

Université de Montréal

**Approches synthétiques d'analogues de  $\Delta^3$ -arylprolines fusionnés.**

**Synthèse et applications des dérivés pyrrolo-prolines.**

Par

Guillaume Jeannotte

Département de chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maîtrise ès science (M. Sc.)

En Chimie

Août 2004

© Guillaume Jeannotte, 2004

Université de Montréal





**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Approches synthétiques d'analogues de  $\Delta^3$ -arylprolines fusionnés.**

**Synthèse et applications des dérivés pyrrolo-prolines.**

Présenté par :

Guillaume Jeannotte

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président Rapporteur : Stephen Hanessian

Membre du Jury : André B. Charette

Directeur de recherche : William D. Lubell

Accepté le :

08/02/05

*À mes parents Paul-Aimé et Lucie,*

*À la mémoire de Fred Comtois...*

## SOMMAIRE

Les composés de type acide dihydroisoindolique peuvent être considérés comme des dérivés de  $\Delta^3$ -arylprolines fusionnés et aussi comme des analogues de phénylglycine possédant une contrainte conformationnelle. Étant donné l'importance de la proline dans le repliement des peptides et protéines ainsi que la présence du motif arylglycine dans les antibiotiques de type  $\beta$ -lactame comme Ampicilline et Amoxicilline, les dérivés  $\Delta^3$ -arylproline fusionnés sont des cibles intéressantes pour l'étude et l'amélioration des propriétés pharmacologiques de médicaments.

Ce mémoire présente nos études sur la modification du noyau proline dans le but de préparer des analogues de  $\Delta^3$ -hétéroaryl-proline fusionnés. Dans un premier temps deux approches ont été développées pour la synthèse de ces composés de façon énantiopure à partir de (2*S*)-4-oxo-*N*-(PhF)-prolinate de benzyle. La première méthode implique une allylation suivie d'une oxydation de type Wacker pour obtenir un 1,4-dicétone qui peut être traité avec différentes amines pour donner les analogues pyrrolo-proline, pyrrolo-pyrrole et pyridazino-pyrrole. Une autre approche utilise une condensation aldolique sur une série de *N*-Boc- $\alpha$ -aminoaldéhyde suivie d'une cyclisation en milieu acide catalytique. Des conditions pour la déprotection et pour l'alkylation du pyrrole ont aussi été développées. La déprotection par hydrogénation du groupement phénylfluorényle et de l'ester benzylique et une reprotection subséquente avec les groupements protecteurs Boc, Fmoc et Moz a permis d'obtenir des analogues prêts à être utilisés en synthèse peptidique.

Dans un deuxième temps, l'influence des  $\Delta^3$ -arylproline sur la conformation des peptides a été étudiée par la synthèse et la comparaison de la conformation de quatre tetra-peptides possédant le résidu proline et pyrrolo-proline en position *i*+1 et *i*+2 d'un repliement  $\beta$ . L'analyse conformationnelle par spectroscopie RMN 1D et 2D ainsi que par infrarouge a permis de démontrer que pyrrolo-proline permet une conservation de la conformation lorsqu'il est introduit en remplacement de proline dans un repliement  $\beta$ . Pyrrolo-proline peut donc être utilisé pour étudier les relations entre structure et activité de peptides possédant une résidu proline sans pour autant modifier la structure secondaire du peptide.

## MOTS CLÉS

Proline, pyrrole, peptides, acides aminés, repliement  $\beta$

## ABSTRACT

Compounds such as dihydroisoindolic acid can be viewed as fused  $\Delta^3$ -arylprolines, as well as constrained phenylglycine analogs. Considering the importance of proline residue in peptides and protein folding and the presence of the arylglycine moiety in  $\beta$ -lactam antibiotics such as Ampicillin and Amoxicillin, fused  $\Delta^3$ -arylprolines serve as interesting target for studying and improving pharmacologic properties of drug candidates.

This thesis presents a detailed research on the modification of the proline core in an attempt to prepare fused  $\Delta^3$ -heteroaryl-proline analogues. Two approaches were developed for their synthesis in enantiopure form starting from (2*S*)-4-oxo-*N*-(PhF)-proline benzyl ester. First, allylation followed by a Wacker oxidation gave the 1,4-diketone which was selectively converted to pyrrolo-proline, pyrrolo-pyrrole and pyridazino-proline. The second approach involved aldol condensations of 4-oxo-proline with a series of *N*-Boc- $\alpha$ -amino aldehydes followed by acid catalyzed cyclisation to give pyrrolo-prolines possessing a variety of pyrrole 5-position substituents. Conditions for deprotection and alkylation of the pyrroles were also developed. Hydrogenolytic cleavage of the phenylfluorenyl and benzyl ester groups followed by subsequent protection with Boc, Fmoc and Moz groups were performed to obtain analogues suitable for peptide synthesis

In the second part, the influence of a fused  $\Delta^3$ -arylproline on peptide conformation was studied by the synthesis and comparison of the conformations of tetrapeptides containing proline and pyrrolo-proline (PyPro). Pyrrolo-proline was demonstrated to be a conservative replacement for Pro in model  $\beta$ -turns as shown by analysis of DMSO titration curves, *cis*:*trans*-isomer populations, NOESY spectral data and IR spectra. Pyrrolo-proline may thus be used as a structural tool to study structure activity relationships of Pro containing peptides with minimal modification of secondary structure.



## **KEY WORDS**

Proline, pyrrole, peptides, amino acids,  $\beta$ -turns

**TABLE DES MATIÈRES**

<b>SOMMAIRE</b>	i
<b>MOTS CLÉS</b>	ii
<b>ABSTRACT</b>	iii
<b>KEY WORDS</b>	iv
<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	v
<b>LISTE DES FIGURES</b>	vii
<b>LISTE DES SCHÉMAS</b>	ix
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	x
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	xi
<b>REMERCIEMENTS</b>	xiii
<b>CHAPITRE 1</b>	
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
1.1 Conformation et structure des protéines	2
1.2 Peptides et structures secondaires	3
1.3 Importance de la proline dans les repliements	4
1.4 Analogues de la proline	5
1.5 $\Delta^3$ -Aryl-prolines fusionnés	10
1.6 Applications possibles des $\Delta^3$ -aryl-prolines fusionnés	13
1.7 Synthèse des $\Delta^3$ -aryl-prolines	15
1.8 Méthodes possibles pour la synthèse de pyrroles bicycliques	16
1.9 Approche	20
1.10 Références	23
<b>CHAPITRE 2</b>	
<b>Article 1 :</b>	
<b>Synthesis of Fused Heteroaryl-Prolines and Pyrrolo-Pyrroles</b>	<b>27</b>
2.1 Abstract	28

2.2 Introduction	29
2.3 Results and Discussion	30
2.4 Conclusion	38
2.5 Experimental Section	39
2.6 References	52

### **CHAPITRE 3**

#### **Article 2:**

#### **Large Structural Modification with Conserved Conformation;**

#### **Analysis of $\Delta^3$ -Fused Aryl Prolines in Model $\beta$ -Turns** 55

3.1 Abstract	56
3.2 Introduction	57
3.3 Results and Discussion	58
3.4 References (Article)	63
3.5 Supporting Information	64
3.6 Materials and Methods	71
3.7 References (Supporting info)	77

### **CHAPITRE 4**

<b>Conclusion et travaux futurs</b>	<b>78</b>
-------------------------------------	-----------

## LISTE DES FIGURES

## CHAPITRE 1

<b>Figure 1.</b> Structure générale des repliements $\beta$ et $\gamma$	3
<b>Figure 2.</b> Angles de torsion d'une chaîne peptidique	4
<b>Figure 3.</b> Délocalisation du doublet de l'azote dans le lien amide	5
<b>Figure 4.</b> Exemples de prolines modifiées dans le but de mimer d'autres acides aminés	6
<b>Figure 5.</b> Exemples de prolines modifiées dans le but de varier le ratio d'isomères <i>cis-trans</i>	7
<b>Figure 6.</b> Analogues de la proline utilisés dans le développement de drogues et peptides biologiquement actifs	8
<b>Figure 7.</b> Deux conformations possibles du cycle pyrrolidine de la proline en comparaison avec la planarité de 2,3-dehydroproline	9
<b>Figure 8.</b> Exemples de dérivés isoindoles	10
<b>Figure 9.</b> Importance des motifs arylglycine, dehydroisoindole et 3-cétoisoindoline	14
<b>Figure 10.</b> Analyse rétro-synthétique pour la synthèse du pyrrolo-proline <b>33</b>	15

## CHAPITRE 2

<b>Figure 1.</b> Representative Fused Aryl-Proline Analogs	29
--	----

## CHAPITRE 3

<b>Figure 1.</b> Representative Unsaturated, Aryl and Heteroaryl Prolines	57
<b>Figure 2.</b> Amide proton NMR chemical shift $\delta$ as a function of the percentage of DMSO in $CD_2Cl_2$ for peptides <b>4</b> and <b>5</b> (conc. $\cong 10$ mM)	60
<b>Figure 3.</b> Selected $^1H$ - $^1H$ NOESY cross peaks in $CD_2Cl_2$ as well as potential hydrogen bonds from DMSO titration curves for peptides <b>4b</b> and <b>5b</b>	61

<b>Figure 4.</b> Amide proton NMR chemical shifts in $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ at room temperature as a function of the logarithm of peptide concentration for <b>5a</b>	66
<b>Figure 5.</b> Selected $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY cross peaks in $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ as well as potential hydrogen bonds from DMSO titration curves for peptides <b>4a</b> and <b>5a</b>	69
<b>Figure 6.</b> Expanded NOE spectrum of peptide <b>5a</b> in $\text{CD}_2\text{Cl}_2$	69
<b>Figure 7.</b> Expanded NOE spectrum for peptide <b>5b</b> in $\text{CD}_2\text{Cl}_2$	70
<b>Figure 8:</b> NH-stretch regions from IR spectra of <b>4</b> and <b>5</b> in $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ [1 mM]	70

## CHAPITRE 4

<b>Figure 1 :</b> Dualité du dérivé pyrrolo-proline	79
---	----

## LISTE DES SCHEMAS

## CHAPITRE 1

<b>Schéma 1.</b> Différentes méthodes de synthèse des dérivés d'acide isoindolinique	12
<b>Schéma 2.</b> Synthèse de pyrrole par la méthode de Paal Knorr	16
<b>Schéma 3.</b> Alkylation d'une cétone cyclique pour obtenir un dérivé 1,4-nitrocétone	16
<b>Schéma 4.</b> Préparation d'un dérivé pyrrole par réduction d'un 1,4-nitrocétone	17
<b>Schéma 5.</b> Synthèse de pyrroles par condensation aldolique sur un Boc-aminoaldehyde	17
<b>Schéma 6.</b> Synthèse d'un pyrrole bicyclique par condensation de Knorr	18
<b>Schéma 7.</b> Synthèse d'un pyrrole bicyclique par cycloaddition de type hétéro-Diels-Alder	19
<b>Schéma 8.</b> Alkylation de la proline avec iodure allylique et acétate de bromométhyle	20
<b>Schéma 9.</b> Condensation aldolique de la 4-oxo-proline	21

## CHAPITRE 2

<b>Scheme 1.</b> Paal-Knorr Approach to Heteroaryl-Prolines	31
<b>Scheme 2.</b> Synthesis of Protected Pyrrolo-Prolines <b>17</b>	33
<b>Scheme 3.</b> Pyrrole Deprotection and Alkylation	34
<b>Scheme 4.</b> Synthesis of Protected Pyrrolo-Prolines for Peptides Synthesis	36
<b>Scheme 5.</b> Enantiomeric Purity of Pyrrolo-Proline <b>21a</b>	37

## CHAPITRE 3

<b>Scheme 1.</b> Synthesis of Protected Pyrrolo-Proline <b>3</b> for Peptide Synthesis	65
<b>Scheme 2.</b> Synthesis of Model Peptides <b>4b</b> and <b>5b</b> from FmocPyPro	66

## LISTE DES TABLEAUX

## CHAPITRE 3

<b>Table 1.</b> Cis-isomer <i>N</i> -terminal to Pro and PyPro (conc. $\cong$ 10mM)	59
<b>Table 2.</b> Chemical shifts and coupling constants for peptides <b>4a</b> and <b>4b</b> in CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> and 2:1 CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	67
<b>Table 3.</b> Comparative chemical shifts and coupling constants for the peptides <b>5a</b> and <b>5b</b> and for Gramcidin S	63

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

[ $\alpha$ ]	rotation spécifique [en (deg mL) / (g dm)]
Ac	acétyle
alloc	allyloxy-carbonyle
Ar	aryle
atm	atmosphère
Bn	benzyle
Boc	tert-butyloxy-carbonyle
PBT	biphényle tétrazole
br	<i>broad</i>
<i>c</i>	concentration
°C	degré Celcius
calcd	<i>calculated</i>
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
$\delta$	déplacement chimique en partie par million
d	doublet
dd	doublet de doublet
DHP	2,3-dehydroproline
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
Et	Éthyle
EtOH	éthanol
Fmoc	9-fluorénylméthylcarbamate
FmocOSuc	9-fluorométhyl succinimidyl carbonate
g	gramme
h	heure
HMPA	hexaméthylphosphoramide
IR	infra-rouge



<i>J</i>	constante de couplage (hertz)
LDA	lithium diisopropylamine
LRMS	<i>low resolution mass spectrometry</i>
$\mu$	micro
M	mol par litre
Me	méthyle
MHz	mégahertz
Mol	mole
Moz	methoxybenzylcarbamate
mmol	millimole
m	multiplet
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
PBP	<i>penicillin binding protein</i>
Ph	phényle
pf	point de fusion
PhF	phénylfluorényle
ppm	partie par million
PyPro	pyrrolo-proline
RMN	résonance magnétique nucléaire
s	singulet
Sip	$\gamma$ -(diméthylsila)-proline
t	triplet
TBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium tetrafluoroborate
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
TLC	<i>thin layer chromatography</i>
<i>p</i> -TsOH	acide <i>para</i> -toluènesulfonique

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier le professeur William D. Lubell de m'avoir donné l'opportunité d'approfondir ma formation au sein de son groupe. Sa passion pour la chimie et son enthousiasme ont été pour moi une grande source de motivation.

Merci aussi à mes collègues du B-618 qui ont partagé mon quotidien pendant ces belles années : Ramesh Kaul, Steven Ballet, Wim de Borggraeve, Catherine Girard et Simon Surprenant.

Merci à tous les membres du groupe, anciens ou présents, qui ont contribué à faire de moi une meilleure personne; spécialement : Rosa Melendez, Éryk Thouin, Félix-Antoine Marcotte, Jérôme Cluzeau et James Dettwiler.

Je remercie également Sylvie Bilodeau du laboratoire de résonance magnétique nucléaire et Dalbir Sekhon pour les analyses et purifications par LC-MS.

Enfin, je tiens à remercier de tout cœur mes parents pour leur appui, moral et surtout financier. Merci pour votre patience, votre compréhension et votre amour...

# **CHAPITRE 1**

## **Introduction**

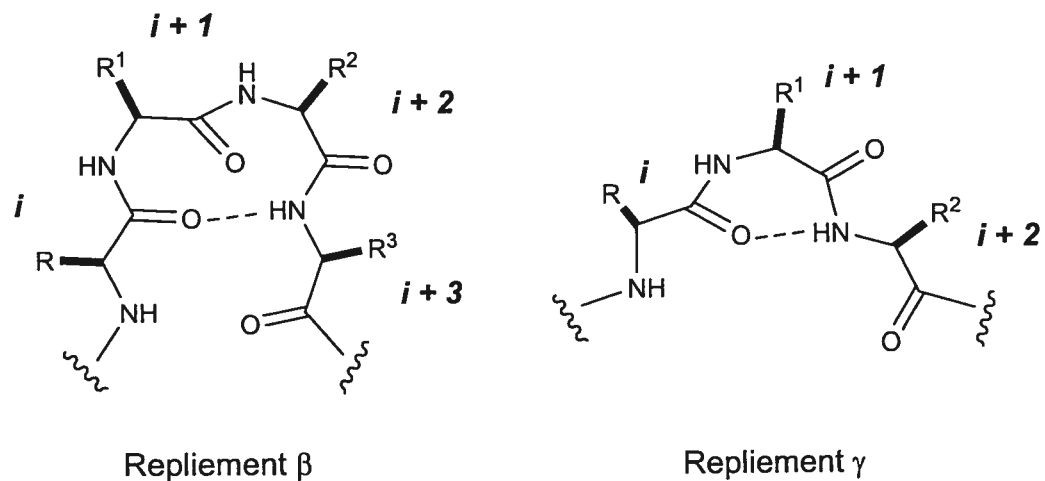
## 1.1 Conformation et structures des protéines

Les protéines sont un des constituants primaires de la vie. Par exemple, le collagène est le constituant majeur des structures qui servent au maintien des animaux supérieurs (i.e. os, tendons, peau, ligaments, vaisseaux sanguin et tissus conjonctifs) et compte pour le tiers des protéines du corps humain<sup>1</sup>. Même dans les plantes, où les carbohydrates sont plus abondants comme éléments structuraux, les protéines sont présentes dans les parties responsables de la croissance et de la reproduction.

