, 9H), 1.4 – 1.3 (m, 10H), 1.1 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.9 (t, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 141.8, 135.0, 127.7, 127.2, 79.6, 76.4, 69.9, 69.1, 67.5, 60.9, 60.1, 52.0, 51.4, 34.8, 34.8, 32.6, 32.3, 31.2, 31.2, 30.9, 30.9, 28.8, 28.8, 28.6, 28.6, 28.5, 28.5, 26.9, 26.9, 21.9, 21.9, 17.0, 16.2, 12.7, 12.6. ; IR (neat, cm^{-1}) 3415, 2927, 2862, 1671, 1405. ; $[\alpha]_D$ +13.4 (c = 1, MeOH); HRMS calcd. for C26H43NNaO4: 456.3084, found 456.3084. and another dia. (**1.74b**) (21.3 mg, 35%) also as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.2 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.1 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.6 (s, 1H), 4.5 (s, 2H), 4.2 – 3.7 (m, 4H), 3.3 – 3.2 (m,1H), 2.6 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.2 – 2.0 (m, 1H), 1.9 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 1.6 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.5 (d, *J* = 5.0 Hz, 9H), 1.4 – 1.3 (m, 10H), 1.1 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.9 (t, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 157.2, 156.9, 143.6, 136.9, 136.8, 129.4, 129.0, 128.9, 81.1,

81.0, 78.5, 78.1, 71.8, 71.7, 68.2, 67.9, 63.2, 63.1, 53.8, 52.9, 49.0, 36.6, 33.0, 32.7, 31.9, 31.7, 30.6, 30.4, 30.4, 30.3, 28.8, 28.7, 23.7, 19.8, 19.3, 14.4. ; IR (neat, cm^{-1}) 3415, 2927, 2862, 1671, 1405. ; $[\alpha]_D$ +8.7 (c = 1, MeOH); HRMS calcd. for C26H43NNaO4: 456.3084, found 456.3082.

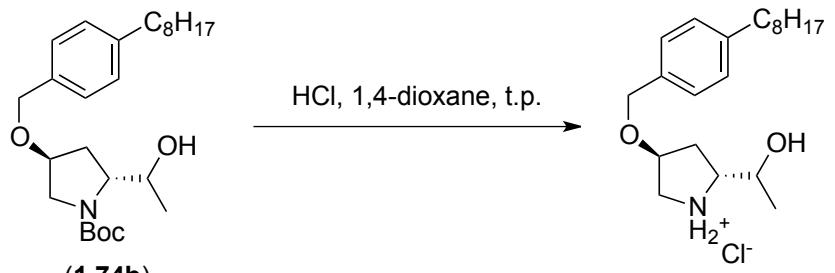
(2*R*,4*S*)-2-((*S*)-1-Hydroxyethyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidin-1-ium chloride (1.81a)



(**1.74a**) (**1.81a**)

Compound (**1.74a**) (16 mg, 0.037 mmol) was dissolved in 4 M HCl in dioxane (1 mL) and stirred 1-2 hours. TLC analysis of the crude mixture showed only the desired compound. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in pure dioxane and the solvent was evaporated again. The residue was crashed in Et_2O at 0 °C to afford a white solid (**1.81a**) (11 mg, 92 %). ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.4 – 7.2 (m, 2H), 7.2 – 7.1 (m, 2H), 4.5 (s, 2H), 4.3 (s, 1H), 3.7 (p, *J* = 6.1 Hz, 1H), 3.5 (dt, *J* = 10.8, 6.9 Hz, 1H), 3.3 – 3.2 (m, 2H), 2.6 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.2 (dd, *J* = 14.0, 6.6 Hz, 1H), 1.8 (ddd, *J* = 13.7, 10.7, 4.7 Hz, 1H), 1.6 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 1.3 (dd, *J* = 10.2, 3.8 Hz, 10H), 1.2 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.0 – 0.8 (m, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 143.9, 136.4, 129.5, 129.1, 78.9, 71.9, 68.4, 65.8, 51.8, 49.0, 36.6, 35.0, 33.0, 32.7, 30.6, 30.4, 30.3, 23.7, 21.2, 14.4. ; IR (neat, cm^{-1}) 3353, 2933, 1702, 1462. ; $[\alpha]_D$ -0.9 (c = 1, MeOH); HRMS calcd. for C21H36NO2: 334.2741, found 334.2734.

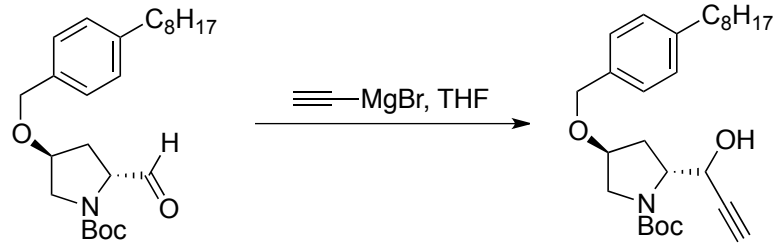
(2*R*,4*S*)-2-((*S*)-1-Hydroxyethyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidin-1-ium chloride (1.81b)



(**1.74b**) (**1.81b**)

Compound (**1.74b**) (21 mg, 0.05 mmol) was dissolved in 4 M HCl in dioxane (1 mL) and stirred 1-2 hours. TLC analysis of the crude mixture showed only the desired compound. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in pure dioxane and the solvent was evaporated again. The residue was crashed in Et_2O at 0 °C to afford a white solid (**1.81b**) (17 mg, 84 %). ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.4 – 7.2 (m, 2H), 7.2 – 7.1 (m, 2H), 4.4 (s, 2H), 4.3 (s, 1H), 3.7 (p, J = 6.1 Hz, 1H), 3.5 (dt, J = 10.8, 6.9 Hz, 1H), 3.3 – 3.2 (m, 2H), 2.5 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.1 (dd, J = 14.0, 6.6 Hz, 1H), 1.8 (ddd, J = 13.7, 10.7, 4.7 Hz, 1H), 1.6 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 1.3 (dd, J = 10.2, 3.8 Hz, 10H), 1.2 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.0 – 0.8 (m, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 143.8, 136.4, 129.5, 129.1, 78.9, 71.9, 68.4, 65.8, 51.7, 49.1, 36.6, 35.0, 33.3, 32.7, 30.6, 30.4, 30.2, 23.7, 21.2, 14.4. ; IR (neat, cm^{-1}) 3353, 2933, 2346, 1702, 1462. ; $[\alpha]_D$ +10.7 (c = 1, MeOH); HRMS calcd. for C21H36NO2: 334.2741, found 334.2730.

(2*R*,4*S*)-*tert*-butyl 2-((*S*)-1-hydroxyprop-2-yn-1-yl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidine-1-carboxylate (1.76)

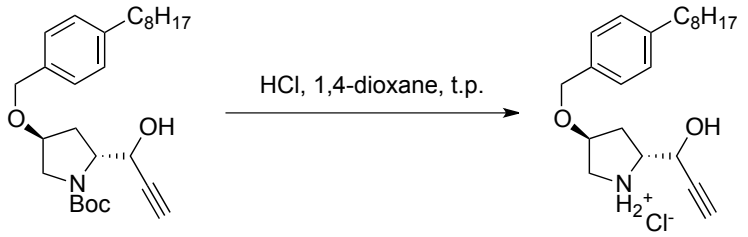


(**1.57**) (**1.76**)