Une protéine est simplement constituée de longues chaînes d'acides aminés appelés polypeptides qui peuvent être seules ou associées entre elles. L'ordre dans lequel les acides aminés de la chaîne principale sont associés est appelé la **structure primaire**. Le motif de repliement de la chaîne principale d'une protéine est appelé la **structure secondaire**, qui inclue l'hélice  $\alpha$ , le feuillet plissé, l'épingle  $\beta$  et les repliements  $\beta$  et  $\gamma$ . Le résultat du repliement, de l'enroulement et des autres processus d'agrégation des polypeptides donne la **structure tertiaire**. C'est à ce niveau que l'on peut séparer deux grandes classes de protéines la première étant les protéines fibreuses comme le collagène ou la kératine, constitués d'hélices  $\alpha$  entrelacées entre elles, qui sont insolubles dans l'eau et souvent longiformes. La deuxième classe constitue les protéines globulaires qui sont sphériques ou ellipsoïdales et constituent les protéines ayant diverses fonctions comme la catalyse biologique (enzymes), la régulation (hormones) le transport ou l'entreposage. Enfin, la **structure quaternaire** est l'association de protéines avec des sucres, des résidus inorganiques, ou d'autres protéines<sup>2</sup>.

## 1.2 Peptides et structures secondaires

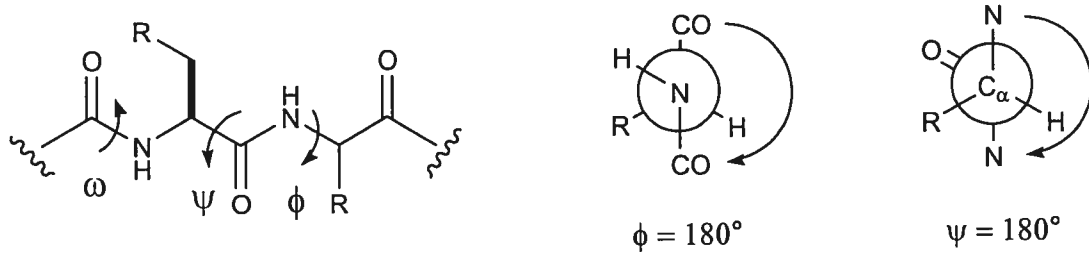
Les peptides sont aussi constitués d'une chaîne d'acides aminés formant de petites molécules et sont une classe importante de composés trouvant des applications dans divers domaines de la biochimie, physiologie et pharmacologie. Dans le corps humain, les peptides ont des applications dans le système nerveux central (neuropeptides), gastro-intestinal (hormones aglandulaires), immunitaire (peptides immunostimulants), dans la régulation du flux sanguin et la dilatation des vaisseaux (rénine-angiotensine) et dans la formation des os (calcitonine).<sup>3</sup>



**Figure 1.** Structure générale des repliements  $\beta$  et  $\gamma$

L'étude des structures secondaires des peptides est un important domaine de la chimie des protéines puisqu'il est reconnu qu'une grande quantité de peptides biologiquement actifs adoptent une conformation précise. C'est donc non seulement la structure d'un peptide qui le rend biologiquement actif, mais aussi sa conformation qui permet les phénomènes de reconnaissance moléculaire.<sup>4,5</sup> Une classe importante des structures secondaires est le repliement qui se définit comme un site où la chaîne peptidique inverse sa direction formant ainsi un tour. Les termes  $\beta$  et

$\gamma$  sont utilisés pour définir les repliements de quatre et trois résidus, respectivement (Figure 1). Il existe une variété de ces repliements qui ont été catégorisés en fonction des angles dièdres  $\phi$  et  $\psi$  du deuxième ( $i+1$ ) et troisième ( $i+2$ ) résidus pour les repliements  $\beta$  et du second résidu ( $i+1$ ) pour les tours  $\gamma$  (Figure 2).<sup>5-8</sup>

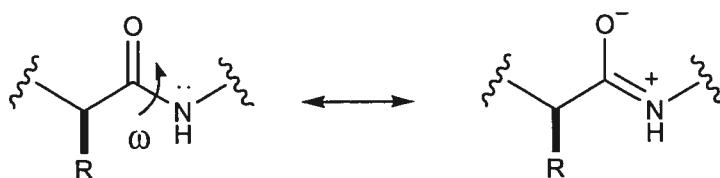


**Figure 2.** Angles de torsion d'une chaîne peptidique

### 1.3 Importance de la proline dans les repliements

La proline est le seul acide aminé protéinogénique cyclique, ce qui lui donne une rigidité conformationnelle. Son angle  $\phi$  est fixé à  $-60 \pm 15^\circ$ , ce qui lui permet d'avoir une influence importante sur la conformation des peptides et protéines. Tout d'abord, à cause de son cycle pyrrolidine, la proline ne possède pas de NH libre, empêchant ainsi la formation de ponts hydrogène avec la chaîne principale. De plus, l'interaction stérique entre le carbone  $\delta$  du cycle pyrrolidine et le carbone  $\alpha$  de l'acide aminé précédent affecte la conformation du résidu *N*-terminal à la proline. Cette interaction aura aussi pour effet de diminuer la différence d'énergie entre les isomères et de diminuer la barrière de rotation des isomères *cis* et *trans* du lien Xaa-Pro.<sup>9</sup> En effet, dans un lien peptidique, il y a délocalisation du doublet de l'azote du lien amide (Figure 3), ce qui a pour conséquence d'amener le carbone et l'oxygène du carbonyle ainsi que

l'azote et le proton de l'amide dans un même plan. Ceci permet donc deux valeurs pour  $\omega$ , soit  $0^\circ$  pour l'isomère *cis* et  $180^\circ$  pour l'isomère *trans*, ce dernier étant favorisé dans le cas de peptides ne contenant pas d'amide *N,N*-disubstitué. Cette isomérisation *cis-trans* des peptides est un processus lent qui est impliqué dans le mécanisme de repliement des protéines<sup>10</sup> et peut être induit par une enzyme appelée proline-*cis/trans*-isomérase.<sup>11</sup>

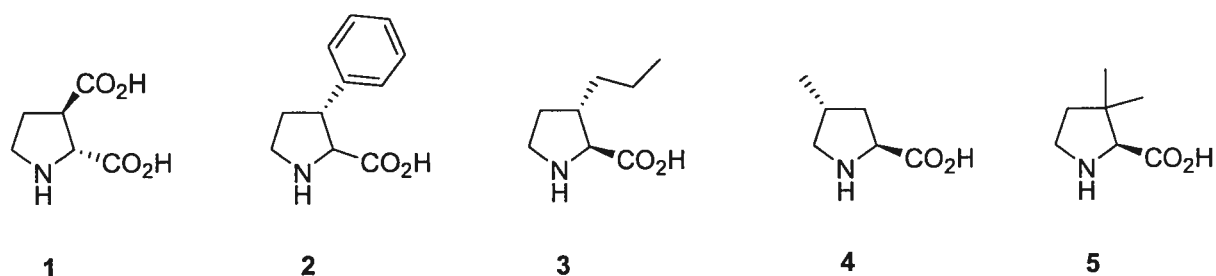


**Figure 3.** Délocalisation du doublet de l'azote dans le lien amide

#### 1.4 Analogues de la proline

Le motif proline se retrouve dans une variété de produits naturels et plusieurs études biochimiques, métaboliques et cliniques ont focussé leur attention sur les métabolites, analogues et homologues de la proline.<sup>1,12</sup> Des modifications de la proline ont été effectuées dans le but de mimer d'autres acides aminés tout en restreignant leur liberté conformationnelle (Figure 4). Par exemple, l'acide pyrrolidine-2,3-carboxylique **1** a été conçu comme analogue restreint conformationnellement de l'acide aspartique et utilisé pour inhiber la recapture du glutamate de la fente synaptique.<sup>13</sup> 3-Phényl-proline **2** et 3-propyl-proline **3** ont aussi été préparés sous forme racémique pour mimer respectivement phénylalanine et norleucine.<sup>14</sup> Le remplacement du résidu méthionine par 3-propyl-L-proline **3** dans le peptide Boc-CCK<sub>4</sub> (Boc-Trp-Met-Asn-Phe-NH<sub>2</sub>) a permis d'obtenir un analogue ayant plus d'affinité au CCK-B, un récepteur du système nerveux central.<sup>15</sup> L'analogue 4-méthyl-proline **4** a pour sa part été obtenu par cyclisation d'un dérivé de

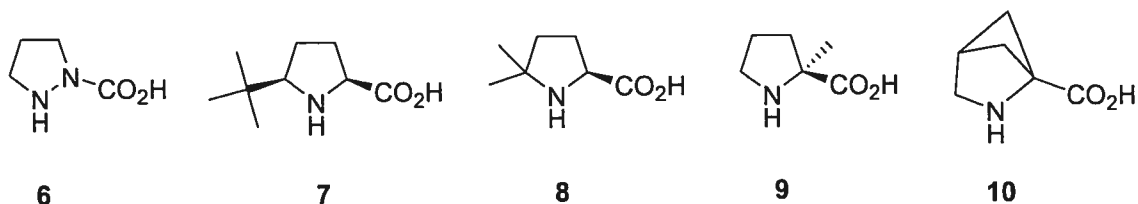
$\gamma$ -méthylglutamate pour donner un mime de la leucine avec une contrainte conformationnelle.<sup>16</sup> Enfin, la 3,3-diméthylproline **5** a été préparée en utilisant comme produit de départ la 4-hydroxyproline, permettant d'obtenir un analogue de la valine avec contrainte conformationnelle.<sup>17</sup>



**Figure 4.** Exemples de prolines modifiées dans le but de mimer d'autres acides aminés

Différents analogues de la proline ont aussi été synthétisés dans le but de modifier le ratio d'isomère *cis* et *trans* du lien amide *N*-terminal de la proline (Figure 5). Par exemple, l'étude de peptides contenant le dérivé aza-proline **6**, où le carbone- $\alpha$  est remplacé par un atome d'azote, a démontré que l'isomère *cis* était favorisé, donnant lieu à des repliements de type VI.<sup>18,19</sup> L'influence des interactions stériques sur la conformation *cis-trans* a aussi été étudiée en utilisant 5-*tert*-butylproline **7** dans différents peptides démontrant aussi une conformation de repliement de type VI.<sup>20,21</sup> Un autre dérivé encombré stériquement,  $\delta,\delta$ -diméthyl-proline **8** a été développé pour contraindre la proline dans sa conformation *cis* et retarder l'isomérisation *cis/trans* d'une protéine durant son repliement.<sup>22</sup> Le 2-méthylproline **9**<sup>23</sup> et le 2,4-methanoproline **10**<sup>24</sup> ont été préparés et introduits dans des peptides pour forcer une configuration *trans* du lien Xaa-MePro.

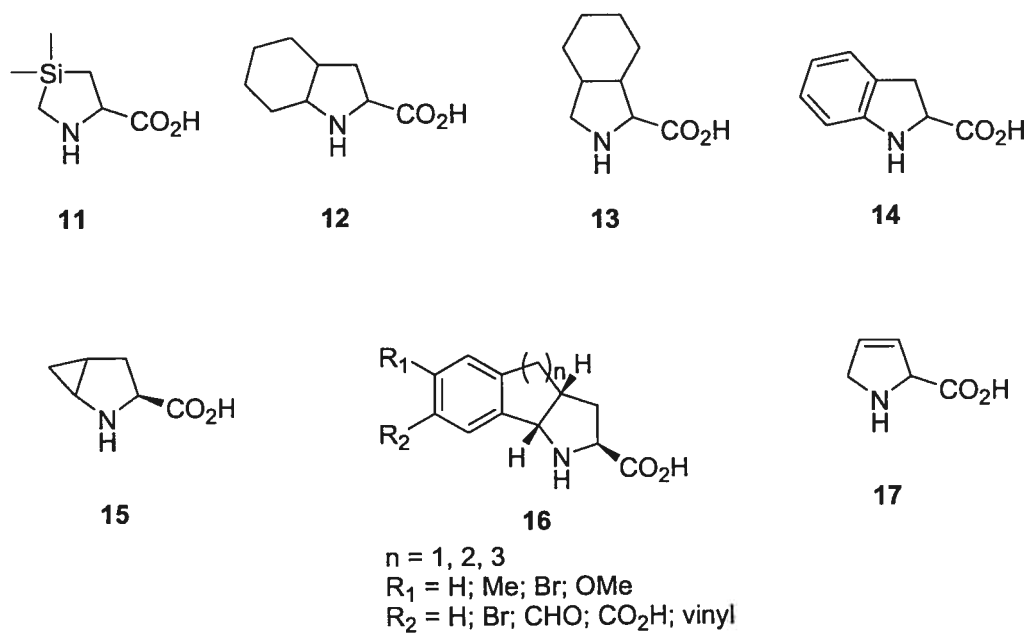




**Figure 5.** Exemples de prolines modifiées dans le but de varier le ratio d'isomères *cis-trans*

Enfin, différents analogues de proline ont été synthétisés pour développer des drogues ou pour modifier les propriétés biologiques de peptides permettant ainsi d'étudier les relations entre structure et activité (Figure 6). Par exemple, le remplacement de proline par  $\gamma$ -(diméthylsila)proline (Sip) **11** dans des di- et tri-peptides a démontré une conservation de la conformation vérifiée par diffraction des rayons X et spectroscopie RMN et IR, mais aussi une augmentation de la lipophilicité et une résistance accrue à la biodégradation. Par exemple, l'intégration de **11** dans un analogue de la neurotensine a démontré une rétention de l'affinité pour les récepteurs de neurotensine hNTR 1 et hNTR 2 et une activité maintenue dans des conditions où le peptide parent est rapidement dégradé.<sup>25</sup> Les dérivés acide octahydroindolinique **12** et acide octahydroisindolinique **13** ont pour leur part été utilisés pour l'étude du site de reconnaissance de l'enzyme ACE (angiotensine convertant enzyme) dans le but de développer de nouveaux agents dans le traitement de l'hypertension<sup>26,27</sup> De même, l'acide indolinique **14** a aussi été utilisé dans le développement d'inhibiteur d'ACE analogue à Captopril en se basant sur le fait que l'hydrophobicité joue un rôle important dans l'interaction d'un substrat ou d'un inhibiteur au site actif d'un enzyme.<sup>28-30</sup> L'importance de la conformation a aussi été étudiée en préparant un analogue de Captopril où la proline a été remplacée par 4,5-méthano-proline **15**. Cet analogue de la proline possédant un cyclopropane en  $\Delta^4$  a été analysé par rayon-X et a démontré une plus grande planarité du cycle pyrrolidine en comparaison avec L-proline.<sup>31</sup> Plus récemment,

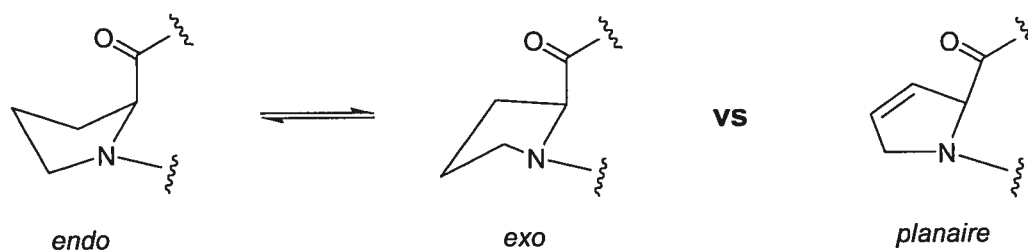
différents analogues polycycliques de la proline tels que **16** ont aussi été synthétisés comme analogues d'inhibiteurs d'ACE.<sup>32</sup> En plus d'être utilisé dans l'étude des inhibiteurs d'ACE, le composé **12** a pour sa part été employé pour préparer des dérivés du peptide bradykinine, un hormone impliqué dans différents processus physiologiques comme la douleur et les symptômes de la grippe.<sup>33,34</sup> La modification de la proline avait pour but d'obtenir un analogue de bradykinine possédant la conformation bioactive du peptide et pouvant être utilisé comme antagoniste : c'est-à-dire bloquer le récepteur pour empêcher l'activité.



**Figure 6.** Analogues de la proline utilisés dans le développement de drogues et peptides biologiquement actifs

Un autre dérivé de la proline qui n'affecte pas la conformation lorsqu'il est introduit dans les peptides est l'analogue 2,3-dehydroproline (DHP) **17**. En effet, l'introduction dans un peptide cyclique de 14 membres analogue de Gramicidin S a démontré que le remplacement de proline

par **17** donnait un analogue avec une conformation similaire constitué de deux feuillets  $\beta$  attachés entre eux par des repliements  $\beta$  ayant D-Phe-DHP comme résidus centraux<sup>35</sup>. De plus, l'introduction de **17** dans différents peptides a démontré une rétention ou une augmentation de l'activité biologique. Par exemple, un analogue de bradykinine contenant **17** en remplacement de Pro<sup>3</sup> a démontré pratiquement la même activité pharmacologique que bradykinine<sup>36</sup> et une activité supérieure pour l'inhibition de la prolyl hydroxylase, une enzyme impliquée dans la biosynthèse du collagène.<sup>37</sup> Aussi, le remplacement de la proline en position 7 de l'oxytocine par **17** a démontré un potentiel antidiurétique (diminue l'élimination de l'eau par les urines) et utérotonique (provoque la contraction de l'utérus) double à celui de l'oxytocine.<sup>38</sup> Deux hypothèses ont été émises pour expliquer cette augmentation de l'activité : premièrement, l'introduction d'un nuage électronique déformable due à la liaison double pourrait augmenter l'affinité de l'analogue pour le récepteur. Il est aussi possible que la présence du lien double empêche la conversion rapide du cycle pyrrolidine entre ses deux conformations *endo* et *exo* du carbone 5 (Figure 7) en créant une nouvelle conformation planaire plus apte à interagir avec le récepteur.<sup>38</sup>



**Figure 7.** Deux conformations possibles du cycle pyrrolidine de la proline en comparaison avec la planarité de 2,3-dehydroproline

### 1.5 $\Delta^3$ -Aryl-prolines fusionnés

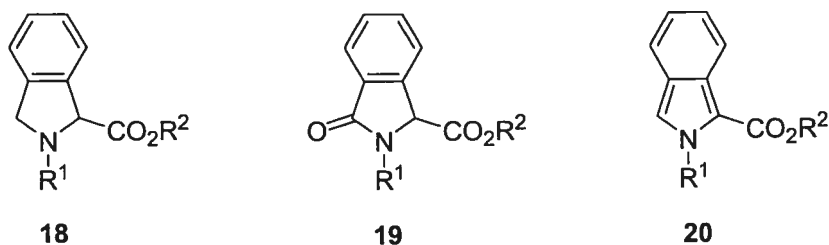
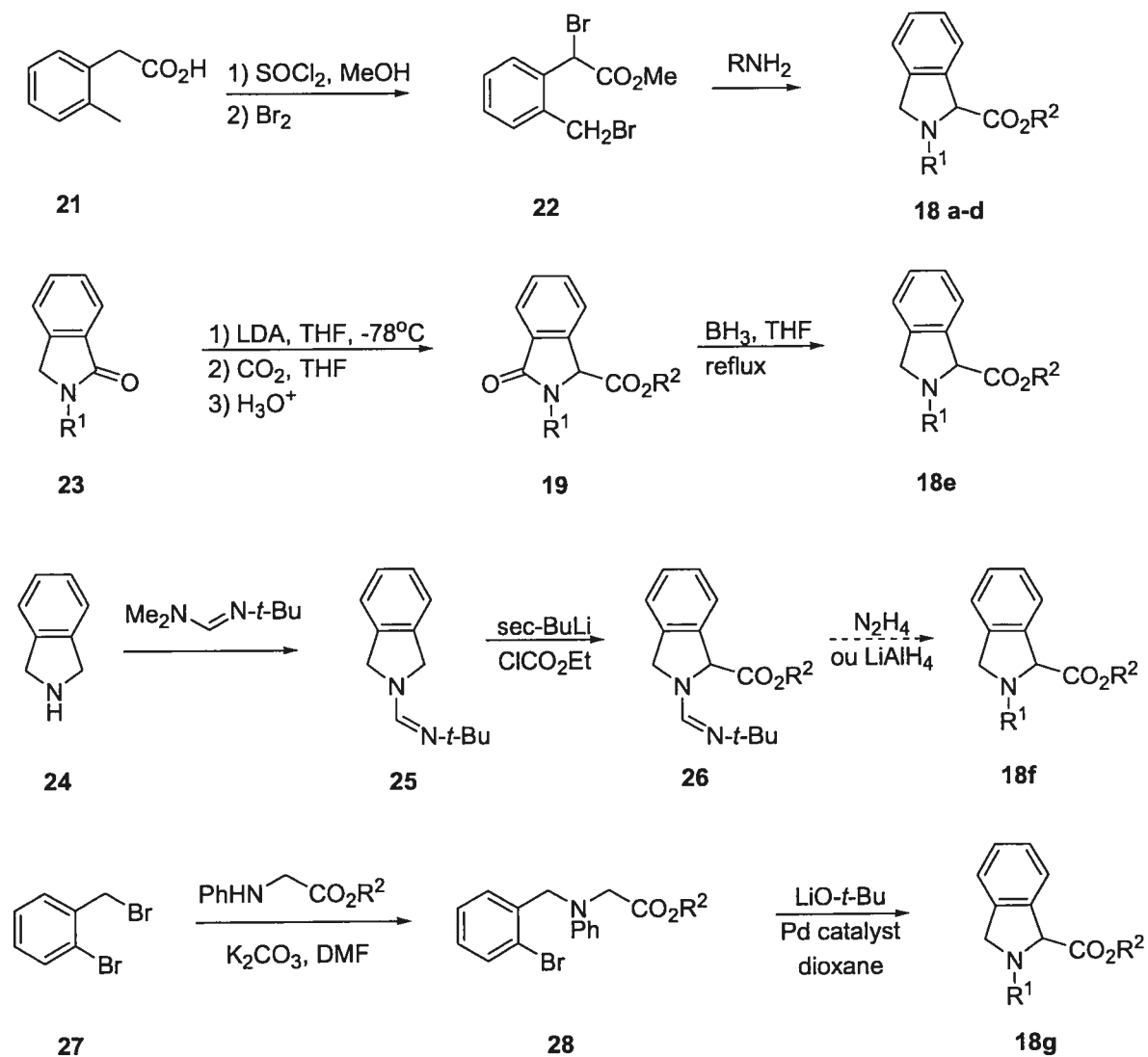


Figure 8. Exemples de dérivés isoindoles

Parmi les analogues de la proline, les dérivés de  $\Delta^3$ -aryl-proline **18** ( $R^1 = R^2 = H$ ) ont reçu peu d'attention principalement à cause des difficultés au niveau synthétique. La première synthèse qui fut développée (Schéma 1) utilise comme produit de départ l'acide *o*-méthylphénylacétique **21**. La formation du méthyl ester, suivie par une bromination donne l'intermédiaire *o*-bromométhylphénylacétate **22**. Ce dernier est par la suite traité avec différentes amines pour donner différents dérivés de l'acide isoindolinique **18a-d** qui ont dû être isolés sous forme du sel d'acide chlorhydrique pour empêcher la décomposition en méthyl ester de l'acide 3-céto-isoindolinique **19** et de l'acide isoindolique **20**.<sup>39</sup> Une autre méthode emploie le 3-céto-isoindoline **23** comme produit de départ qui est déprotonné à l'aide de LDA puis alkylé avec dioxyde de carbone gazeux. L'acide 3-céto-isoindolinique **19** ( $R = \text{MeOPh}$ ) ainsi obtenu est par la suite réduit avec borane pour donner l'acide dihydroisoindolique **18e** ( $R = \text{MeOPh}$ ).<sup>40</sup> Une méthodologie analogue utilise le dihydroisoindole **24** qui est d'abord protégé sous la forme du formamidine **25**, puis alkylé en utilisant chloroformate d'éthyl comme électrophile pour donner le dérivé amidine éthyl ester de l'acide dihydroisoindolique **26**. Une déprotection du formamidine en utilisant hydrazine ou  $\text{LiAlH}_4$  est rapportée mais il est à noter que le produit **18f** n'a pas été

isolé mais plutôt caractérisé sous la forme du formamidine **26**.<sup>41</sup> La méthode la plus récente pour la synthèse de l'acide dihydroisoindolique implique l'arylation intramoléculaire d'un précurseur de la glycine catalysée par le palladium.<sup>42</sup> Le *tert*-butyl ester de la *N*-phénylglycine est d'abord additionné sur le bromure de 2-bromobenzyle **27** pour donner l'intermédiaire *tert*-butyl ester de la *N*-(2-bromobenzyle)-*N*-(phénylglycine) **28**, qui est par la suite traité avec une quantité catalytique d'acétate de palladium en présence d'un ligand phosphine et de *tert*-butoxide de lithium pour donner **18g**.

Il est à noter que toutes ces méthodes construisent le centre chiral d'une manière non contrôlée donnant ainsi un produit racémique. De plus, l'amine libre n'a été isolée que dans la première synthèse sous forme de sel d'acide chlorhydrique, rendant ainsi les autres méthodes incompatibles avec l'incorporation des acides isoindoliniques dans les peptides.

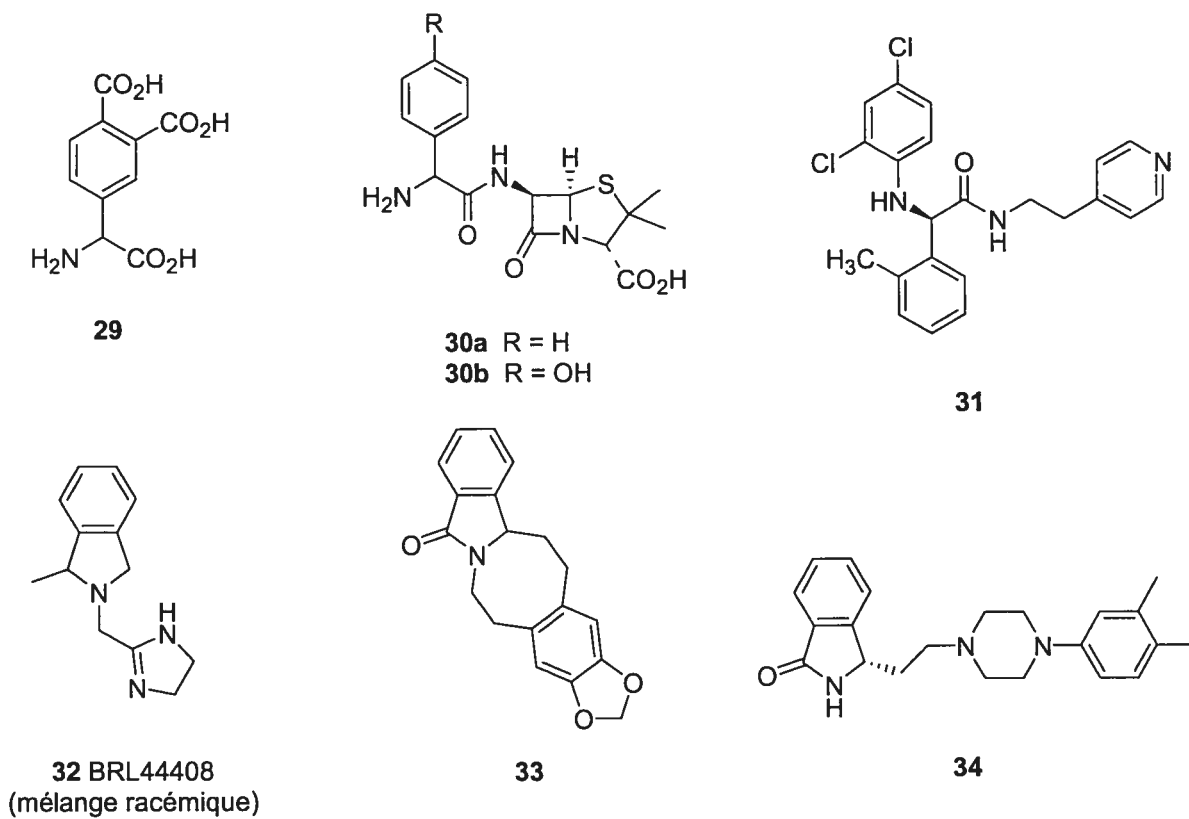
**Schema 1.** Différentes méthodes de synthèse des dérivés d'acide isoindolinique

18	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
a	H	Me
b	Me	Me
c	Ph	Me
d	Bn	Me
e	MeOPh	H
f	H	Et
g	Ph	<i>t</i> -Bu

## 1.6 Applications possibles des $\Delta^3$ -Aryl-prolines fusionnés

L'acide dehydroisoindolique **18** peut être considéré comme un analogue de phénylglycine avec restriction conformationnelle due au cycle pyrrolidine. Les dérivés de phénylglycine **29** possédant des fonctionnalités acide carboxylique en position 3 et 4 du cycle aromatique ont trouvés des applications comme antagoniste du récepteur métabotropique (récepteur couplé à une protéine G) du glutamate (mGluRs).<sup>43</sup> Plus récemment, des dérivés de *N*-(phényl)-phénylglycine comme **31** ont trouvé des applications comme antagoniste du h-CRF<sub>1</sub> un récepteur responsable de la production de corticotropine, une hormone peptidique régulant la production endogène de cortisone et de la cortisolé.<sup>44</sup> Les arylglycines se retrouvent aussi dans les antibiotiques de type  $\beta$ -lactame comme ampicilline **30a**<sup>45</sup> et amoxicilline **30b**<sup>46</sup> et dans certains antibiotiques de type glycopeptidiques comme la vancomycine.<sup>47</sup> Le remplacement de phénylglycine par un dérivé d'acide dehydroisoindolique possédant une restriction conformationnelle pourrait donc permettre de mieux d'en apprendre sur les conformations actives de ces drogues.