The aldehyde **1.57** (62 mg, 0.149 mmol) was dissolved in dry THF (1 mL) then at -78 °C the ethynyl grignard (1.5 mL, 0.75 mmol, 0.5M in THF) was added slowly. The mixture is slowly

warmed to r.t. then H_2O was added to quench the reaction, then the organic phase and the water phase were separated and the water phase was extracted with Et_2O 3 more times. The organic phases were combined, dried and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2: Acetone, 9.75:0.25) to give one dia. (**1.76a**) (24 mg, 37 %) as a colorless oil ; ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.3 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.2 (d, J = 2.9 Hz, 2H), 4.8 (s, 1H), 4.6 – 4.4 (m, 2H), 4.3 – 4.2 (m, 1H), 4.1 – 4.0 (m, 1H), 3.7 (dd, J = 27.6, 12.3 Hz, 1H), 3.4 (dt, J = 10.9, 5.4 Hz, 1H), 2.9 (dd, J = 9.8, 3.0 Hz, 1H), 2.6 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.5 – 2.2 (m, 1H), 2.2 – 2.1 (m, 1H), 1.6 (q, J = 6.9, 6.5 Hz, 3H), 1.5 (d, J = 10.2 Hz, 11H), 1.4 – 1.3 (m, 13H), 0.9 (t, J = 6.8 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 155.3, 141.9, 135.1, 127.7, 127.1, 81.8, 79.8, 79.6, 76.4, 76.0, 73.1, 73.1, 70.1, 61.3, 60.1, 53.1, 52.9, 34.9, 31.2, 30.1, 28.8, 28.6, 28.5, 27.0, 21.9, 21.9, 12.7. ; IR (neat, cm^{-1}) 3318, 2931, 2364, 2349, 1674, 1414. ; $[\alpha]_D$ +23.6 (c = 1, MeOH); HRMS calcd. for C27H41NNaO4: 466.2928, found 466.2918. and another dia. (**1.76b**) (16 mg, 25 %) ; ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.2 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.1 (d, J = 2.8 Hz, 2H), 4.8 (s, 1H), 4.6 – 4.4 (m, 2H), 4.3 – 4.2 (m, 1H), 4.1 – 4.0 (m, 1H), 3.7 (dd, J = 27.6, 12.3 Hz, 1H), 3.4 (dt, J = 10.9, 5.4 Hz, 1H), 2.8 (dd, J = 9.8, 3.0 Hz, 1H), 2.6 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.5 – 2.2 (m, 1H), 2.2 – 2.1 (m, 1H), 1.6 (q, J = 6.9, 6.5 Hz, 3H), 1.5 (d, J = 10.2 Hz, 11H), 1.4 – 1.3 (m, 13H), 0.9 (t, J = 6.8 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 155.4, 141.9, 135.5, 127.9, 127.1, 81.8, 79.8, 79.6, 76.4, 76.0, 73.1, 73.1, 70.1, 61.4, 60.1, 53.2, 52.9, 34.9, 31.2, 30.4, 28.8, 28.6, 28.7, 27.0, 21.9, 21.8, 12.7 ; IR (neat, cm^{-1}) 3319, 2932, 2862, 2358, 1688, 1404. ; $[\alpha]_D$ +27.0 (c = 1, MeOH); HRMS calcd. for C27H41NNaO4: 466.2928, found 466.2917.

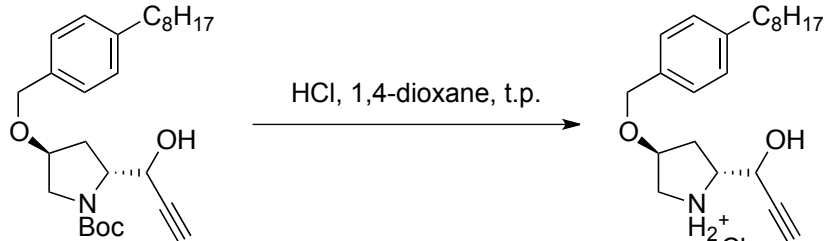
(2*R*,4*S*)-2-((*S*)-1-Hydroxyprop-2-yn-1-yl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidin-1-ium chloride (1.63a)



(**1.76a**) (**1.63a**)

Compound (**1.76a**) (24 mg, 0.054 mmol) was dissolved in 4 M HCl in dioxane (1 mL) and stirred 1-2 hours. TLC analysis of the crude mixture showed only the desired compound. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in pure dioxane and the solvent was evaporated again. The residue was crashed in Et_2O at 0 °C to afford a white solid (**1.63a**) (20 mg, 99 %). ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.2 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.1 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.5 (d, J = 1.6 Hz, 2H), 4.2 (dd, J = 5.4, 2.2 Hz, 1H), 4.2 (dt, J = 5.4, 2.5 Hz, 1H), 3.4 (ddd, J = 9.1, 7.1, 5.3 Hz, 1H), 3.1 (dd, J = 11.9, 4.8 Hz, 1H), 3.0 (dd, J = 11.8, 4.1 Hz, 1H), 2.8 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 2.6 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.1 (ddt, J = 13.6, 7.1, 1.8 Hz, 1H), 1.8 (ddd, J = 14.2, 8.9, 5.9 Hz, 1H), 1.6 (q, J = 7.3, 6.9 Hz, 2H), 1.5 – 1.2 (m, 10H), 1.0 – 0.8 (m, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 143.5, 137.0, 129.4, 129.0, 129.0, 129.0, 80.9, 71.9, 65.1, 63.2, 53.3, 49.0, 36.6, 35.1, 33.0, 32.7, 30.6, 30.4, 30.3, 23.7, 14.4. ; IR (neat, cm^{-1})3272, 2935, 2860, 2367, 2354, 1424. ; $[\alpha]_D$ +1.0 (c = 0.33, MeOH); HRMS calcd. for C22H34NO2: 344.2584, found 344.2582.

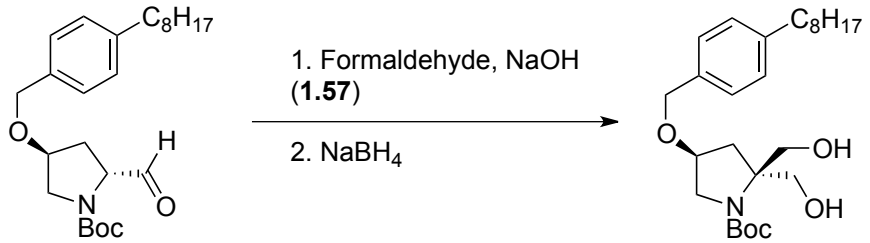
(2*R*,4*S*)-2-((*S*)-1-Hydroxyprop-2-yn-1-yl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidin-1-ium chloride (1.63b)



(**1.76b**) (**1.63b**)

Compound (**1.76b**) (16 mg, 0.036 mmol) was dissolved in 4 M HCl in dioxane (1 mL) and stirred 1-2 hours. TLC analysis of the crude mixture showed only the desired compound. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in pure dioxane and the solvent was evaporated again. The residue was crashed in Et_2O at 0 °C to afford a white solid (**1.63b**) (13 mg, 99 %). ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.2 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.1 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 4.5 (s, 2H), 4.3 – 4.0 (m, 2H), 3.6 – 3.4 (m, 1H), 3.0 (qd, J = 11.8, 3.4 Hz, 2H), 2.9 – 2.8 (m, 1H), 2.6 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.1 (dd, J = 13.8, 7.2 Hz, 1H), 1.8 (ddd, J = 14.1, 9.0, 5.4 Hz, 1H), 1.6 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.5 – 1.2 (m, 11H), 0.9 (t, J = 6.8 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 143.6, 136.9, 129.4, 129.0, 84.2, 80.6, 74.8, 71.8, 65.4, 63.4, 52.7, 49.0, 36.6, 35.5, 33.0, 32.7, 30.6, 30.4, 30.3, 23.7, 14.4. ; IR (neat, cm^{-1}) 3272, 2935, 2860, 2368, 2354, 1425. ; $[\alpha]_D$ -16.6 (c = 1, MeOH); HRMS calcd. for C22H34NO2: 344.2584, found 344.2582.

(*S*)-*Tert*-butyl 2,2-bis(hydroxymethyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidine-1-carboxylate (1.79Boc)

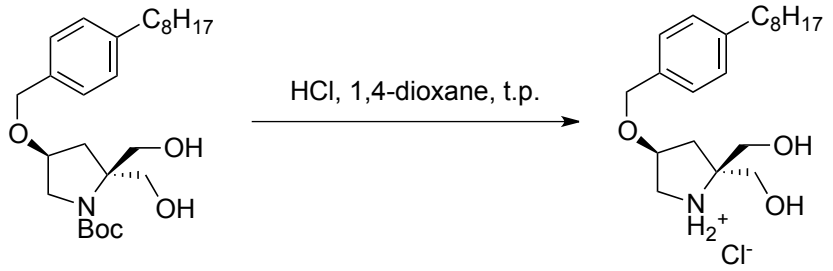


(**1.57**) (**1.79Boc**)

To a solution of (**1.57**) (50 mg, 0.12 mmol) in THF (1 mL) was added formaldehyde (0.04 mL, 0.48 mmol, 37% wt in H_2O) and NaOH (0.24 mL, 0.24 mmol, 1 M in H_2O). The mixture is stirred at r.t. overnight then $NaBH_4$ (9 mg, 0.24 mmol) was added at 0 °C. The mixture is allowed to warm to r.t. and stirred at this temperature for another 3 hours. ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.2 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.2 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.7 – 4.3 (m, 2H), 4.1 (dt, J = 9.4, 4.0 Hz, 1H), 4.0 – 3.7 (m, 3H), 3.6 – 3.4 (m, 3H), 2.6 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.4 – 2.3 (m, 1H), 2.2 – 2.1 (m, 1H), 1.6 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.5 (d, J = 14.7 Hz, 9H), 1.3 (dd, J = 11.3, 4.4 Hz, 11H), 0.9 (t, J = 6.9 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 156.7, 156.1, 143.6, 136.8, 136.6, 129.5, 129.1, 129.0, 129.0, 81.7, 81.2, 76.5, 75.8, 72.1, 72.0, 69.4, 69.0, 65.0, 64.9, 64.4, 63.9, 55.8, 55.4, 49.0, 38.6, 38.2, 36.6, 36.6, 33.0, 32.7, 30.6, 30.4, 30.4, 30.3, 28.8, 28.8,

23.7, 14.5, 14.4. ; IR (neat, cm^{-1}) 3388,2937, 2859, 2366, 2350, 1672, 1402, 1371. ; $[\alpha]_D$ +9.3 (c = 0.8, MeOH); HRMS calcd. for C26H43NNaO5: 472.3033, found 472.3032.

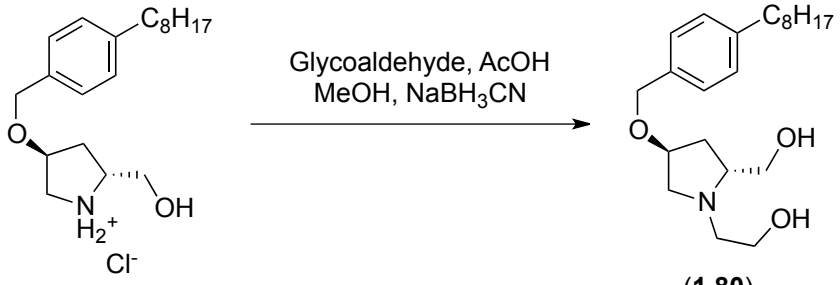
(*S*)-2,2-Bis(hydroxymethyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidin-1-ium chloride (1.79)



(**1.79Boc**) (**1.79**)

Compound (**1.79Boc**) (22 mg, 0.05 mmol) was dissolved in 4 M HCl in dioxane (1 mL) and stirred 1-2 hours. TLC analysis of the crude mixture showed only the desired compound. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in pure dioxane and the solvent was evaporated again. The residue was crashed in Et_2O at 0 °C to afford a white solid (**1.79**) (17 mg, 99 %). ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.3 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.2 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.5 (s, 2H), 4.3 (ddt, J = 6.7, 4.5, 2.4 Hz, 1H), 3.8 – 3.5 (m, 5H), 3.3 – 3.2 (m, 2H), 2.7 – 2.4 (m, 2H), 2.1 (dd, J = 14.2, 5.8 Hz, 1H), 2.0 (dt, J = 14.2, 2.0 Hz, 1H), 1.7 – 1.6 (m, 2H), 1.3 (dd, J = 11.6, 2.6 Hz, 11H), 0.9 (t, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 143.8, 136.4, 129.5, 129.1, 79.5, 72.0, 70.9, 64.5, 64.2, 52.3, 49.0, 36.8, 36.6, 33.0, 32.7, 30.6, 30.4, 30.3, 23.7, 14.4. ; IR (neat, cm^{-1}) 3341, 2924, 2854. ; $[\alpha]_D$ +9.3 (c = 0.8, MeOH); HRMS calcd. for C21H36NO3: 351.2723, found 351.2714.

2-((2*R*,4*S*)-2-(Hydroxymethyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidin-1-yl)ethanol (1.80)

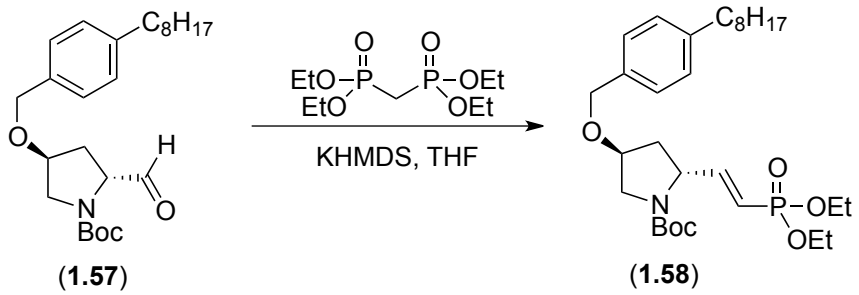


(**1.22**) (**1.80**)

To a solution of (**1.22**) (50 mg, 0.14 mmol) in MeOH (1 mL) was added glycoaldehyde (34 mg, 0.28 mmol) and acetic acid (1 drop). After 15 minutes at r.t. $NaBH_3CN$ (0.28 mL, 0.28 mmol, 1 M in THF) was slowly added. The mixture is allowed to stir at r.t. overnight then NaOH (2M) was added to the reaction, then the organic phase and the water phase were separated and the water phase was extracted with EtOAc 3 times. The organic phase were combined, dried and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2: MeOH, 9:1) to give (**1.80**) (30 mg, 56 %) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.3 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.2 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 4.6 – 4.5 (m, 2H), 4.3 (s, 1H), 4.1 – 3.5 (m, 11H), 2.6 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 2.4 (dd, J = 14.3, 5.5 Hz, 1H), 2.1 (t, J = 12.1 Hz, 1H), 1.8 – 1.5 (m, 2H), 1.3 (d, J = 13.6 Hz, 11H), 0.9 (t, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 143.9, 136.1, 129.6, 129.2, 77.4, 72.2, 70.3, 60.8, 60.4, 60.2, 57.8, 49.0, 36.6, 34.1, 33.0, 32.7, 30.5, 30.4, 30.3, 23.7, 14.4. ; IR (neat, cm^{-1}) 3315, 2925, 2854, 1439, 1077. ; $[\alpha]_D$ +16.8 (c = 1, MeOH); HRMS calcd. for C22H38NO3: 365.2879, found 365.2890.

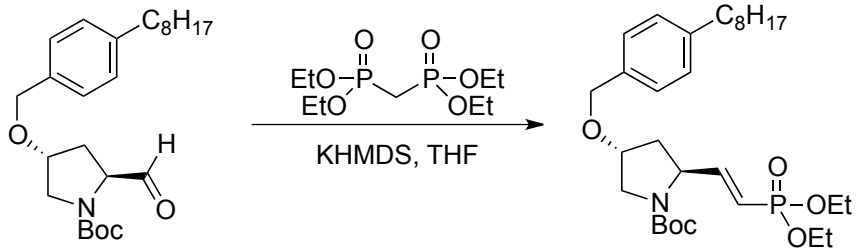
FTY-720 Analogues: The O-Benzyl Phosphonate Series

(2*R*,4*S*)-*Tert*-butyl 2-((*E*)-2-(diethoxyphosphoryl)vinyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidine-1-carboxylate (1.58)



First, KHMDS (0.70 mL, 0.42 mmol, 1 M in Toluene) is slowly added to net diethyldiphosphonate (0.1 mL, 0.42 mmol) at 0 °C. After 30 minutes of stirring at this temperature, (**1.57**) (145 mg, 0.35 mmol) in THF (2 mL) is slowly added. The mixture is stirred overnight at r.t. then NH_4Cl is added to quench the reaction. EtOAc is added and the organic phase and the water phase were separated and the water phase was extracted with EtOAc 3 times. The organic phase were combined, dried and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (EtOAc 100%) to give (**1.58**) (142 mg, 97 %) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.2 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.2 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 6.7 – 6.5 (m, 1H), 5.9 – 5.6 (m, 1H), 4.5 (s, 3H), 4.2 – 4.0 (m, 5H), 3.8 – 3.6 (m, 1H), 3.5 – 3.4 (m, 1H), 2.7 – 2.5 (m, 2H), 2.3 (dd, J = 13.6, 7.9 Hz, 1H), 1.9 (dt, J = 8.5, 3.7 Hz,10H), 1.6 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.4 (s, 9H), 1.3 (q, J = 5.4, 3.9 Hz, 15H), 0.9 (t, J = 6.8 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 155.1, 143.9, 136.9, 129.7, 129.2, 81.9, 80.2, 77.9, 77.3, 72.0, 63.6, 60.0, 53.6, 53.0, 49.0, 39.3, 36.8, 33.2, 32.9, 30.8, 30.6, 30.5, 28.9, 23.9, 16.9, 14.6. ; ^{31}P NMR (162 MHz, MeOD) δ 19.1, 18.8. ; IR (neat, cm^{-1})2926, 2855, 1697, 1391. ; $[\alpha]_D$ +8.4 (c = 1, CH_3Cl); HRMS calcd. for C30H50NNaO6P: 574.3268, found 574.3275.