De plus, le motif dehydroisoindole présent dans BRL44408 **32**, un antagoniste sélectif du  $\alpha_{2A/D}$ -adrénocepteur, qui est un récepteur qui régule la production de noradrénaline et provoque la constriction des artères.<sup>48</sup> Le motif céto-isoindoline est pour sa part présent dans différents produits naturels, comme le Lennoxamine **33**, un alcaloïde isolé du berbérís.<sup>49</sup> Il est aussi présent dans (*R*)-PD172938 **34** un composé synthétique qui a démontré une affinité pour le récepteur dopaminergique D<sub>4</sub>, impliqué dans les désordres neuropsychologiques comme la schizophrénie.<sup>50</sup>

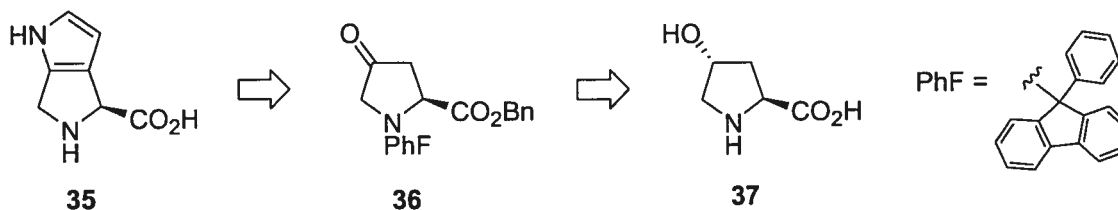


**Figure 9.** Importance des motifs arylglycine, dehydroisoindole et 3-céto-isoindoline



## 1.7 Synthèse des $\Delta^3$ -Hétéroaryl-prolines

Malgré le potentiel au niveau des peptides biologiquement actifs et de la découverte de nouvelles drogues, le développement de méthodologies pour synthétiser des dérivés d'acide isoindolinique de manière chirale reste à développer. Nous avons donc envisagé la synthèse d'un analogue de type hétéroaryl-glycine avec restriction conformationnelle, le pyrrolo-proline **35** en utilisant  $(2S,4R)$ -4-hydroxyproline **37** comme produit de départ chiral (Figure 10). La méthodologie de synthèse et applications de la 4-oxo-proline a été utilisée dans la préparation des analogues d'arylkainoïdes<sup>51,52</sup> ainsi que dans la synthèse de la 3,3-diméthylproline.<sup>17</sup> L'utilisation de 4-oxoproline devrait donc permettre d'obtenir un produit enantiopure et la construction de l'hétérocycle sur la proline ouvrirait la voie à la diversification de l'azote et des positions 2 et 3 du pyrrole.

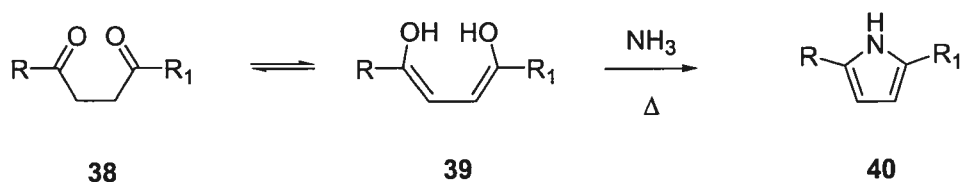


**Figure 10.** Analyse rétro-synthétique pour la synthèse du pyrrolo-proline **35**

## 1.8 Méthodes possibles pour la synthèse de pyrroles bicycliques

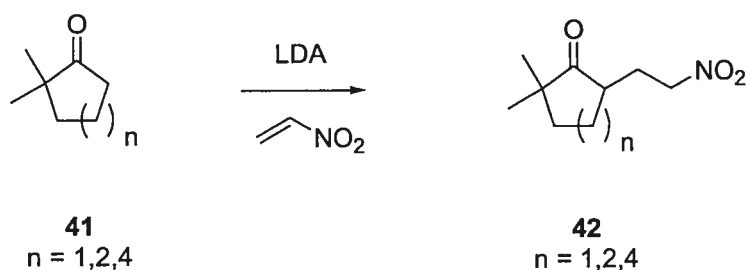
La première méthode de synthèse de pyrrole fut développée dans les années 1880 par Paal et Knorr et implique le traitement d'un motif 1,4-dicétone par une amine.<sup>53,54</sup>

**Schéma 2.** Synthèse de pyrrole par la méthode de Paal Knorr<sup>53,54</sup>

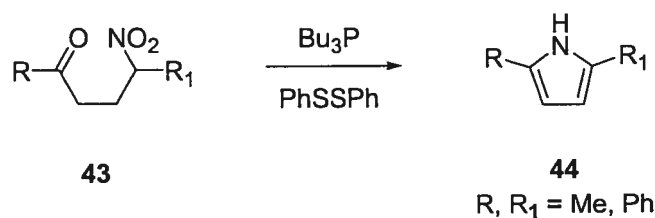


Parmi les autres méthodes nécessitant la fonctionnalisation de la position 3 du dérivé 4-oxo-proline 36, il serait aussi possible d'envisager une addition de Michael sur le nitroéthylène pour obtenir un dérivé 3-nitroéthyl-4-oxo-proline 42; ce type d'alkylation ayant été effectué sur différents analogues de cétones cycliques (Schéma 3).<sup>55</sup>

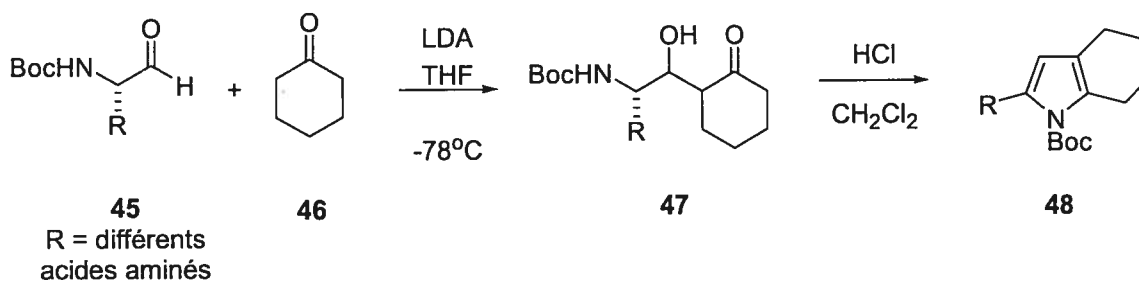
**Schéma 3.** Alkylation d'une cétone cyclique pour obtenir un dérivé 1,4-nitrocétone



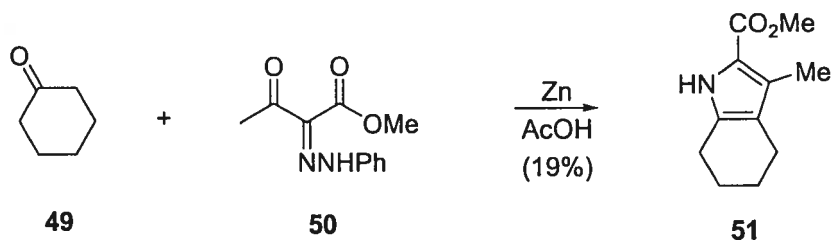
De plus, la réduction de 1,4-nitrocétones en utilisant un mélange de tributylphosphine et de diphenyldisulphide a été utilisé pour la synthèse de pyrroles et pourrait donc permettre d'obtenir le composé désiré (Schéma 4).<sup>56</sup>

**Schéma 4.** Préparation d'un dérivé pyrrole par réduction d'un 1,4-nitrocétone

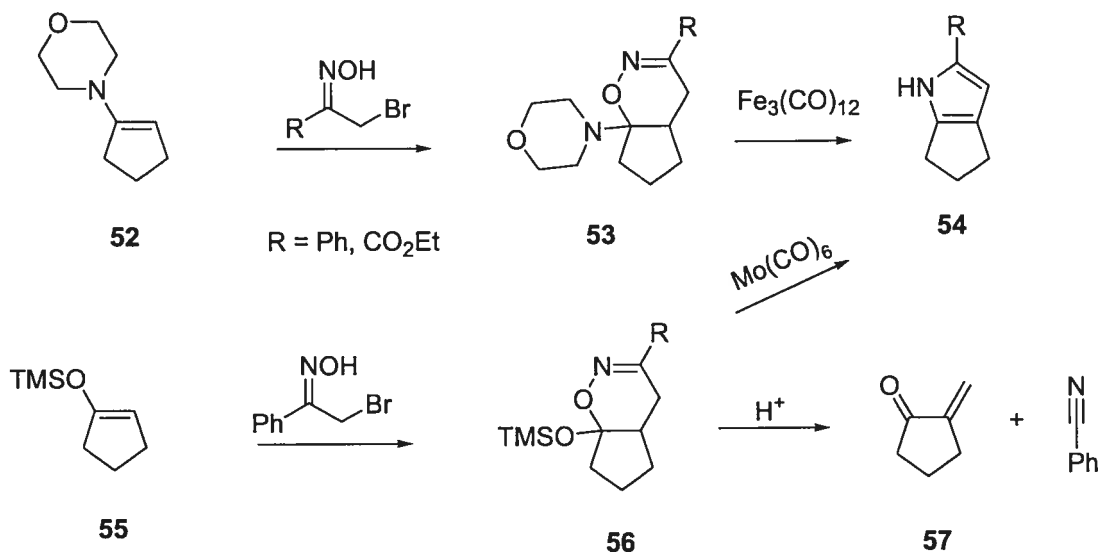
Une approche générale a aussi été développée pour la synthèse de pyrroles par condensation aldolique de cétones sur des *N*-Boc- $\alpha$ -aminoaldéhydes suivie par une cyclisation en milieu acide catalytique.<sup>57</sup> Les avantages de cette dernière méthode sont la possibilité de fonctionnaliser la position 2 du pyrrole en utilisant différents *N*-Boc- $\alpha$ -aminoaldéhydes (Schéma 5).

**Schéma 5.** Synthèse de pyrroles par condensation aldolique sur un Boc-aminoaldéhyde

Peu d'autres méthodes sont connues pour la synthèse de pyrroles à partir d'une cétone cyclique. Un exemple utilise un dérivé phénylhydrazone de l'acétate de méthyl propionyl **50** pour effectuer une condensation de Knorr sur la cyclohexanone en présence de zinc et d'acide acétique pour obtenir le pyrrole bicyclique **51** avec 19% de rendement (Schéma 6). Aucun détail expérimental n'est donné dans la procédure et aucune caractérisation du produit n'est fournie.<sup>58</sup>

**Schéma 6.** Synthèse d'un pyrrole bicyclique par condensation de Knorr <sup>58</sup>

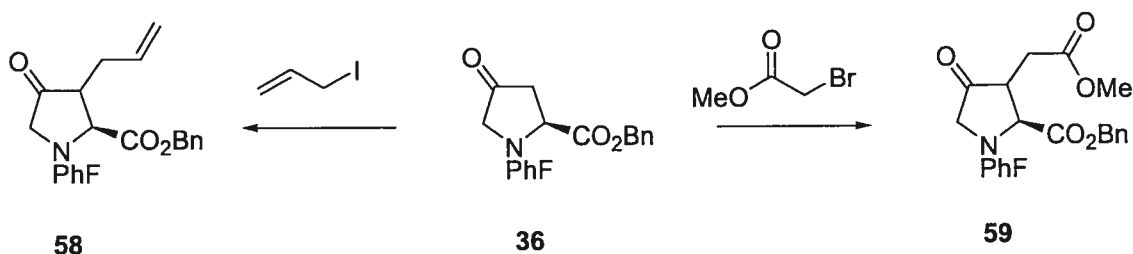
Une autre méthode a été développée simultanément par deux groupes <sup>59,60</sup> et emploie l'énamine **52** ou le silyl-enol ether **55** de la cyclopentanone et effectue une cycloaddition de type hétéro-Diels-Alder pour obtenir les intermédiaires dihydro-oxazine **53** et **56** (Schéma 7). La déoxygenation réductive à l'aide de  $\text{Fe}_3(\text{CO})_{12}$  ou du molybdène hexacarbonyl conduit au pyrrole **54**. La limitation de cette méthode est l'instabilité du dérivé **52** qui effectue en présence de traces d'acide la rétro-hétéro-Diels-Alder pour donner le composé  $\alpha,\beta$ -insaturé **57**.<sup>59</sup> De plus, il a été démontré que l'énamine de la 4-oxo-proline **35** n'est pas stable et éjecte le groupement phénylfluorényle pour donner le 4-aminopyrrole correspondant.<sup>61</sup>

**Schéma 7.** Synthèse d'un pyrrole bicyclique par cycloaddition de type hétéro-Diels-Alder

## 1.9 Approche

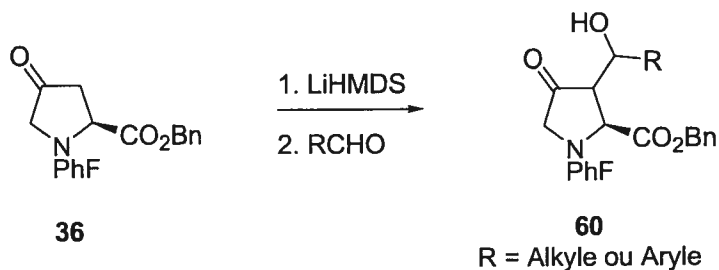
Parmi les différentes méthodes énumérées précédemment, deux semblent plus applicables à notre système. Tout d'abord la méthode de Paal-Knorr, qui nécessiterait l'alkylation de la position 3 de la 4-oxoproline **36**. Il a été démontré que les électrophiles acétate de bromométhyle et iodure allylique réagissent avec l'énolate de **36** pour substituer la position 3 de la proline (Schéma 8).<sup>17,51</sup>

**Schéma 8.** Alkylation de la proline avec iodure allylique et acétate de bromométhyle<sup>17,51</sup>



Il serait donc envisageable d'utiliser un alkyl- ou aryl-2-bromoacétate comme électrophile pour obtenir le motif 1,4-dicétone. Une autre possibilité serait d'utiliser le dérivé 3-allyl-4-oxoproline **58** qui est connu, et effectuer une oxydation de type Wacker<sup>62</sup> pour obtenir le dicétone correspondant. Enfin, l'alkylation avec un alkyl- ou aryl-bromo-propène suivie d'un clivage oxydatif du lien double pourrait aussi fournir un motif 1,4-dicétone pouvant être soumis aux conditions de Paal-Knorr pour donner les dérivés du pyrrole.

L'autre méthodologie envisageable est d'effectuer la condensation aldolique de la 4-oxoproline sur différents Boc-aminoaldéhyde et de cycliser en milieu acide catalytique, tel que décrit dans le schéma 5. En effet, il a été démontré qu'il est possible d'effectuer des réactions de type aldol sur la 4-oxo-proline en utilisant des aldéhydes aliphatiques et aromatiques.<sup>63</sup>

**Schéma 9.** Condensation aldolique de la 4-oxo-proline<sup>63</sup>

Ce mémoire de maîtrise présente donc les résultats obtenus pour la synthèse des pyrroloprolines de structure générale **35**. Le deuxième chapitre, sous forme d'article, est consacré à la synthèse de ce composé par deux approches utilisant la 4-oxo-proline **36** comme produit de départ. La première consiste en l'allylation de **36** suivie d'une oxydation de type Wacker pour obtenir le dicétone; des conditions ont ensuite été développées pour obtenir différents hétérocycles par traitement avec différentes amines. D'abord, le traitement du 1,4-dione avec hydrazine a permis d'obtenir le pyridazino-proline. En traitant le dicétone avec benzylamine en présence d'acide, un mélange du produit pyrrolo-proline et du composé d'élimination du phénylfluorényle, le pyrrolo-pyrrole ont été obtenus: les conditions ont donc été optimisées pour obtenir sélectivement les deux composés.

La deuxième méthode implique pour sa part la condensation aldolique de 4-oxo-proline **34** sur différents *N*-Boc- $\alpha$ -aminoaldehydes, suivie par une cyclisation en milieu catalytique pour obtenir le *N*-Boc-pyrrolo-proline. Des conditions pour déprotéger sélectivement le groupement Boc et pour alkyler l'azote du pyrrole ont aussi été développées. Finalement, le clivage du groupement benzyle et phénylfluorényle a été effectué par hydrogénation suivie d'une protection avec les groupes Boc, Fmoc et Moz pour obtenir des analogues prêts à être utilisés dans le couplage des peptides. La pureté énantiomérique a aussi été déterminée par couplage du dérivé

Boc-pyrrolo-proline avec L- et D-phénylalanine en se basant sur les protons diastéréotopiques du pyrrole qui a démontré une pureté diastéréomérique des dipeptides supérieure à 99%.

Le troisième chapitre de ce mémoire est aussi présenté sous forme d'article et est consacré à l'introduction de l'analogue pyrrolo-proline dans des peptides modèles adoptant un repliement  $\beta$ . Pour la première fois, l'influence d'un  $\Delta^3$ -arylproline fusionné sur la conformation des peptides a été étudiée et comparée à celle de la proline. L'article décrit la synthèse et les études spectroscopiques effectuées sur quatre térapeptides contenant proline ou l'analogue pyrrolo-proline en position  $i+1$  et  $i+2$  d'un repliement  $\beta$  respectivement. Plus précisément, une titration avec DMSO a permis d'évaluer la formation de ponts hydrogène intramoléculaires, l'équilibre des isomères *cis* et *trans* du lien amide précédent la proline a été évalué dans différents solvants, et des études NOE ont permis de confirmer la présence d'un repliement. Cet article démontre une conservation de la conformation des peptides contenant proline ou notre dérivé pyrrolo-proline. Étant donnée l'importance des repliements dans les phénomènes de reconnaissance moléculaire<sup>4</sup>, pyrrolo-proline pourrait être utilisé pour remplacer proline dans des peptides biologiquement actifs dans le but d'augmenter l'activité tout en préservant la conformation.