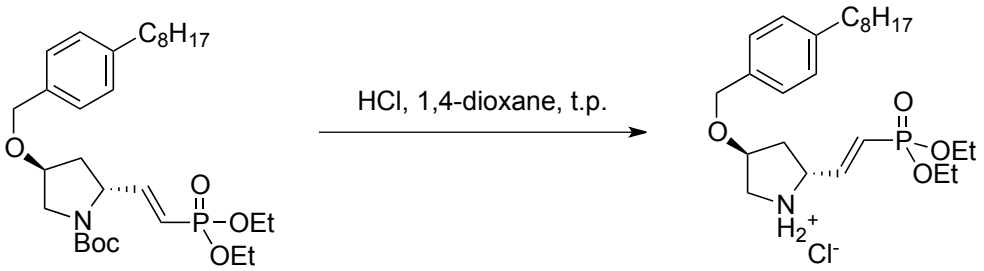
(2*S*,4*R*)-*Tert*-butyl 2-((*E*)-2-(diethoxyphosphoryl)vinyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidine-1-carboxylate (1.56)



(**1.57**) (**1.58E**)

First, KHMDS (0.70 mL, 0.42 mmol, 1 M in Toluene) is slowly added to net diethyldiphosphonate (0.1 mL, 0.42 mmol) at 0 °C. After 30 minutes of stirring at this temperature, (**1.57**) (144 mg, 0.35 mmol) in THF (2 mL) is slowly added. The mixture is stirred overnight at r.t. then NH_4Cl is added to quench the reaction. EtOAc is added and the organic phase and the water phase were separated and the water phase was extracted with EtOAc 3 times. The organic phase were combined, dried and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (EtOAc 100%) to give (**1.58E**) (141 mg, 98 %) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.2 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.2 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 6.6 – 6.5 (m, 1H), 5.9 – 5.6 (m, 1H), 4.5 (s, 3H), 4.2 – 4.0 (m, 5H), 3.8 – 3.6 (m, 1H), 3.5 – 3.4 (m, 1H), 2.7 – 2.5 (m, 2H), 2.3 (dd, J = 13.6, 7.9 Hz, 1H), 1.9 (dt, J = 8.5, 3.7 Hz,10H), 1.6 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.4 (s, 9H), 1.3 (q, J = 5.4, 3.9 Hz, 15H), 0.9 (t, J = 6.8 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 155.1, 143.9, 136.9, 129.7, 129.2, 81.9, 80.2, 77.9, 77.3, 72.0, 63.5, 60.0, 53.6, 53.0, 49.0, 39.3, 36.8, 33.2, 32.9, 30.8, 30.6, 30.5, 28.9, 23.9, 16.9, 14.5. ; ^{31}P NMR (162 MHz, MeOD) δ 19.1, 18.8. ; IR (neat, cm^{-1}) 2926, 2855, 1697, 1391. ; $[\alpha]_D$ -12.0 (c = 1, CH_3Cl); HRMS calcd. for C30H50NNaO6P: 574.3268, found 574.3269.

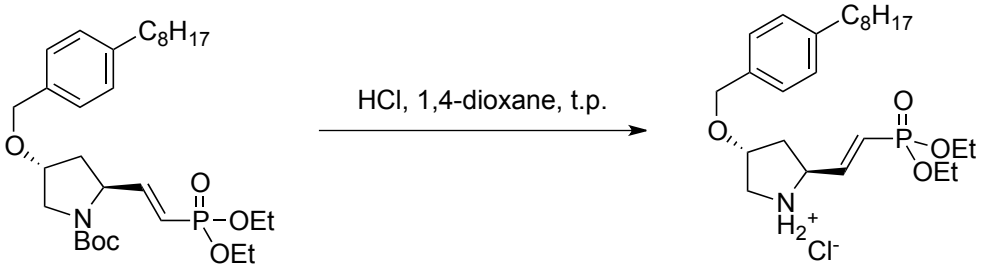
(2*R*,4*S*)-2-((*E*)-2-(Diethoxyphosphoryl)vinyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidin-1-ium chloride (**1.55**)



(**1.58**) (**1.55**)

Compound (**1.58**) (10 mg, 0.02 mmol) was dissolved in 4 M HCl in dioxane (1 mL) and stirred 1-2 hours. TLC analysis of the crude mixture showed only the desired compound. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in pure dioxane and the solvent was evaporated again. The residue was crashed in Et_2O at 0 °C to afford a white solid (**1.55**) (7 mg, 99 %). ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.3 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.2 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 6.8 (ddd, J = 21.5, 17.1, 7.4 Hz, 1H), 6.3 (t, J = 17.6 Hz, 1H), 4.7 – 4.4 (m, 3H), 4.1 (p, J = 7.2 Hz, 3H), 3.9 – 3.4 (m, 5H), 2.6 (dt, J = 22.3, 7.0 Hz, 3H), 2.0 (ddd, J = 14.9, 11.3, 4.4 Hz, 1H), 1.6 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.5 – 1.3 (m, 14H), 0.9 (t, J = 6.8 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 143.8, 143.8, 142.2, 134.2, 127.8, 127.7, 127.4, 127.4, 123.6, 121.8, 76.2, 71.8, 70.7, 70.3, 66.3, 62.2, 62.1, 60.4, 59.5, 59.2, 50.5, 41.9, 35.8, 34.8, 31.2, 30.9, 28.8, 28.6, 28.5, 21.9, 14.9, 14.8, 12.6. ; ^{31}P NMR (162 MHz, C_6D6) δ 16.1. ; IR (neat, cm^{-1}) ; 2924, 2855, 1719. $[\alpha]_D$ +4.1 (c = 1, CH_3Cl); HRMS calcd. for C25H43NOP: 452.2924, found 452.2938.

(2*S*,4*R*)-2-((*E*)-2-(Diethoxyphosphoryl)vinyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidin-1-ium chloride (**1.56**)

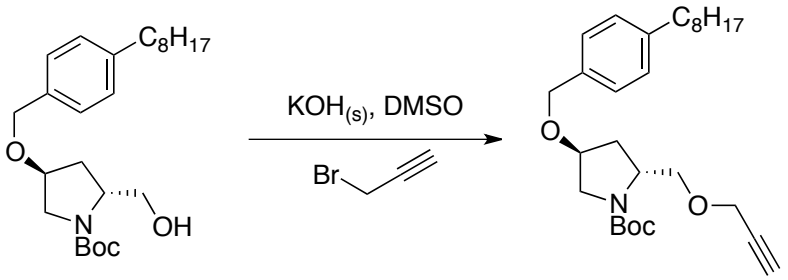


(**1.58E**) (**1.56**)

Compound (**1.58E**) (10 mg, 0.02 mmol) was dissolved in 4 M HCl in dioxane (1 mL) and stirred 1-2 hours. TLC analysis of the crude mixture showed only the desired compound. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in pure dioxane and the solvent was evaporated again. The residue was crashed in Et_2O at 0 °C to afford a white solid (**1.56**) (7 mg, 99 %). ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.3 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.2 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 6.8 (ddd, J = 21.5, 17.1, 7.4 Hz, 1H), 6.3 (t, J = 17.6 Hz, 1H), 4.7 – 4.4 (m, 3H), 4.1 (p, J = 7.2 Hz, 3H), 3.9 – 3.4 (m, 5H), 2.6 (dt, J = 22.3, 7.0 Hz, 3H), 2.0 (ddd, J = 14.9, 11.3, 4.4 Hz, 1H), 1.6 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.5 – 1.3 (m, 14H), 0.9 (t, J = 6.8 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 143.8, 143.8, 142.3, 134.2, 127.8, 127.5, 127.4, 127.4, 123.6, 121.8, 76.2, 71.8, 70.7, 70.3, 66.3, 62.2, 62.1, 60.4, 59.5, 59.2, 50.5, 41.9, 35.8, 34.8, 31.2, 30.9, 28.8, 28.6, 28.5, 21.9, 14.9, 14.8, 12.6. ; ^{31}P NMR (162 MHz, C_6D6) δ 16.4. ; IR (neat, cm^{-1}) ; 2925, 2855, 1719. $[\alpha]_D$ +2.1 (c = 1, CH_3Cl); HRMS calcd. for C25H43NOP: 452.2924, found 452.2934.

FTY-720 Diazirine-Alkyne Linker Analogues [4,5]

Boc-4-((4-octenylbenzyl)oxy)-2-((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)-pyrrolidine (**N-boc-alkyne-ether**)



(**1.22**) (**N-boc-alkyne-ether**)

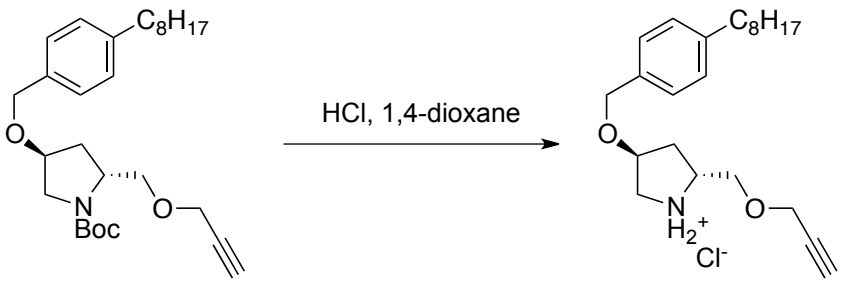
To a stirred solution of alcohol (**1.22**) (84 mg, 0.2 mmol) in dry DMF (1 mL) was added potassium hydroxide (56 mg, 1 mmol), followed by dropwise addition of propargyl bromide (80 wt. % in toluene, 48 mg, 0.4 mmol) over 5 min. After 18 h, the reaction mixture was poured onto water (3 mL) and washed with CH_2Cl_2 (3 × 1.5 mL). The combined organic fractions concentrated in vacuo and the liquid remaining taken up in diethyl ether and washed with water and then brine and dried over Na2SO4. Chromatography (hexanes : EtOAc , 8 : 2) gave the desired product (**N-boc-alkyne-ether**) as a yellow oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.2 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.1 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.5 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.2 – 4.0 (m, 5H), 3.8 – 3.3 (m, 4H), 2.7 – 2.5 (m, 2H), 2.4 (d, *J* = 2.8 Hz,10H), 2.1 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 1.6 (s, 3H), 1.5 (s, 9H), 1.4 – 1.2 (m, 11H), 0.9 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H). ; For ^{13}C see deprotected compound below ; IR (neat, cm^{-1}) 2927, 2854, 2331, 1693, 1400. ; $[\alpha]_D$ +19.0 (c = 1, $CHCl_3$); HRMS calcd. for C28H43NNaO4: 480.3084, found 480.3081.

---

[4] K. Hayakawa, M. Yodo, S. Ohsuki, K. Kanematsu, J. Am.Chem. Soc. 1984, 106, 6735-6740.

[5] Z. Li, P. Hao, L. Li, C. Y. Tan, X. Cheng, G. Y. Chen, S. K. Sze, H. M. Shen and S. Q. Yao, Angew. Chem., Int. Ed. , 2013, 52, 8551–8556.

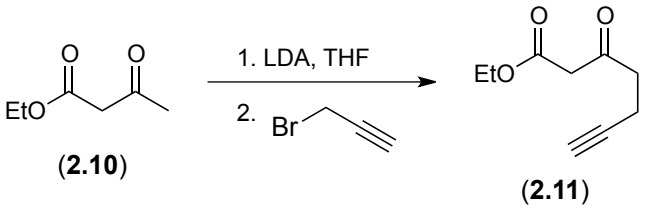
4-((4-Octenylbenzyl)oxy)-2-((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)-pyrrolidine (alkyne-ether)



(**N-boc-alkyne-ether**) (**alkyne-ether**)

The (**N-boc-alkyne-ether**) (60 mg, 0.13 mmol) was dissolved in 4 M HCl in dioxane (1 mL) and stirred 1-2 hours. TLC analysis of the crude mixture showed only the desired compound. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in pure dioxane and the solvent was evaporated again. The residue was purified by flash chromatography (EtOH: CH_2Cl_2, 1:9) to give the compound (**alkyne-ether**) (25 mg, 48% yield) as a white solid. The compound can also be crashed in Et_2O at 0 °C to afford a white solid. ^{1}H NMR (400 MHz, Deuterium Oxide) δ 7.1 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 6.9 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.3 (dd, *J* = 64.6, 12.1 Hz, 2H), 4.1 (d, *J* = 13.2 Hz, 3H), 3.8 (dt, *J* = 15.0, 4.8 Hz, 2H), 3.7 – 3.6 (m, 2H), 3.5 (dd, *J* = 11.0, 6.4 Hz, 1H), 3.4 – 3.2 (m, 2H), 2.7 (s, 1H), 2.3 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.9 (dd, *J* = 13.8, 6.9 Hz, 1H), 1.7 – 1.6 (m, 1H), 1.4 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.2 (s, 10H), 0.8 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 141.5, 135.3, 128.1, 128.1, 79.3, 76.5, 76.3, 71.6, 70.7, 70.2, 67.5, 66.5, 58.3, 57.7, 50.1, 35.6, 33.0, 32.0, 31.5, 29.7, 29.6, 29.5, 22.7, 14.0. ; IR (neat, cm^{-1}) 2924, 2895, 1093.; $[\alpha]_D$ -2.3 (c = 1, $CHCl_3$); HRMS calcd. for C23H36NO2: 359.2773, found 359.2775.

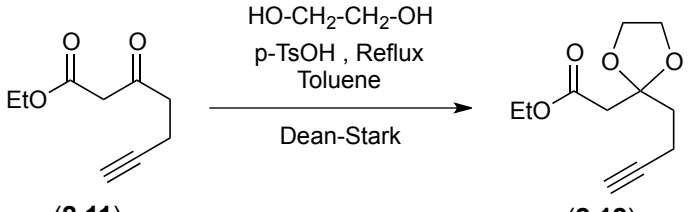
Ethyl 3-oxohept-6-ynoate (**2.11**)



(**2.10**) (**2.11**)

To a solution of diisopropylamine (3.29 mL, 25.3 mmol) disolved in THF (70 mL) was slowly added n-BuLi (2.5 M, 20.24 mL, 50.6 mmol) at 0 °C. After 15 minutes, ethyl 3-oxobutanoate (**2.10**) was slowly added at 0 °C with appearance of a deep red color. After 30 minutes of stirring at 0 °C, propargyl bromide (80% wt in toluene, 3.76 mL, 25.3 mmol) was added dropwise. The solution turned orange before turning red again after 2 minutes. This reactions was stirred at 0 °C for 1 hours before addition of acetic acid (2 mL) and water. The mixture was extracted 3 times with Et_2O and the combined organic layers were washed with brine then dried over $NaSO_4$ and filtrated. The solvent was removed under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 8:1) to give (**2.11**) (4.25 g, 80%) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.19 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.46 (s, 2H), 2.80 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.46 (td, *J* = 7.3, 2.7 Hz, 2H), 1.95 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); 13C NMR (101 MHz, CDCl3) δ 200.7, 167.0, 82.7, 69.1, 61.6, 49.3, 41.7, 14.2, 12.9; IR (neat, cm^{-1}) 3288, 2982, 1736-1715, 1409, 1368, 1317, 1256, 1192, 1133, 1085, 1028, 635; HRMS (ESI) calcd. for $C_9H_{13}O_3$; $M+H^+$ = 169.08592, found 169.08515

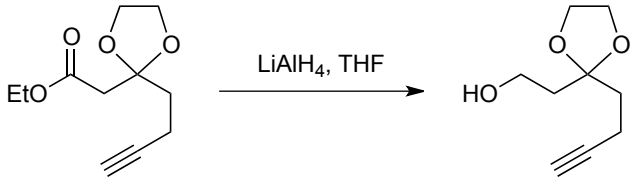
Ethyl 2-(2-(but-3-yn-1-yl)-1,3-dioxolan-2-yl)acetate (**2.12**)