## 1.10 Références

- (1) Mauger, A. B.; Witkop, B. *Chem. Rev.* **1966**, *66*, 47-86.
- (2) Schulz, G. E.; Schirmer, R. H. *Principles of Protein Structure*; Springer-Verlag: New York, 1979.
- (3) Schmidt, G. *Top. Curr. Chem.* **1986**, *136*, 109-166.
- (4) Giannis, A.; Kolter, T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244-1267.
- (5) Rose, G. D.; Gierash, L. M.; Smith, J. A. *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 1-109.
- (6) Némethy, G.; Printz, M. P. *Macromolecules* **1972**, *5*, 755-758.
- (7) Richardson, J. S. *Adv. Protein Chem.* **1981**, *34*, 167-339.
- (8) Venkatachalam, C. M. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425-1436.
- (9) Creighton, T. E. *Protein Folding*; W. H. Freeman and company: New York, 1992.
- (10) Brandts, J. F.; Halvorson, H. R.; M., B. *Biochemistry* **1975**, *14*, 4953-4963.
- (11) Fischer, G.; Bang, H.; Mech, C. *Biomed Biochim Acta* **1984**, *43*, 1101-1111.
- (12) Mauger, A. B. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 1205-1211.
- (13) Humphrey, J. M.; Bridges, R. J.; Hart, J. A.; Chamberlin, A. R. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2467-2472.
- (14) Chung, J. Y. L.; Wasicak, J. T.; Arnold, W. A.; May, C. S.; Nadzan, A. M.; Holladay, M. W. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 270-275.
- (15) Holladay, M. W.; Lin, C. W.; May, C. S.; Garvey, D. S.; Witte, D. G.; Miller, T. R.; Wolfram, C. A. W.; Nadzan, A. M. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 455-457.
- (16) Koskinen, A. M. P.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1859-1866.
- (17) Sharma, R.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 202-209.
- (18) Didierjean, C.; Del Duca, V.; Benedetti, E.; Aubry, A.; Zouikri, M.; Marraud, M.; Boussard, G. *J. Peptides Res.* **1997**, *50*, 451-457.
- (19) Zouikri, M.; Vicherat, A.; Aubry, A.; Marraud, M.; Broussard, G. *J. Peptides Res.* **1998**, *52*, 19-26.
- (20) Halab, L.; Lubell, W. D. *J. Peptide Sci.* **2001**, *7*, 92-104.
- (21) Halab, L.; Lubell, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2474-2484.

- (22) An, S. S. A.; Lester, C. C.; Peng, J.-L.; Li, Y.-., J.; Rothwarf, D. M.; Welker, E.; Thannhauser, T. W.; S., Z. L.; Tam, J. P.; Scheraga, H. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11558-11566.
- (23) Delaney, N. G.; Madison, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6635-6641.
- (24) Montelione, G. T.; Hughes, P.; Clardy, J.; Scheraga, H. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6765-6773.
- (25) Cavelier, F.; Vivet, B.; Martinez, J.; Aubry, A.; Didierjean, C.; Vicherat, A.; Marraud, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2917-2923.
- (26) Blankley, C. J.; Kaltenbronn, J. S.; DeJohn, D. E.; Werner, A.; Bennet, L. R.; Bobowski, G.; Krolls, B. U.; Johnson, D. R.; Pearlman, W. M.; Hoefle, M. L.; Essenburg, A. D.; Cohen, D. M.; Kaplan, H. R. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 992-998.
- (27) Pascard, C.; Guilhem, J.; Vincent, M.; Rémond, G.; Portevin, B.; Laubie, M. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 663-669.
- (28) Kim, D. H.; Guinosso, C. J.; Buzby, G. C. J.; Herbst, D. R.; McCaully, R. J.; Wicks, T. C.; Wendt, R. L. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 394-403.
- (29) Gruenfeld, N.; Stanton, J. L.; Yuan, A. M.; Ebetino, F. H.; Browne, L. J.; Gude, C.; Huebner, C. F. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 1277-1282.
- (30) Stanton, J. L.; Gruenfeld, N.; Babiarz, J. E.; Ackerman, M. H.; Friedmann, R. C.; Yuan, A. M.; Macchia, W. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 1267-1277.
- (31) Hanessian, S.; Reinhold, U.; Saulnier, M.; Claridge, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2123-2128.
- (32) Hanessian, S.; Papeo, G.; Angiolini, M.; Fettis, K.; Beretta, M.; Munro, A. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7204-7218.
- (33) Kyle, J. D.; Martin, J. A.; Burch, R. M.; Carter, J. P.; Lu, S.; Meeker, S.; Prosser, J. C.; Sullivan, J. P.; Togo, J.; Noronha-Blob, L.; Sinsko, J. A.; Walters, R. F.; Whaley, L. W.; Hiner, R. N. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2649-2653.
- (34) Kyle, D. J.; Martin, J. A.; Farmer, S. G.; Burch, R. M. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1230-1233.
- (35) Gibbs, A. C. G.; Bjorndahl, T. C.; Hodges, R. S.; Wishart, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1203-1213.

- (36) Felix, A. M.; Jimenez, M. H.; Vergona, R.; Cohen, M. R. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1973**, *5*, 201-206.
- (37) McGee, J. O. D.; Jimenez, M. H.; Felix, A. M.; Cardinale, G. J.; Udenfriend, S. *Arch. Biochem Biophys.* **1973**, *154*, 483-487.
- (38) Moore, S.; Felix, A. M.; Meienhofer, J. *J. Med Chem.* **1977**, *20*, 495-500.
- (39) Cignarella, G.; Cerri, R.; Grella, G.; Sanna, P. *Gazz. Chim. Ital.* **1976**, *106*, 65-75.
- (40) Couture, A.; Deniau, E.; Ionescu, D.; Grandclaudeon, P. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2319-2320.
- (41) Beeley, L. J.; Rockell, C. J. M. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 417-420.
- (42) Gaertzen, O.; Buchwald, S. L. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 465-475.
- (43) Bedingfield, J. S.; Demp, M. C.; Jane, D. E.; Tse, H.-W.; Roberts, P. J.; Watkins, J. C. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *116*, 3323-3329.
- (44) Molteni, V.; Penzotti, J.; Wilson, D. M.; Termin, A. P.; Mao, L.; Crane, C. M.; Hassman, F.; Wang, T.; Wong, H.; Miller, K. J.; Grossman, S.; Grootenhuis, P. D. *J. Med Chem.* **2004**, *47*, 2426-2429.
- (45) Austin, K. W. B.; Marshall, A. C.; Smith, H. *Nature* **1965**, *208*, 999-1000.
- (46) Long, A. A. W.; Nayler, J. H. C.; Smith, H.; Taylor, T.; Ward, N. *J. Chem. Soc. (C)* **1971**, 1920-1922.
- (47) McCormick, M. H.; Stark, W. M.; Pittenger, G. E.; Pittenger, R. C.; McGuire, J. M. *Antibiot. Annu.* **1955-1956**, 606.
- (48) Young, P.; Berge, J.; Chapman, H.; Cawthome, M. A., 168, 381. *Eur. J. Pharmacol.* **1989**, *168*, 381.
- (49) Fuchs, J. R.; Funk, R. L. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3923-3925.
- (50) Belliotti, T. R.; Brink, W. A.; Kesten, S. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1499-1502.
- (51) Gill, P.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2658-2659.
- (52) Rondeau, D.; Gill, P.; Chan, M.; Curry, K.; Lubell, W. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 771-773.
- (53) Paal, C. *Chem. Ber.* **1884**, *17*, 2756.
- (54) Knorr, L. *Chem. Ber.* **1884**, *17*, 2863.
- (55) Flintoft, R. J.; Buzby, J. C.; Tucker, J. A. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4485-4488.

- (56) Barton, D. H. R.; Motherwell, W. B.; Zard, S. Z. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3707-3710.
- (57) Nagafuji, P.; Cushman, M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4999-5003.
- (58) Lash, T. D.; Blade, K. A.; Johnson, M. C. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1135-1138.
- (59) Hippeli, C.; Simmer, R.; Ressig, H.-U. *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 469-474.
- (60) Nakanishi, S.; Otsuji, Y.; Itoh, K.; Hayashi, N. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63*, 3595-3600.
- (61) Marcotte, F.-A.; Lubell, W. D. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2601-2603.
- (62) Tsuji, J. *Synthesis* **1984**, 369-384.
- (63) Blanco, M.-J.; Paleo, M. R.; Penide, C.; Sardina, F. J. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8786-8793.

## **CHAPITRE 2**

### **Article 1 :**

Jeannotte, G.; Lubell, W. D. 'Synthesis of Fused Heteroaryl-Prolines and Pyrrolo-Pyrroles' *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4656-4662.

## Synthesis of Fused Heteroaryl-Prolines and Pyrrolo-Pyrroles

Guillaume Jeannotte and William D. Lubell\*

*Département de chimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale CentreVille,*

Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

### 2.1 Abstract

Fused Heteroaryl-prolines were prepared starting from 4-oxo-*N*-(PhF)proline benzyl ester (**6**, PhF = phenylfluorenyl) following two approaches. First, allylation of oxo-proline **6** followed by Wacker oxidation gave 1,4-dione **8** that was selectively converted to pyrrolo-proline **10b**, pyrrolo-pyrrole **12** and pyridazino-proline **9**. Second, aldol condensation of oxo-proline **6** with a series of *N*-(Boc)- $\alpha$ -amino aldehydes **15a-e** and acid catalyzed cyclisation gave pyrrolo-prolines **17a-e**, possessing a variety of pyrrole 5-position substituents. Conditions for the selective deprotection and alkylation of the pyrrole nitrogen of pyrrolo-prolines **17** were developed to expand the diversity of the heteroaryl systems. Finally, hydrogenolytic cleavage of the PhF and benzyl groups followed by subsequent protection with Boc, Fmoc and Moz groups was performed to obtain analogues suitable for peptide synthesis. The enantiomeric purity of *N*-(Boc)pyrrolo-proline **21a** was ascertained by coupling to L- and D-phenylalanine methyl ester and examination of the diastereotopic pyrrole protons, which demonstrated the dipeptides to be of >99% diastereomeric purity. These approaches have thus delivered the first series of enantiopure fused aryl-prolines for application as arylglycine-proline chimeras in structure activity studies of biologically active compounds.

## 2.2 Introduction

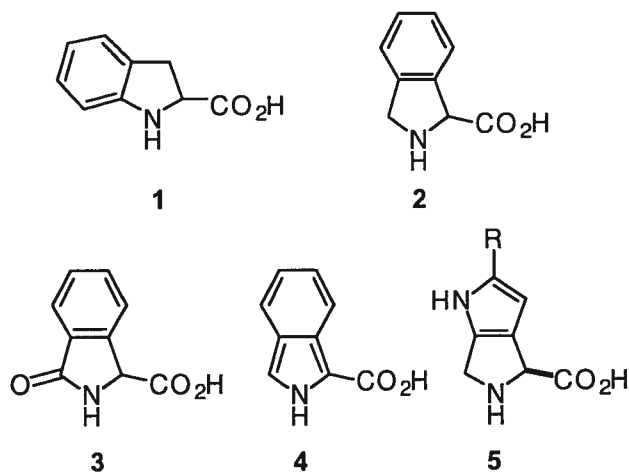


Figure 1. Representative Fused Aryl-Proline Analogs

Fused aryl-prolines, such as **1** and **2**, are challenging synthesis targets that have potential to serve respectively as phenylalanine-proline and phenylglycine-proline chimeras in structure-activity studies of biologically relevant compounds. For example, asymmetric synthesis<sup>1-3</sup>, enzymatic resolution and fractional recrystallization<sup>4</sup>, all have furnished enantiomerically enriched analogs of indoline-2-carboxylate **1**, which has been used to develop angiotensin converting enzyme inhibitors related to the drugs Captopril<sup>5,6</sup> and Enalapril<sup>7</sup>. Isoindoline-1-carboxylic acid **2** has been less well studied and there exists presently no methods for its synthesis in enantiomerically pure form. Methyl isoindoline-1-carboxylates have been isolated as hydrochlorides, yet reported to be "highly sensitive to air" and presumed to oxidize to the corresponding 1-carbomethoxy-phthalimidines **3** and isoindoles **4**<sup>8</sup>. In light of the importance of arylglycines in medicine, such as their presence in common  $\beta$ -lactam antibiotics like ampicillin<sup>9</sup> and amoxicillin<sup>10</sup>, enantiopure, conformationally rigid arylglycine analogs, like **2**, have desirable utility for studying and improving the pharmacological properties of contemporary drugs.

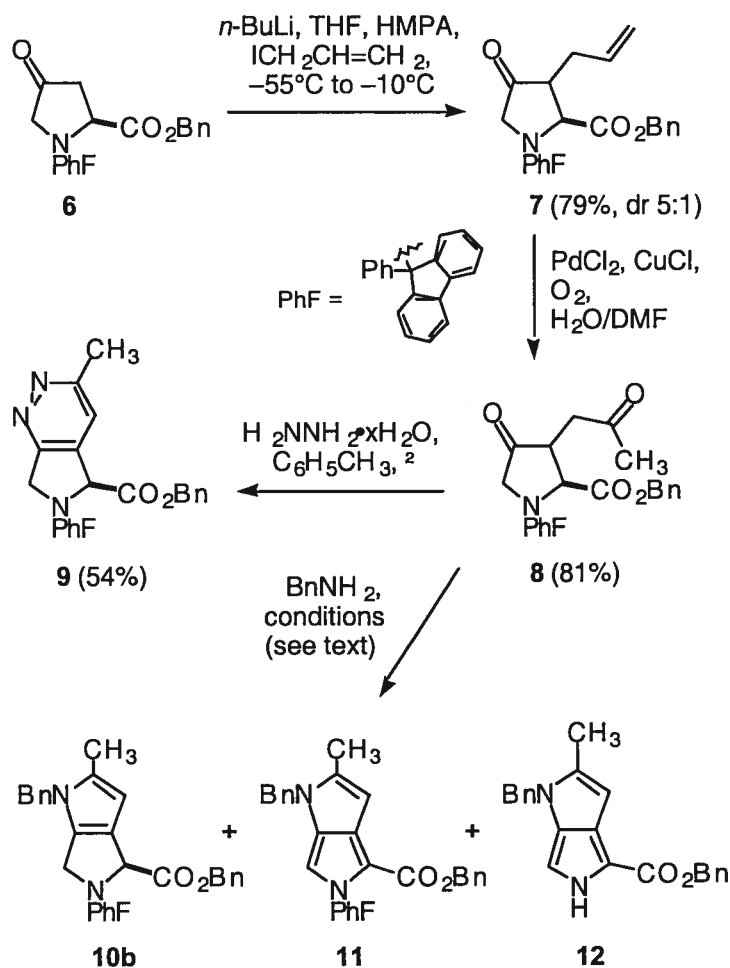
Prior to our studies, fused heteroaryl-prolines had yet to be reported. Pyrrol-prolines of general structure **5** were pursued as novel heteroarylglycine-proline chimeras that could be amenable for diversity oriented synthesis. In particular, *N*-alkylation was expected to allow synthesis of a variety of fused arylproline analogs from a common intermediate. The directionality of the pyrrole was expected to retard racemization and oxidation of the neighboring pyrrolidine ring. A methodology for making enantiopure pyrrol-prolines **6** has now been developed that allows modification of the steric and electronic properties of the aromatic component of the arylproline. Furthermore, conditions have been developed for alkylation of the pyrrole nitrogen. In addition to novel methodology for the synthesis of enantiopure pyrrol-prolines, protocols have been conceived for the preparation of pyridazino-proline and pyrrolo-pyrroles. A novel series of amino acid scaffolds has thus been synthesized for the study of biologically active compounds.

### 2.3 Results and Discussion

Past syntheses of dihydroisoindole-2-carboxylic acid **2** and its analogs have constructed the chiral  $\alpha$ -center by amine alkylation with an  $\alpha$ -halo acid equivalent<sup>8</sup>, by carbonylation of metalated phthalimidine<sup>11</sup> and isoindoline<sup>12</sup> intermediates and by intramolecular arylation of glycine precursors<sup>13</sup>. Such approaches have thus far failed to deliver enantiopure product due to the inherent difficulty of constructing this stereocenter stereoselectively. In contrast, we pursued a route to heteroaryl-prolines in which hydroxyproline was used as chiral educt to provide enantiopure product. This approach was based on our previous methodology for the enolization and alkylation of 4-oxo-*N*-(PhF)proline benzyl ester to make a variety of  $\Delta^3$ -dehydroproline analogs without loss of the configurational integrity at the  $\alpha$ -center.<sup>14,15</sup>



Scheme 1. Paal-Knorr Approach to Heteroaryl-Prolines



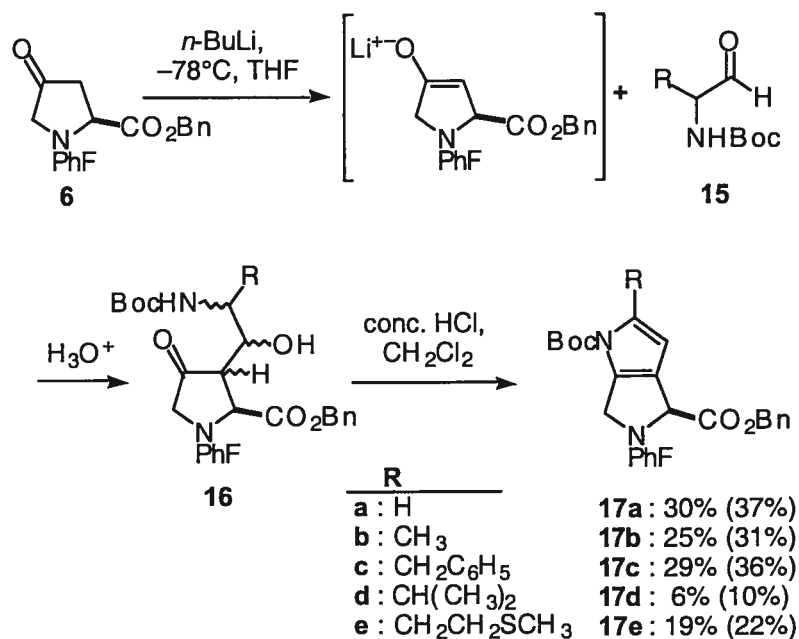
Alkylation of the enolate of **6** with  $\alpha$ -halo ketones was first pursued to construct a suitable 1,4-dione for pyrrolo-proline synthesis by condensation with amines according to the Paal-Knorr pyrrole synthesis<sup>16,17</sup>. Methyl bromo acetate had previously reacted with the potassium enolate of **6** to install the 3-position substituent for the synthesis of  $\Delta^3$ -dehydrokainic acid analogs<sup>14,18</sup>. In contrast, attempts to perform similar chemistry with  $\alpha$ -bromo ketones, such as  $\alpha$ -bromo acetophenone, gave only trace amounts of 1,4-diones, perhaps due to deprotonation of the electrophile. Desired 1,4-dione **8** was synthesized from ketone **6** in 64% overall yield by

alkylation with allyl iodide, followed by oxidation of the terminal olefin by a Wacker process using oxygen, PdCl<sub>2</sub> and CuCl in a mixture of DMF and water (Scheme 1)<sup>19</sup>.

Considering the Paal-Knorr pyrrole synthesis with 1,4-dione **8** and our recently reported synthesis of 4-aminopyrrole-2-carboxylates<sup>20</sup> from 4-oxo-*N*-(PhF)proline esters such as **6**, we realized that there was a competition at hand and sought to develop selective conditions to prepare either pyrrolo-proline **10b** or pyrrolo-pyrroles **12**. The later was expected to be a thermodynamic product because of its fully aromatic character. To the best of our knowledge, the 2,4-dihydropyrrolo[3,4-*b*]pyrrole ring system had been reported only once before<sup>21</sup>, and the parent heterocycle was predicted to be unstable according to theoretical calculations of its resonance energy<sup>22</sup>. *N-p*-Methoxyphenylsulfonyl-pyrrolo[3,4-*b*]pyrroles were synthesized by a retro-malonate addition reaction; however, attempts to deprotect the arylsulfonyl group lead to decomposition of the product<sup>21</sup>. Condensation of 1,4-dione **8** with benzylamine was explored in different solvents (EtOH, CH<sub>3</sub>CN, THF, toluene) with both *para*-toluenesulfonic and acetic acids and varying ratios of pyrrolo-proline **10b** and pyrrolo-pyrrole **12** were obtained along with PhF-protected pyrrolo-pyrrole **11**<sup>23</sup>, as measured by proton NMR spectroscopy and integration of the pyrrole proton signals at 5.31, 6.35 and 6.12 ppm, respectively. The formation of PhF-protected **11** was minimized by performing the condensation under inert atmosphere in degassed solvent. The thermodynamic pyrrolo[3,4-*b*]pyrroles **12** was obtained in a >14:1 ratio with pyrrolo-proline **10b** by reacting 1,4-dione **8** with 500 mol % of benzylamine in toluene at 50 °C for 24 h in the presence of 10 mol % of *para*-toluenesulfonic acid. After column chromatography, pure pyrrolo-pyrrole **12** was isolated in 60% yield as a yellow solid that turned brown when exposed to air and as a solution on in CDCl<sub>3</sub>. The presence of the electroattractive ester moiety on the ring of the

pyrrolo-pyrrole **12** may account for its enhanced stability. On the other hand, pyrrolo-proline **10b** was obtained in a >3:1 ratio with pyrrolo-pyrrole **12** by reacting 1,4-dione **8** with 500 mol% of benzylamine and 3000 mol% of acetic acid in EtOH at 60 °C for 1.5h. These mildly acidic conditions suppressed  $\alpha$ -deprotonation with elimination of the PhF aromatic anion which leads to 4-aminopyrrole-2-carboxylates related to **12**,<sup>20</sup> such that pyrrolo-proline **10b** was isolated in 23% yield after column chromatography.

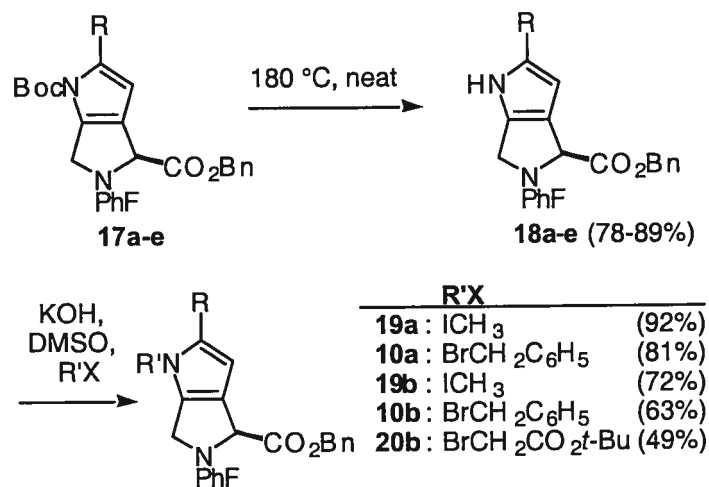
**Scheme 2.** Synthesis of Protected Pyrrolo-prolines **17**



A more generally successful method for preparing pyrrolo-prolines was developed that involved the aldol condensation of ketone **6** with *N*-(Boc)- $\alpha$ -amino aldehydes **15**, followed by acid induced cyclisation of the  $\beta$ -hydroxyketone intermediate to yield the pyrrole<sup>24</sup> (Scheme 2).  $\alpha$ -Substituted  $\alpha$ -amino aldehydes **15b-e** were synthesized in >80% yields from their

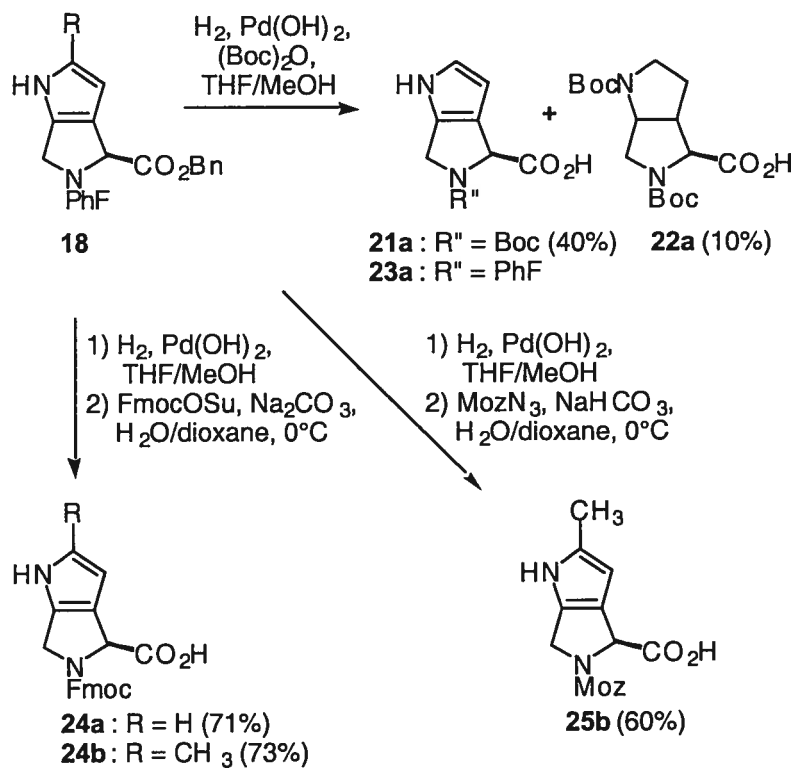
corresponding *N*-(Boc)amino acids by acylation of *N,O*-dimethylhydroxylamine using TBTU, followed by reduction of the hydroxamate with lithium aluminium hydride<sup>25</sup>. Glycinal **15a** was prepared in two steps and 65% overall yield from 3-amino-1,2-propanediol by protection with (Boc)<sub>2</sub>O followed by periodate oxidation of the crude protected diol<sup>26</sup>. Previously, aldol adducts had been obtained by enolization of *N*-PhF-4-oxoproline esters with *n*-BuLi in THF at -55 °C and condensations with ordinary aromatic and aliphatic aldehydes<sup>27</sup>. Enolization of 4-oxoproline **6** under these conditions followed by treatment with *N*-Boc- $\alpha$ -amino aldehydes **15** at -78 °C gave crude mixtures containing diastereomeric aldol products **16**, as detected by mass spectrometry, as well as starting 4-oxo-proline **6** which could be recovered by column chromatography and recycled. Treatment of crude  $\alpha$ -hydroxy ketone **16** with concentrated HCl in methylene chloride at room temperature afforded pyrroles **17a-e** in 10-37% overall yields accounting for recovered **7** (Scheme 2). Formation of the heterocycle was indicated by the presence of a characteristic pyrrole aromatic singlet at around 5.5 ppm in the proton NMR spectrum.

**Scheme 3.** Pyrrole Deprotection and Alkylation



With effective methodology for preparing pyrrolo-prolines **17** in hand, our next objectives were the selective removal of the Boc group and alkylation of the pyrrole nitrogen to demonstrate the potential of our strategy for diversity oriented synthesis (Scheme 3). Initially, pyrrolo-proline **17a** was treated with sodium methoxide in THF at room temperature and a 66% yield of deprotected product was isolated; however, *trans*-esterification occurred to give the pyrrolo-proline methyl ester<sup>28</sup>. Selective Boc group deprotection without *trans*-esterification was later accomplished by thermolysis at 180 °C for 30 minutes under a flow of argon<sup>29</sup>. All five pyrrolo-prolines **17a-e** were effectively converted to their *NH*-pyrrole counterparts **18a-e** by this method in 77-89% yields on a scale of 60 mg, and 60-65% yields on 400 mg scale. The diversity of the pyrrolo-proline analogues was expanded by *N*-alkylation of the pyrrole ring. Alkylation of the nitrogen of both pyrrole **18a** and its 5-methyl counterpart **18b** was effectively accomplished in dimethyl sulphoxide at room temperature by sequential treatments with powdered potassium hydroxide and an alkyl halide followed by stirring at room temperature, aqueous work-up and purification by chromatography<sup>30</sup>. *N*-Alkyl pyrrol-prolines **10a** and **10b**, **19a** and **19b**, and **20b** were prepared in 49-92 % yields by this method using methyl iodide, benzyl bromide and *tert*-butyl bromoacetate as electrophiles, respectively.

Scheme 4. Synthesis of Protected Pyrrolo-Prolines for Peptide Synthesis

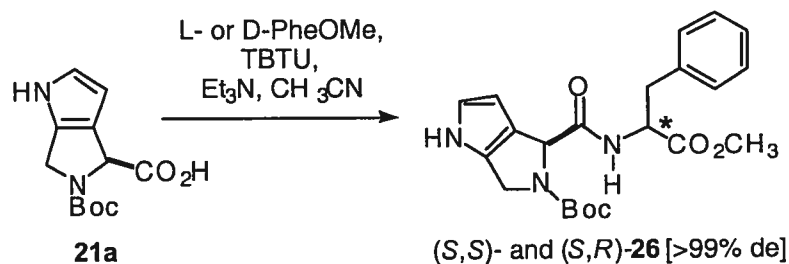


The next objective was to transform *N*-PhF-pyrrolo-proline benzyl ester **18** into analogs suitable for peptide synthesis. Previously, a one-pot hydrogenolytic cleavage of the PhF-amine and benzyl ester protecting groups in the presence of di-*tert*-butyldicarbonate was used to synthesize Boc-protected proline-valine and hydroxyproline-valine chimeras suitable for peptide synthesis<sup>18,31</sup>. When pyrrolo-proline **18a** was submitted to a similar hydrogenation protocol in the presence of  $(\text{Boc})_2\text{O}$  and palladium-on-carbon, in THF at 7 atm of hydrogen, starting material was predominantly recovered along with (4*S*)-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid **23a**<sup>32</sup> from loss of the benzyl ester. Changing to palladium hydroxyde as catalyst in a mixed MeOH / THF solvent system at 7 atm of hydrogen enhanced conversion; however, a considerable amount of *bis*-acylated reduced pyrrole **22a** was isolated as a mixture of

diastereomers that were characterized by mass spectrometry ( $m/z = 352.2$ ) and  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy<sup>33</sup>. To date, our best conditions for this one-pot conversion has featured hydrogenation of pyrrol-proline **18a** in the presence of di-*tert*-butyldicarbonate and palladium hydroxide in a MeOH:THF mixture at 1 atm of hydrogen for 24 h to furnish the desired *N*-(Boc)amino acid **21a** in 40% yield along with 10 % of the reduced pyrrole **22a** after purification by preparative liquid chromatography (Scheme 4).

Two alternative protecting groups, the Fmoc and *p*-methoxybenzyloxycarbonyl groups, were also installed on the proline nitrogen by a two step process featuring hydrogenation of pyrrol-proline **18** in the presence of palladium hydroxide at 1 atm of  $\text{H}_2$  in 1:1 MeOH:THF for 3 h, followed by amine acylation after filtration of the catalyst and solvent exchange. (4*S*)-5-(Fmoc)-1,4,5,6-Tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid **24a** and its 5-methyl analog **24b** were respectively prepared in 71 % and 73 % overall yields from **18a** and **18b** by suspension of the crude hydrogenation mixture in a dioxane / aqueous sodium carbonate solution, treatment with FmocOSuc in dioxane at 0 °C for 30 minutes, aqueous work and chromatography on silica gel. Similar hydrogenation of **18b** and treatment with Moz-azide in dioxane gave the Moz-protected pyrrol-proline **25b** in 60 % yield after work up and chromatography.