(**2.11**) (**2.12**)

A solution of (**2.11**) (4.25g, 25.3 mmol), ethylene glycol (1.2 mL, 27.9 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid (p-TsOH) (480 mg, 25.3 mmol) in toluene were refluxed in a Dean-Stark for 2 hours. The reaction is then quenched with $NaHCO_3$ (sat.) and extracted 3 times with EtOAc. The organic layers were combined, dried over $NaSO_4$ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 8:2) to give (**2.12**) (3.1 g, 18.2 mmol, 72%) as a yellow oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.14 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.05 – 3.85 (m, 3H), 2.29 (ddd, *J* = 8.6, 6.6, 2.7 Hz, 2H), 2.11 (dd, *J* = 9.1, 6.6 Hz, 2H), 1.92 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); 13C NMR (101 MHz, CDCl3) δ 108.4, 84.1, 68.2, 65.3, 60.8, 42.8, 36.5, 14.3, 12.9; IR (neat, cm^{-1}) 3288, 2986, 2900, 1734, 1446, 1371, 1226, 1109, 1044, 950, 890, 631; HRMS (ESI) calcd. for $C_{11}H_{16}O_4$; M+H$^+$ = 213.11214, found 213.11243

2-(2-(But-3-yn-1-yl)-1,3-dioxolan-2-yl)ethanol (**2.13**)

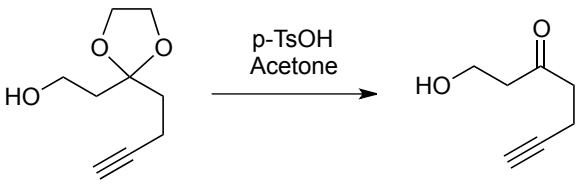


(**2.12**) (**2.13**)

To a solution of (**2.12**) (455 mg, 2.15 mmol) in THF (10 mL) was slowly added lithium aluminium hydride (LAH) (82 mg, 2.15 mmol) at 0 °C. After 1 minute, the reaction was quench by addition of wet Na_2SO_4 (gas formation). The grey solid is then triturated with Et_2O. The solvent was removed under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 6:4) to give (**2.13**) (329 mg, 1.94 mmol, 90%) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.08 – 3.93 (m, 3H), 3.75 (q, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.66 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 2.27 (td, *J* = 8.6, 7.9, 3.0 Hz, 2H), 2.00 – 1.83 (m, 6H), 1.66 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 111.2, 84.1, 68.4, 65.1, 58.8, 38.4, 36.0, 13.3; IR (neat, cm^{-1})

3290, 2963, 2353, 1985, 1263, 1137, 1047, 949, 891, 803; HRMS (ESI) calcd. for $C_9H_{15}O_3$; $M+H^+ = 171.10157$, found 171.10157

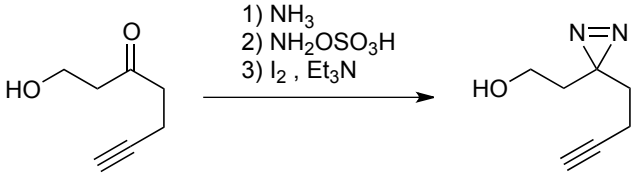
1-Hydroxyhept-6-yn-3-one (**2.14**)



(**2.13**) (**2.14**)

p-toluenesulfonic acid (p-TsOH) (101 mg, 0.53 mmol) was added to a solution of (**2.13**) (295 mg, 1.74 mmol) in acetone (9 mL). The reaction is then quenched with $NaHCO_3$ (sat.) and extracted 3 times with EtOAc. The organic layers were combined, dried over $NaSO_4$ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 1:1) to give (**2.14**) (64 mg, 0.50 mmol, 95%) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 3.86 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.90 – 2.60 (m, 3H), 2.46 (td, *J* = 7.1, 2.6 Hz, 2H), 1.96 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 209.2, 82.9, 69.0, 57.8, 44.7, 41.9, 12.9; IR (neat, cm^{-1}) 3287, 2911, 1710, 1373, 1097, 1046, 632; HRMS (ESI) calcd. for $C_7H_{11}O_2$; $M+H^+ = 127.07536$, found 127.07541

2-(3-(But-3-yn-1-yl)-3*H*-diazirin-3-yl)ethanol (**2.15**)

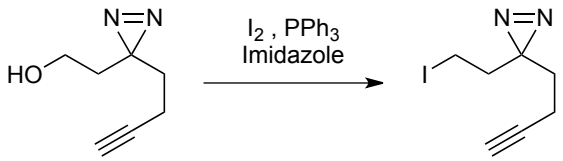


(**2.14**) (**2.15**)

Compound (**2.14**) (90 mg, 0.71 mmol) is dissolved in dry methanol (1 mL). Then, $NH3_{(g)}$ is bubbled in the solution at 0 °C for 3 hours. To this solution was added a solution of

hydroxylamine-O-sulfonic acid (161 mg, 1.42 mmol) in dry methanol (1 mL). This reaction is allowed to stir 1 hour at 0 °C before warming to room temperature where it was stirred for another 4 hours. The slurry white solution is then filtrated with several portion of methanol. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (2 mL) and triethylamine (1.2 mL). To this was slowly added a saturated solution of iodine in CH_2Cl_2 until the orange-brown color was persistent. The solvent was removed under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 8:2) to give (**2.15**) (23 mg, 0.16 mmol, 23%) as a colorless oil which as a tendancy to turn yellow if not protected from light. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 3.48 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.25 – 1.95 (m, 3H), 1.85 – 1.59 (m, 5H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 83.0, 69.4, 57.5, 35.6, 32.7, 26.7, 13.4; IR (neat, cm^{-1}) 3295, 2920, 1587, 1433, 1051, 632; HRMS (ESI) calcd. for $C_7H_{10}N_2O$; $M+H^+$ = 139.08659, found 139.08728

3-(But-3-yn-1-yl)-3-(2-iodoethyl)-3*H*-diazirine (**2.16**)

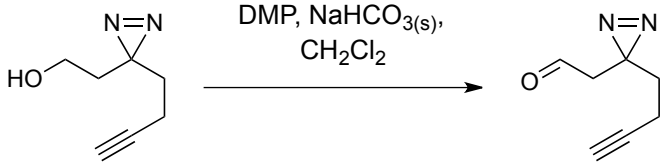


(**2.15**) (**2.16**)

To a solution of PPh_3 (95 mg, 0.35 mmol) and imidazole (66 mg, 0.96 mg) in CH_2Cl_2 (1 mL) was added I_2 (98 mg, 0.38 mmol) portion wise at 0 °C with exclusion of the light with aluminium foil. This reaction was allowed to stir for 10 minutes at 0 °C before the alcohol (**2.15**) (45 mg, 0.32 mmol) in CH_2Cl_2 (1 mL) was slowly added. This reaction was stirred 4 hours with warming up to room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 20:1) to give (**2.16**) (52 mg, 0.21 mmol, 60%) as a yellow oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 2.89 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.12 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.09 – 1.91 (m, 3H), 1.69 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H); ^{13}C NMR (101

MHz, $CDCl_3$) δ 82.6, 69.6, 62.0, 37.7, 32.0, 28.8, 13.4; The NMR and other data obtained were in agreement with the values previously reported by Prof. Dr. Shao Q. Yao *et. al*.[6]

2-(3-(But-3-yn-1-yl)-3*H*-diazirin-3-yl)acetaldehyde (2.19)

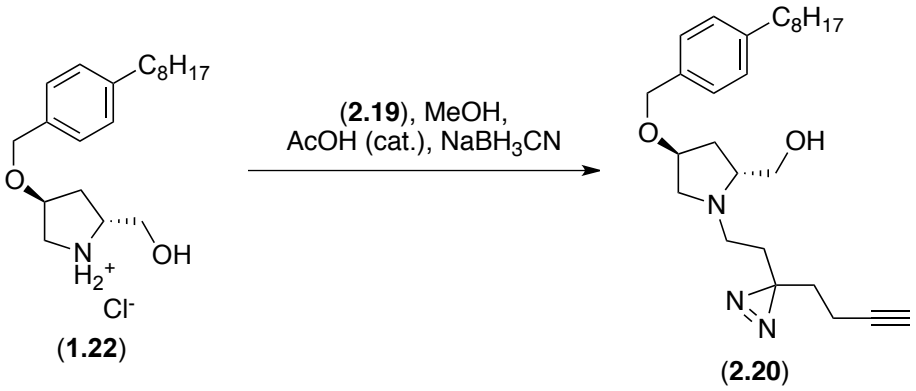


(**2.15**) (**2.19**)

To a solution of alcohol (**2.15**) (20 mg, 0.145 mmol) in CH_2Cl_2 (1 mL) was slowly added Dess-Martin periodinane (DMP) (80 mg, 0.19 mmol) at 0 °C. The solution was warmed to room temperature and stirred for 2 hours before a solution of sodium thiosulfate (sat.) was added. The aqueous layer was extracted 3 times with CH_2Cl_2. The organic layers were combined, dried over $NaSO_4$ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue of (**2.19**) was taken without further purification in the next reaction.