**Scheme 5. Enantiomeric Purity of Pyrrolo-Proline 21a**



Finally, the potential for pyrrolo-prolines **21a** to serve in amide bond synthesis was evaluated in experiments to determine enantiomeric purity. *N*-(Boc)-Pyrrolo-proline **21a** was coupled to both L- and D-phenylalanine methyl ester using *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU) and triethylamine in acetonitrile (Scheme 5). Measurement of the diastereotopic pyrrole proton signals at 6.69 ppm and 6.59 ppm during incremental additions of the (*S,R*)-isomer into the (*S,S*)-dipeptide established the limits of detection of any (*R,S*)-isomer from racemization of the pyrrolo-proline during synthesis and coupling. In this way, *N*-(Boc)-pyrrolo-prolyl-phenylalanine methyl ester (*S,S*)-**26** was demonstrated to be of >99% diastereomeric purity. Fused pyrrolo-proline **21a** is thus considered to be of similarly high enantiomeric purity.

## 2.4 Conclusion

The first examples of enantiomerically pure fused heteroaryl-prolines have been synthesized by two approaches starting from 4-oxo-*N*-(PhF)proline benzyl ester **6**. In the first method, allylation of **6** followed by Wacker oxidation gave 1,4-dione **8** which was condensed with hydrazine to afford pyridazino-proline **9**, and with benzylamine to provide pyrrolo-proline **10b** and pyrrolo-pyrrole **12**. The competition between the Paal-Knorr condensation and the formation of aminopyrrole carboxylate<sup>20</sup> was controlled such that it was possible to obtain predominantly pyrrolo-proline **10b** or pyrrolo-pyrrole **12** by regulating the concentration of acid and amine nucleophile. Pyrrolo-prolines **17a-e** were synthesized by a general process featuring the aldol condensation of oxo-proline **6** and *N*-(Boc)- $\alpha$ -amino aldehydes followed by acid catalyzed cyclisation. Selective modification of the pyrrole nitrogen of **17** was achieved by



thermolytic cleavage of the Boc-group and *N*-alkylation. Diversity oriented methodology was thus developed for synthesizing a variety of fused heteroaryl-prolines from a common intermediate. *N*-(PhF)-Pyrrolo-proline benzyl ester **18** was transformed into a series of analogs suitable for peptide synthesis, as demonstrated by the introduction of *N*-(Boc)pyrrolo-proline **21a** into a dipeptide of >99% diastereomeric purity. Pyrrolo-prolines are now being studied in model peptides to examine the influences of the aryl moiety and flattened pyrrolidine ring puckering on conformation and biological activity.

## 2.5 Experimental Section

**General.** All compounds were stored under argon at low temperature; pyrrole products turned brown and decomposed after prolonged exposure to air and light, as well as in CDCl<sub>3</sub> solution. Unless otherwise noted all reactions were run under an argon atmosphere and distilled solvents were transferred by syringe. Dry tetrahydrofuran (THF), dichloromethane, toluene and acetonitrile were taken from a Solvent Dispensing System (GlassContour™); Et<sub>3</sub>N and DIEA were double distilled from ninhydrin and CaH<sub>2</sub>. Final reaction mixture solutions were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Chromatography was on 230-400 mesh silica gel. TLC on aluminum-backed silica plates. Mass spectral data, HRMS (EI &FAB), were obtained by the Regional Center for Mass Spectrometry at the Université de Montréal. Chemical shifts for NMR data are given in ppm ( $\delta$  units) and coupling constants are given in hertz. The chemical shifts for proton and carbon signals of minor rotamers are respectively reported in brackets and parentheses. Aromatic carbon signals for PhF-containing compounds are not reported.

**(2S)-3-Allyl-4-oxo-N-(PhF)proline benzyl ester (7).** A solution of (2S)-4-oxo-N-(PhF)proline benzyl ester (**6**, 4 g, 8.7 mmol) in a 10:1 mixture of THF/HMPA (34 mL/3.4 mL) was treated dropwise with n-BuLi (3.76 mL, 2.5 M in hexanes, 9.14 mmol) at -55 °C, stirred for 1 h, treated with allyl iodide (2.4 mL, 26 mmol), stirred for 2 h during which time the temperature rose slowly to -10 °C. The reaction mixture was treated with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (10%, 6 mL) and poured into 150 mL of diethylether. The organic layer was washed with saturated sodium sulfite and brine, dried and concentrated to a residue that was chromatographed eluting with 10 % EtOAc in hexanes to furnish 3-allylproline **7** as a white foam that turned to dark yellow on standing, a 1:5 mixture of diastereomers (3.44 g, 79 %); spectral data for the isomer: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.08 (m, 1 H), 2.32 (m, 1 H), 2.46 (m, 1 H), 3.45 (d, 1 H, *J* = 18), 3.48 (s, 1 H), 3.85 (d, 1 H, *J* = 18), 4.35 (d, 1 H, *J* = 12.5), 4.53 (d, 1 H, *J* = 12.5), 4.92 (m, 2 H), 4.52 (m, 1 H), 7.1-7.7 (m, 18 H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 33.8, 52.4, 55.5, 63.1, 66.3, 75.7, 117.9, 172.7, 213.2.

**(2S)-4-Oxo-3-(2'-oxo-propyl)-1-(PhF)-proline benzyl ester (8).** In a 25 mL round bottom flask under a rubber balloon filled with oxygen, a mixture of palladium(II) chloride (14 mg, 0.08 mmol), copper(I) chloride (80 mg, 0.8 mmol), water (1 mL) and dimethylformamide (6 mL) was stirred for 1 h at room temperature during which time the solution turned to green. A solution of (2S)-3-allyl-4-oxo-N-(PhF)proline benzyl ester (**7**, 400 mg, 0.08 mmol, a 1:5 mixture of diastereomers) in DMF (3 mL) and water (0.3 mL) was added to the green solution and the mixture was stirred vigorously for 24 h under oxygen, poured into cold 1 N HCl (50 mL) and extracted three times with EtOAc (50 mL). The combined organic layer was washed with saturated sodium bicarbonate and brine, dried and concentrated to a residue that was chromatographed eluting with 10-25 % EtOAc in hexanes to give dione **8** (336 mg, 81 %) as a 1:5 mixture of diastereomers. First to elute was the minor isomer: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) δ

1.34 (s, 3 H), 1.64 (dd, 1 H,  $J = 7.8, 18.6$ ), 2.49 (dd, 1 H,  $J = 5.0, 18.6$ ), 3.30 (m, 1 H), 3.59 (d, 1H,  $J = 17.0$ ), 3.94 (d, 1 H,  $J = 17$ ), 4.17 (d, 1 H,  $J = 8.3$ ), 4.39 (d, 1 H,  $J = 12.3$ ), 4.50 (d, 1 H, 12.3), 6.9-7.4 (m, 18 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) 29.2, 38.6, 47.6, 54.3, 62.4, 66.1, 76.2, 171.6, 203.9, 211.8; HRMS calcd for  $\text{C}_{34}\text{H}_{30}\text{NO}_3$  ( $\text{MH}^+$ ) 515.2097, found 515.2077. Next to elute was the major isomer:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ )  $\delta$  1.26 (s, 3 H), 1.89 (dd, 1 H,  $J = 7.4, 18.4$ ), 2.16 (dd, 1 H,  $J = 3.8, 18.4$ ), 3.08 (m, 1 H), 3.46, (d, 1 H,  $J = 7.4$ ), 3.55 (d, 1 H,  $J = 17.8$ ), 3.81 (d, 1 H,  $J = 17.8$ ), 4.47 (d, 1 H,  $J = 12.4$ ), 4.70 (d, 1 H,  $J = 12.4$ ), 6.9-7.6 (m, 18 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) 28.9, 41.4, 48.9, 57.1, 65.1, 66.7, 77.2, 172.7, 203.6, 211.1;  $\delta$  HRMS calcd for  $\text{C}_{34}\text{H}_{30}\text{NO}_3$  ( $\text{MH}^+$ ) 515.2097, found 515.2085.

**(5*S*)-3-Methyl-6-(PhF)-6,7-dihydro-5H-pyrrolo[3,4-*c*]pyridazine-5-carboxylic acid benzyl ester (9).** Hydrazine hydrate (60  $\mu\text{L}$ , 1.9 mmol) was added to a solution of dione **8** (100 mg, 0.19 mmol) in toluene (5 mL) and the mixture was heated to a reflux for 12 h, cooled to room temperature, diluted with EtOAc (10 mL), washed with 2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and brine, dried and concentrated to a residue that was purified by chromatography eluting with 50 % EtOAc in hexanes to give pyridazine **9** (52 mg, 54 %):  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  2.53 (s, 3 H), 4.47, (s, 1 H), 4.60 (d, 1 H,  $J = 16.1$ ), 4.82 (d, 1 H,  $J = 16.1$ ), 4.88 (d, 1 H, 12.2), 4.96, (d, 1 H,  $J = 12.2$ ) 6.86 (s, 1 H), 7.2-7.8 (m, 18 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  22.3, 55.0, 66.4, 67.3, 77.7, 171.1; HRMS calcd for  $\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2$  ( $\text{MH}^+$ ) 510.2812, found 510.2175.

**(4*S*)-1-*N*-Benzyl-2-methyl-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (10b).** A stirred solution of dione **8** (50 mg, 0.097 mmol) in degassed anhydrous EtOH (2 ml) and acetic acid (150  $\mu\text{L}$ , 3 mmol) was treated with benzylamine (24  $\mu\text{L}$ , 0.2 mmol) in EtOH (1 mL), heated to 60  $^\circ\text{C}$  under argon atmosphere for 1.5 h, poured into water (5 mL) and extract three times with EtOAc (5 mL). The combined organic phase was

then washed with saturated  $\text{NaHCO}_3$  and brine, dried and evaporated to a residue that was chromatographed eluting with 5% EtOAc in hexanes. Evaporation of the collected fractions gave pyrrolo-proline **10b** (13 mg, 23 %):  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.99 (s, 3 H), 3.78 (d, 1 H,  $J = 11.6$ ), 4.33 (m, 2 H), 4.72 (d, 1 H,  $J = 16.9$ ), 4.83 (d, 1 H,  $J = 16.9$ ), 4.90 (d, 1 H,  $J = 12.5$ ), 5.98 (d, 1 H,  $J = 12.5$ ), 5.31 (s, 1 H), 6.7-7.6 (m, 23 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12.6, 48.7, 49.9, 64.1, 66.1, 78.2, 174.3; HRMS calcd for  $\text{C}_{41}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{MH}^+$ ) 587.2699, found 587.2685.

**1-Benzyl-2-methyl-1,5-dihydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (12).** A solution of dione **8** (50 mg, 0.097 mmol) in toluene (5 mL) was treated with benzylamine (44  $\mu\text{L}$ , 0.4 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (2 mg, 0.01 mmol), heated to 50  $^\circ\text{C}$  under argon atmosphere for 24 h, cooled and concentrated to a residue, that was dissolved in EtOAc (10 mL) and washed with 2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , saturated  $\text{NaHCO}_3$  and brine, dried and concentrated. The residue was chromatographed eluting with 10-30 % EtOAc in hexanes. Evaporation of the collected fractions gave pyrrolo-proline **12** (20 mg, 60 %):  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.30 (s, 3 H), 5.03 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.10 (s, 1 H), 6.35 (s, 1 H), 7.0-7.5 (m, 10 H), 9.3 (br s, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 13.3, 48.7, 65.4, 95.2, 105.3, 126.8, 127.6, 127.9, 128.6, 128.8, 134.4, 137.3, 137.7, 142.8; HRMS calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{MH}^+$ ) 345.1603, found 345.1557.

**Typical procedure for pyrrole preparation. (4*S*)-1-*N*-Boc-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (17a).** A stirred solution of (2*S*)-4-oxo-*N*-(PhF)proline benzyl ester (**6**, 3 g, 6.5 mmol) in 17 mL of THF was cooled to  $-78$   $^\circ\text{C}$  under argon atmosphere, treated with *n*-BuLi (2.75 mL, 2.5 M in hexanes, 6.9 mmol) and stirred for 1 h at  $-55$   $^\circ\text{C}$ . The mixture was cooled to  $-78$   $^\circ\text{C}$ , treated via cannula with a  $-78$   $^\circ\text{C}$  solution of *N*-(Boc)-glycinal (1.09 g, 6.9 mmol) in 5 mL of THF, stirred for 5 h at  $-55$   $^\circ\text{C}$  and

poured into an ice cold solution of 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mL). The aqueous solution was extracted with ether (3 x 50 mL) and the combined organic phases were washed with brine, dried and evaporated to a foam. The foam was chromatographed using 15 % EtOAc in hexanes as eluent to recover 0.62 g of starting oxo-proline **6** and a more polar fraction, that was isolated, dissolved in 50 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, treated with 0.4 mL of conc. HCl and stirred for 12 h. The resulting brown mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL), washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> (3 x 30 mL) and brine, dried and concentrated to a residue that was chromatographed eluting with 10 % EtOAc in hexanes. Evaporation of the collected fractions gave pyrrolo-proline **17a** as a white foam (1.11 g, 30 (37 %)) : [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>22</sup> 107.7° (*c* 1.01, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.47 (s, 9 H), 4.23 (m, 2 H), 4.61 (m, 1 H), 4.80 (d, 1 H, *J* = 12), 4.97 (d, 1 H, *J* = 12), 5.73 (d, 1 H, *J* = 3.1), 6.96 (s, 1 H), 7.0-7.7 (m, 18 H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  28.0, 51.9, 63.1, 66.4, 77.8, 84.0, 147.0, 173.4; HRMS calcd for C<sub>38</sub>H<sub>35</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (MH<sup>+</sup>) 583.2597, found 583.2608.

**(4S)-1-N-Boc-2-Methyl-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-b]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (17b)** was isolated as a white foam in 25 (31) % yield : [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>22</sup> 104.8° (*c* 0.94, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.44 (s, 9 H), 2.29 (s, 3 H), 4.20 (m, 2 H), 4.56 (dd, 1 H, *J* = 5.6, 15.3), 4.79 (d, 1 H, *J* = 12), 4.95 (d, 1 H, *J* = 12), 5.47 (s, 1 H), 7.0-7.9 (m, 18 H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  15.9, 27.8, 53.1, 63.0, 66.2, 77.6, 83.5, 147.1, 173.6; HRMS calcd for C<sub>39</sub>H<sub>37</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (MH<sup>+</sup>) 597.2753, found 597.2773.

**(4S)-1-N-Boc-2-Benzyl-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-b]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (17c)** was isolate as a white foam in 29 (36) % yield : [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>22</sup> 96.0° (*c* 1.03, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.35 (s, 9 H), 4.07 (s, 2 H), 4.22 (m, 2 H), 4.65 (dd, 1 H, *J* = 4.4, 14.9), 4.78 (d, 1 H, *J* = 12.2), 4.96 (d, 1 H, *J* = 12.2), 5.31 (s, 1 H), 7.0-7.7 (m,

23 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  27.9, 35.6, 53.2, 63.2, 66.3, 77.7, 83.9, 143.3, 173.5; HRMS calcd for  $\text{C}_{45}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_4$  ( $\text{MH}^+$ ) 673.3066, found 673.3090.

**(4S)-1-N-Boc-2-Isopropyl-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (17d)** was isolated as a white foam in 6 (10) % yield :  $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$  105.5° (*c* 0.94,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.08 (d, 3 H,  $J = 2.6$ ), 1.10 (d, 3 H,  $J = 2.6$ ), 1.42 (s, 9 H), 3.38 (m, 1 H), 4.18 (m, 2 H), 4.54 (dd, 1 H,  $J = 5.1, 14.9$ ), 4.78 (d, 1 H,  $J = 12.3$ ), 5.01 (d, 1 H,  $J = 12.3$ ), 5.50 (s, 1H), 7.0-7.7 (m, 18 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  22.9, 23.3, 27.4, 27.9, 53.5, 63.2, 66.2, 77.7, 83.6, 146.8, 173.6; HRMS calcd for  $\text{C}_{41}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_4$  ( $\text{MH}^+$ ) 625.3066, found 625.3083.