[6] Z. Li, P. Hao, L. Li, C. Y. Tan, X. Cheng, G. Y. Chen, S. K. Sze, H. M. Shen and S. Q. Yao, Angew. Chem., Int. Ed. , 2013, 52, 8551–8556.

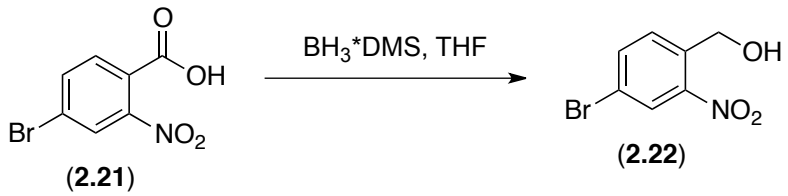
((2*R*,4*S*)-1-(3-(3-(But-3-yn-1-yl)-3*H*-diazirin-3-yl)propyl)-4-((4-octylbenzyl)oxy)pyrrolidin-2-yl)methanol (2.20)



A solution of crude (**2.19)** (19.4 mg, 0.145 mmol) in dry methanol (1 mL) was slowly added at 0 °C to a solution of (**1.22**) (26 mg, 0.073 mmol) and acetic acid (99.99 %, 1 drop) in dry methanol (1 mL). To this was slowly added sodium cyanoborohydride (1M in THF, 0.15 mL, 0.145 mmol). This reaction was allowed to stir overnight with slow warming up to room temperature. The reaction was then quenched with 2M NaOH and extracted 3 times with EtOAc. The organic layers were combined, dried over $NaSO_4$ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography (CH_2Cl_2 : MeOH, 20:1) to give (**2.20)** (24 mg, 0.055 mmol, 75%) as a yellow oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.23 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.15 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.45 (q, J = 11.4 Hz, 2H), 4.18 – 4.01 (m, 1H), 3.50 (qd, J = 11.1, 4.8 Hz, 2H), 3.42 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 2.84 – 2.74 (m, 1H), 2.73 – 2.66 (m, 1H), 2.60 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.33 (dd, J = 10.2, 5.0 Hz, 1H), 2.26 (dt, J = 5.5, 2.8 Hz, 2H), 2.01 (dtt, J = 16.3, 7.7, 3.9 Hz, 4H), 1.83 (dt, J = 13.3, 7.7 Hz, 1H), 1.65 – 1.54 (m, 6H), 1.35 – 1.24 (m, 9H), 0.89 (t, J = 6.8 Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 143.6, 136.9, 129.4, 129.1, 83.7, 78.1, 72.2, 70.3, 65.7, 64.4, 60.4, 57.5, 36.6, 36.1, 33.6, 33.0, 32.7, 32.5, 30.6, 30.4, 30.3, 28.2, 23.7, 14.4, 13.9; IR (neat, cm^{-1}) 3306, 2924, 2855, 1466, 1109, 784; HRMS (ESI) calcd. for $C_{27}H_{42}N_3O_2$; M*+ = 440.32715, found 440.32644

FTY-720 Aryl Azide-Alkyne Linker Analogues

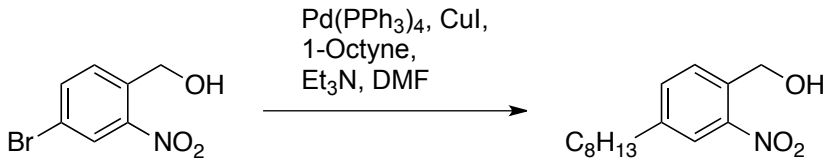
(4-Bromo-2-nitrophenyl)methanol (2.22)



(**2.21**) (**2.22**)

To a solution of (**2.21**) (2 g, 8 mmol) in THF (16 mL) was slowly added BH_3*DMS (5 mL, 50 mmol, 10 M in BH_3) at 0 °C. The formation of H_2 is observed. The mixture is allowed to warm to r.t. and is stirred another 3-12 hours at this temperature. The reaction is quench with MeOH at 0 °C. The solvent was removed under reduced pressure to give (**2.22)** (1.95 g, 7.9 mmol) as a yellow oil. The compound was taken without further purification in the next reaction. ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 8.23 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 7.91 (dd, J = 8.0, 4.0 Hz, 1H), 7.81 (dd, J = 8.0, 4.0 Hz, 1H), 4.91 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 147.3, 136.8, 135.8, 129.6, 126.5, 119.8, 59.7 ; IR (neat, cm^{-1}) 3361, 1524, 1342.

(2-Nitro-4-(oct-1-yn-1-yl)phenyl)methanol (2.29)

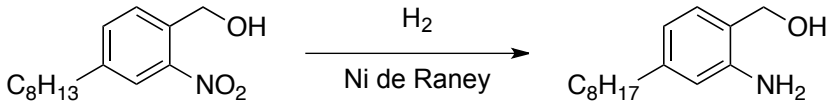


(**2.22**) (**2.29**)

To a crude solution of (**2.22**) (500 mg, 2.16 mmol) in dry DMF (4 mL) was added $Pd(PPh_3)_4$ (125 mg, 0.108 mmol), CuI (20.6 mg, 0.108 mmol), Et_3N (1.2 mL, 8.64 mmol) and 1-octyne (0.35 mL, 2.38 mmol). The mixture is stirred at r.t. overnight before being filtrated on celite with EtOAc. Brine was added to the reaction, then the organic phase and the water phase were separated and the water phase was extracted with EtOAc 3 times. The organic phase were combined, dried and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (Hexane: EtOAc, 9 :1) to give (**2.29**) (455 mg, 1.79 mmol) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.1 (s, 1H), 7.6 (s, 2H), 4.9 (d,

J = 6.4 Hz, 2H), 2.5 (dq, *J* = 6.5, 3.4 Hz, 1H), 2.4 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.6 (p, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.5 – 1.4 (m, 2H), 1.3 (q, *J* = 3.9 Hz, 5H), 1.0 – 0.8 (m, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 136.8, 135.8, 129.9, 127.9, 125.2, 93.9, 78.3, 77.2, 62.5, 31.5, 28.8, 28.6, 22.7, 19.5, 14.2. ; IR (neat, cm^{-1}) 3295, 2930, 2857, 1526, 1346. ; calcd. for C15H19NNaO3: 284.1257, found 284.1261.

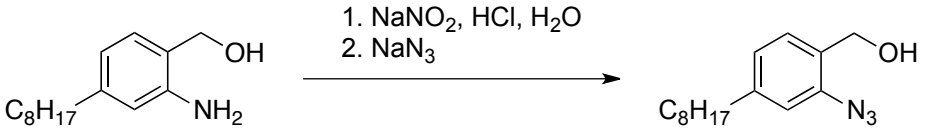
(2-Amino-4-octylphenyl)methanol (**2.30**)



(**2.29**) (**2.30**)

To a suspension of Raney Nickel (2 mg, 10 mol%) in MeOH (0.5 mL) was added (**2.29**) (20 mg, 0.086 mmol) in MeOH (0.5 mL). The air was pumped out of the flask and replaced by H_2. Upon completion as indicated by MS (3-4 hours), the reaction was stopped and the mixture was filtered through Celite. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was crashed in hexane to give (**2.30**) (13 mg, 0.055 mmol) as a white solid. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.0 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.5 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.6 (s, 2H), 4.1 (bs, 2H), 2.5 (t, *J* = 7.9 Hz, 3H), 1.6 (d, *J* = 7.8 Hz, 3H), 1.3 (d, *J* = 13.1 Hz, 14H), 0.9 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 146.0, 144.7, 129.3, 122.5, 118.5, 116.2, 77.2, 64.3, 35.9, 32.0, 31.5, 29.6, 29.5, 29.4, 22.8, 14.2. ; IR (neat, cm^{-1}) 3354, 3238, 2921, 2871. ; calcd. for C15H25NO: 258.1828, found 258.1832.

(2-Azido-4-octylphenyl)methanol (**2.31**)

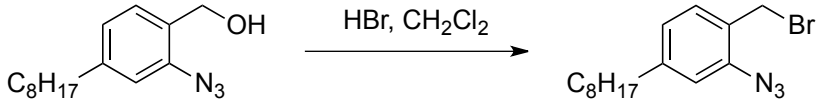


(**2.30**) (**2.31**)

To a suspension of (**2.30**) (200 mg, 0.87 mmol) in water (2.5 mL) and HCl 2N (5 mL) was slowly added $NaNO_2$ (66 mg, 0.95 mmol) at 0 °C. When the S.M. was all dissolve in the water solution, NaN_3 (62 mg, 0.95 mmol) was slowly added at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C

for another 2 hours until $NaHCO_{3(aq)}$ was added. The organic phase and the water phase were separated and the water phase was extracted with EtOAc 3 times. The organic phase were combined, dried and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (Hexane: EtOAc, 8 :2) to give (**2.31**) (200 mg, 0.84 mmol) as an orange solid. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.3 (s, 1H), 7.0 (d, *J* = 3.6 Hz, 2H), 4.6 (d, *J* = 3.3 Hz, 2H), 2.8 – 2.5 (m, 2H), 2.0 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 1.7 – 1.6 (m, 3H), 1.5 – 1.2 (m, 11H), 0.9 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 144.7, 137.8, 129.5, 129.3, 125.3, 118.2, 77.2, 61.7, 35.8, 32.0, 31.5, 29.6, 29.4, 29.4, 22.8, 14.2. ; IR (neat, cm^{-1}) 3354, 2929, 2856, 2114. ; calcd. for C15H23N3O: 284.1733, found 284.1736.

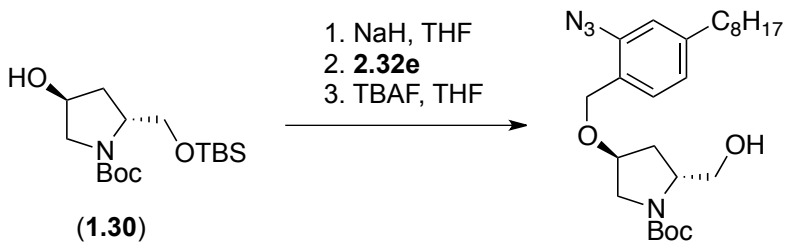
2-Azido-1-(bromomethyl)-4-octylbenzene (**2.32e**)



(**2.31**) (**2.32e**)

To a solution of (**2.31**) (200 mg, 0.77 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL) was slowly added HBr (0.15 mL, 0.84 mmol, 33% wt in AcOH) at 0 °C. The reaction is stirred 30 minutes at 0 °C before $NaHCO_{3(aq)}$ was added. The organic phase and the water phase were separated and the water phase was extracted with EtOAc 3 times. The organic phase were combined, dried and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (Hexane: EtOAc, 9.5 : 0.5) to give (**2.32e**) (200 mg, 0.74 mmol) as an orange oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.3 (s, 1H), 7.0 – 6.8 (m, 2H), 4.5 (s, 2H), 2.7 – 2.4 (t, 2H), 1.7 – 1.6 (m, 2H), 1.4 – 1.2 (m, 11H), 0.9 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 145.5, 138.1, 131.0, 125.9, 125.1, 118.2, 77.2, 35.6, 31.7, 31.0, 29.2, 29.1, 29.0, 28.5, 22.5, 13.9. ; IR (neat, cm^{-1}) 2925, 2855, 2115.

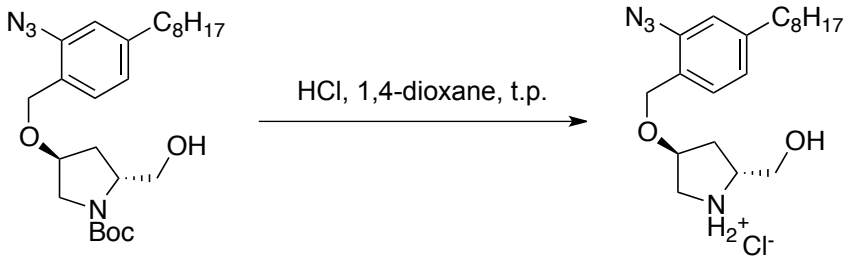
(2*R*,4*S*)-*Tert*-butyl 4-((2-azido-4-octylbenzyl)oxy)-2-(hydroxymethyl)pyrrolidine-1-carboxylate (2.34)



(**1.30**) (**2.34**)

Compound (**1.30**) (125 mg, 0.39 mmol) was dissolved in dry THF (1 mL), purged with Ar and cooled to 0°C before NaH (60% in mineral oil, 16 mg, 0.39 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min before (**2.32e**) (64 mg, 0.194 mmol) and Tetrabutylamonnium iodide (TBAI) (55 mg, 0.15 mmol) were sequentially added. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and the mixture was stirred overnight. The reaction was quenched with water, diluted with EtOAc and washed with water and brine 2-3 times, the organic phase was dried over $NaSO_4$ and filtrated. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in dry THF (1 mL) and TBAF (1.0 M in THF, 0.252 mL, 0.25 mmol) was added. The reaction was stirred at room temperature for 3 hours. When no more starting material was visible on TLC the reaction mixture was quenched with $NaHCO_3$ (sat.) and extracted 3 times with CH_2Cl_2. The organic layers were combined, dried over $NaSO_4$ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography (hexane: EtOAc, 6:4) to give the alcohol (**2.34**) (16 mg, 0.020 mmol) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.3 (s, 1H), 7.0 (s, 2H), 4.9 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 4.4 (s, 2H), 4.2 – 4.0 (m, 2H), 3.8 – 3.5 (m, 3H), 3.4 (s, 1H), 2.6 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.3 – 2.1 (m, 1H), 1.7 – 1.5 (m, 3H), 1.5 (s, 9H), 1.3 (d, *J* = 14.1 Hz, 11H), 0.9 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 157.2, 144.7, 137.8, 129.9, 126.5, 125.2, 118.1, 80.6, 77.2, 67.4, 66.1, 59.4, 53.2, 35.8, 34.7, 32.0, 31.5, 29.6, 29.4, 29.4, 28.6, 22.8, 14.2. ; IR (neat, cm^{-1}) 3255, 2926, 2855, 2112, 1676. ; $[\alpha]_D$ +18.6 (c = 1, $CHCl_3$); calcd. for C25H40N4O4: 483.2942, found 483.2952.

(2*R*,4*S*)-4-((2-Azido-4-octylbenzyl)oxy)-2-(hydroxymethyl)pyrrolidin-1-ium chloride (2.35)



(**2.34**) (**2.35**)

Compound (**2.34**) (16 mg, 0.020 mmol) was dissolved in 4 M HCl in dioxane (1 mL) and stirred 1-2 hours. TLC analysis of the crude mixture showed only the desired compound. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in pure dioxane and the solvent was evaporated again. The residue was crashed in Et_2O at 0 °C to afford a white solid (**2.35**) (10 mg, 0.019 mmol). ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.3 (s, 1H), 7.0 – 6.9 (m, 2H), 4.4 (s, 2H), 4.3 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 4.2 – 4.0 (m, 2H), 3.9 – 3.7 (m, 2H), 3.7 – 3.3 (m, 3H), 2.6 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.3 – 2.2 (m, 1H), 2.1 – 2.0 (m, 1H), 1.6 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 1.4 – 1.2 (m, 13H), 1.0 – 0.8 (m, 3H). ; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 145.0, 138.0, 130.3, 125.6, 125.3, 118.0, 77.2, 66.2, 61.0, 60.2, 50.3, 35.9, 32.8, 32.0, 31.5, 29.9, 29.6, 29.5, 29.4, 22.8, 14.3. ; IR (neat, cm^{-1}) 2919, 2118, 1671 1420. ; $[\alpha]_D$ +14.6 (c = 1, $CHCl_3$); calcd. for C20H33N4O2: 361.2598, found 361.2606.