**(4S)-1-N-Boc-2-(2-Methylthioethyl)-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (17e)** was isolated as a white foam in 19 (22) % yield :  $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$  104.1° (*c* 0.94,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.44 (s, 9 H), 2.07 (s, 3 H), 2.63 (m, 2 H), 3.00 (t, 2 H,  $J = 7,3$ ), 4.19 (m 2 H), 4.57 (d, 1 H,  $J = 9.5$ ), 4.82 (d, 1 H,  $J = 11.9$ ), 5.00 (d, 1 H,  $J = 11.9$ ), 5.56 (s, 1 H), 7.0-7.7 (m, 18 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  15.7, 28.0, 29.8, 33.7, 53.3, 63.2, 66.4, 77.7, 83.9, 147.2, 173.5; HRMS calcd for  $\text{C}_{41}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$  ( $\text{MH}^+$ ) 657.2787, found 657.2774.

**Typical procedure for BOC deprotection. (4S)-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (18a).** A round bottom flask, containing (4S)-1-N-Boc-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (17a, 60 mg, 0.1 mmol) under an argon atmosphere was placed into a 180 °C oil bath for 35 min. The flask was removed from the oil bath and the resulting product was purified by chromatography using 20 % EtOAc in hexanes as eluent. Evaporation of the collected fractions gave **18a** (39 mg, 79 %):  $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$  61.8° (*c* 0.94,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.01 (d, 1

H,  $J = 12.7$ ), 4.33 (d, 1 H,  $J = 3.3$ ), 4.41 (dd, 1 H,  $J = 3.8, 12.7$ ), 4.82 (d, 1 H,  $J = 12.4$ ), 4.97 (d, 1 H,  $J = 12.4$ ), 5.73 (s, 1 H), 6.56 (s, 1 H), 6.5-7.7 (m, 18 H), 7.8 (s, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  50.0, 63.4, 66.2, 78.0, 174.3; HRMS calcd for  $\text{C}_{33}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{MH}^+$ ) 483.2073, found 483.2081.

**(4S)-2-Methyl-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (18b)** was prepared from Boc-pyrrolo-proline **17b** (61 mg, 0.10 mmol) and isolated in 77 % yield:  $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$  79.9° ( $c$  1.21, MeOH);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.12 (s, 3 H), 3.95 (d, 1 H,  $J = 12.4$ ), 4.34 (m, 2 H,  $J = 3.3$ ), 4.81 (d, 1 H,  $J = 12.4$ ), 4.95 (d, 1 H,  $J = 12.4$ ), 5.40 (s, 1 H), 7.0-7.7 (m, 19 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13.7, 50.2, 63.6, 66.2, 77.9, 174.5; HRMS calcd for  $\text{C}_{34}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{MH}^+$ ) 497.2229, found 497.2211.

**(4S)-2-Benzyl-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (18c)** was prepared from Boc-pyrrolo-proline **17c** (60 mg, 0.089 mmol) and isolated in 78 % yield:  $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$  80.3° ( $c$  0.77, MeOH);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.79 (s, 2 H), 3.91 (d, 1 H,  $J = 11.1$ ), 4.31 (m, 2 H), 4.81 (d, 1 H,  $J = 12.4$ ), 4.96 (d, 1 H,  $J = 12.4$ ), 5.48 (s, 1 H), 7.0-7.7 (m, 24 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  34.7, 50.1, 63.6, 66.1, 77.9, 174.3; HRMS calcd for  $\text{C}_{40}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{MH}^+$ ) 573.2542, found 573.2522.

**(4S)-2-Isopropyl-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (18d)** was prepared from Boc-pyrrolo-proline **17d** (60 mg, 0.091 mmol) and isolated in 79 % yield:  $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$  79.9° ( $c$  0.95, MeOH);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.12 (d, 6 H,  $J = 6.8$ ), 2.74 (m, 1 H), 3.98 (d, 1 H,  $J = 12.2$ ), 4.30 (d, 1 H,  $J = 4.2$ ), 4.35 (dd, 1 H,  $J = 4.2, 12.2$ ), 4.79 (d, 1 H,  $J = 12.5$ ), 4.97 (d, 1 H,  $J = 12.5$ ), 5.39 (s, 1 H), 7.0-7.7 (m, 19 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  22.7, 22.8, 27.7, 50.1, 63.6, 66.0, 77.8, 174.4; HRMS calcd for  $\text{C}_{36}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{MH}^+$ ) 525.2542, found 525.2559.

**(4*S*)-2-(2-Methylthioethyl)-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (18e)** was prepared from Boc-pyrrolo-proline **17e** (60 mg, 0.096) and isolated in 89 % yield:  $[\alpha]_D^{22}$  81.2° (*c* 1.17, MeOH);  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.01 (s, 3 H), 2.59 (t, 2 H,  $J = 6.7$ ), 2.72 (t, 2 H,  $J = 6.6$ ), 3.94 (d, 1 H,  $J = 11.1$ ), 4.31 (m, 2 H), 4.80 (d, 1 H,  $J = 12.4$ ), 4.95 (d, 1 H,  $J = 12.4$ ), 5.44 (s, 1 H), 7.0-7.7 (m, 18 H), 8.00 (s, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  15.7, 28.2, 34.6, 50.1, 63.5, 66.2, 77.9, 174.4; HRMS calcd for  $\text{C}_{36}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$  ( $\text{MH}^+$ ) 557.2263, found 557.2270.

**Typical procedure for *N*-alkylation of the pyrrole. (4*S*)-1-*N*-Methyl-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (19a).** At room temperature, a solution of KOH (9.3 mg, 0.17 mmol) in DMSO (500  $\mu\text{L}$ ) was treated with (4*S*)-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (**18a**, 40 mg, 0.08 mmol), stirred 20 min, treated with iodomethane (20  $\mu\text{L}$ , 0.32 mmol) and stirred for 2 h. Water (4 mL) was added to the mixture, which was extracted with 3 portions of EtOAc (10 mL). The combined organic phase was washed with water and brine, dried and concentrated to a residue that was chromatographed eluting with 10 % EtOAc in hexanes to give *N*-methylpyrrole **19a** (38 g, 92 %):  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.40 (s, 3 H), 4.03 (d, 1 H,  $J = 12.4$ ), 4.30 (d, 1 H,  $J = 2.4$ ), 4.42 (dd, 1 H,  $J = 2.4, 12.4$ ), 4.78 (d, 1 H,  $J = 12.4$ ), 4.96 (d, 1 H,  $J = 12.4$ ), 5.61 (d, 1 H,  $J = 2.1$ ), 6.37 (s, 1 H), 7.0-7.7 (m, 18 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  34.8, 49.2, 63.6, 66.2, 77.8, 174.2; HRMS calcd for  $\text{C}_{34}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{MH}^+$ ) 497.2229, found 497.2222.

**(4*S*)-1-*N*-Methyl-2-methyl-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (19b)** was isolated from the reaction of pyrrolo-proline **18b** (50 mg, 0.1 mmol) and iodomethane (25  $\mu\text{L}$ , 0.4 mmol) in 72 % yield:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.07 (s, 3 H), 3.26 (s, 3H), 4.03 (d, 1 H,  $J = 12.1$ ), 4.29 (dd, 1 H,  $J = 1.5, 4.2$ ), 4.42 (dd, 1 H,  $J =$



4.2, 12.1 ), 4.77 (d, 1 H,  $J = 12.5$ ), 4.94 (d, 1 H,  $J = 12.5$ ), 5.39 (s, 1 H), 7.0-7.7 (m, 18 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12.6, 31.9, 49.7, 63.8, 66.2, 77.3, 174.4; HRMS calcd for  $\text{C}_{35}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{MH}^+$ ) 511.2386, found 511.2371.

**(4S)-1-N-Benzyl-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (10a)** was isolated from the reaction of pyrrolo-proline **18a** (40 mg, 0.082 mmol) and benzylbromide (20  $\mu\text{L}$ , 0.164 mmol) in 81 % yield:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.76 (m, 1 H), 4.32 (m, 2 H), 4.81-4.90 (m, 3 H), 4.98 (d, 1 H,  $J = 12.4$ ), 5.71 (d, 1 H,  $J = 2.7$ ), 6.45 (d, 1 H,  $J = 2.7$ ), 6.8-7.6 (m, 23 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  49.4, 51.9, 63.7, 66.2, 78.1, 174.0; HRMS calcd for  $\text{C}_{40}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{MH}^+$ ) 573.2542, found 573.2541.

**(4S)-1-N-Benzyl-2-methyl-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (10b)** was isolated from the reaction of pyrrolo-proline **18b** (50 mg, 0.1 mmol) and benzylbromide (24  $\mu\text{L}$ , 0.2 mmol) in 63 % yield, and possessed the same spectral and physical properties as describe above.

**(4S)-1-N-(*tert*-Butyl-acetate)-2-methyl-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (20b)** was isolated from the reaction of pyrrolo-proline **18b** (40 mg, 0.08 mmol) and *tert*-butylbromoacetate (35.4  $\mu\text{L}$ , 0.24 mmol) in 49 % yield:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.40 (s, 9 H), 2.05 (s, 3 H), 4.04 (d, 1 H,  $J = 12.3$ ), 4.15 (d, 1 H,  $J = 17.3$ ), 4.23 (m, 2 H), 4.41 (dd, 1 H,  $J = 4.4, 12.4$ ), 4.82 (d, 1 H,  $J = 12.5$ ), 4.93 (d, 1 H,  $J = 12.5$ ), 5.46 (s, 1 H), 7.0-7.7 (m, 18 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12.5, 28.1, 47.9, 49.9, 63.8, 66.1, 77.9, 82.5, 167.5, 174.2; HRMS calcd for  $\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_4$  ( $\text{MH}^+$ ) 611.2910, found 611.2909.

**(4S)-5-(Boc)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid (21a).** A solution of (4S)-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (**18a**, 210 mg, 0.43 mmol) and di-*tert*-butyl dicarbonate (122 mg, 0.56 mmol) in 1:3 THF/MeOH

(5 mL/15 mL) was treated with palladium-hydroxide-on-carbon (60 mg, 20 wt % in palladium (wet)) and stirred under 1 atm of hydrogen for 24 h. The catalyst was removed by filtration on Celite® and washed with MeOH. The filtrate was evaporated to dryness and the residue was partitioned between saturated NaHCO<sub>3</sub> (10 mL) and Et<sub>2</sub>O (15 mL). The aqueous phase was washed with Et<sub>2</sub>O (2 x 15 mL), acidified to pH 2 with cold 1N HCl and extracted with CHCl<sub>3</sub> (4 x 15 mL). The combined organic extractions were washed with brine, dried and concentrated to a residue, that was purified by HPLC (20-80 % CH<sub>3</sub>CN in water, 0.01 % TFA, C<sub>18</sub> column) to provide pyrrolo-proline **21a** (44 mg, 40 %): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) showed a 2:1 mixture of carbamate isomers δ 1.44 (s, 6 H) [1.48 (s, 3 H)], 4.50 (m, 2 H), 5.22 (d, 0.66 H, *J* = 2.9) [5.31 (d, 0.33, *J* = 2.4)], 6.03 (s, 0.66 H) [6.10 (s, 0.33 H)], 6.69 (s, 1 H), 8.69 (s, 0.66 H) [8.49 (s, 0.33 H)], 10.8 (br s, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 28.4 (28.5), 46.5 (47.1), 61.1 (60.9), 81.2 (77.4), 102.4 (102.9), 119.3, 122.0, 130.4, 154.3 (155.2), 177.0, 175.4; HRMS calcd for C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M) 252.1110, found 252.1112.

**Typical procedure for Fmoc protection of Pyrrolo-proline. (4*S*)-5-(Fmoc)-1,4,5,6-Tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid (24a).** A solution of (4*S*)-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (**18a**, 68 mg, 0.14 mmol) in 1:1 THF/MeOH (8 mL) was treated with palladium-hydroxide-on-carbon (34 mg, 20 wt % in palladium (wet)) and stirred under 1 atm of hydrogen for 3 h. The catalyst was removed by filtration onto Celite® and washed with MeOH. The filtrate was concentrated to a residue that was suspended in water (3 mL) containing 9 % aqueous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (165 μL, 0.14 mmol), cooled to 0 °C and treated with FmocOSuc (53 mg, 0.15 mmol) in dioxane (3 mL) with vigorous stirring for 30 min. The reaction mixture was concentrated and partitioned between saturated NaHCO<sub>3</sub> (5 mL) and Et<sub>2</sub>O (5 mL). The aqueous phase was washed with Et<sub>2</sub>O (2 x 5 mL), acidified to pH 2

with cold 1N HCl and extracted with CHCl<sub>3</sub> (4 x 8 mL). The combined organic extractions were washed with brine, dried and concentrated to a residue that was chromatographed eluting with 50-100 % EtOAc in hexanes containing 1 % AcOH to give Fmoc-pyrrolo-proline **24a** (37 mg, 71 %): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) showed a 1:1 mixture of carbamate isomers δ 4.13 (t, 0.5 H, *J* = 6.1) [1.48 (t, 0.5 H, *J* = 6.6)], 4.41-4.63 (m, 4 H), 5.21 (d, 0.5 H, *J* = 2.2) [5.39 (d, 0.5, *J* = 2.0)], 6.07 (s, 0.5 H) [6.15 (s, 0.5 H)], 6.68 (s, 1 H) [6.72 (s, 0.5 H)], 7.2-7.8 (m, 8 H), 8.15 (br s, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 46.9 (47.1), 47.2 (47.3), 61.0 (61.1), 67.8, 102.7 (103.0), 119.4 (119.3), 120.0 (120.1), 122.1 (122.2), 125.0 (124.9), 125.1 (125.3), 127.2 (127.1), 127.8 (127.9), 130.0, 141.4 (141.3), 143.4 (143.8), 143.97 (143.99), 154.8 (155.2), 175.4 (176.1); HRMS calcd for C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (MH<sup>+</sup>) 375.1267, found 375.1312.

**(4*S*)-5-(Fmoc)-2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid (24b)** was isolated from reaction of **(4*S*)-2-methyl-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester 18b** (170 mg, 0.34 mmol) in 73 % yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) showed a 1:1 mixture of carbamate isomers δ 2.17 (s, 1.5 H) [2.21 (s, 1.5 H)], 4.12 (t, 0.5 H, *J* = 6.0) [4.26 (t, 0.5 H, *J* = 6.9)], 4.32-4.66 (m, 4 H), 5.20 (d, 0.5 H, *J* = 2.4) [5.32 (d, 0.5 H, *J* = 2.9)], 5.73 (s, 0.5 H) [5.79 (s, 0.5 H)], 7.2-7.8 (m, 8 H), 7.89 (s, 0.5 H) [7.94 (s, 0.5 H)]; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.57 (13.63), 47.03 (47.1), 47.2 (47.28), 60.9 (61.2), 67.78 (67.87), 100.3 (100.6), 119.3, 1210.1 (120.0), 125.0 (125.1), 125.2 (125.3), 127.2 (127.8), 127.9 (128.4), 132.5 (132.6), 141.4 (141.3) 143.8 (143.9), 144.0, 154.8 (155.2), 175.4 (176.1); HRMS calcd for C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (MH<sup>+</sup>) 388.1423, found 388.1492.

**(4*S*)-5-(Methoxybenzyloxycarbonyl)-2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid (25b)**. A solution of **(4*S*)-2-methyl-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-**

pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (**18b**, 100 mg, 0.2 mmol) in 1:1 THF/MeOH (6 mL) was treated with palladium-hydroxide-on-carbon (50 mg, 20 wt % in palladium (wet)), stirred under 1 atm of hydrogen for 3 h, filtered onto Celite® and washed with MeOH. The filtrate was concentrated to a residue, that was suspended in water (4 mL), treated with NaHCO<sub>3</sub> (51 mg, 0.6 mmol), cooled to 0 °C, treated with 4-methoxybenzyloxycarbonyl azide (83 mg, 0.4 mmol) in dioxane (4 mL), stirred for 12 h and concentrated to a residue that was partitioned between saturated NaHCO<sub>3</sub> (5 mL) and Et<sub>2</sub>O (5 mL). The aqueous phase was washed with Et<sub>2</sub>O (2 x 5 mL), acidified to pH 2 with cold 1N HCl and extracted with CHCl<sub>3</sub> (4 x 8 mL). The combined organic extractions were washed with brine, dried and concentrated. Chromatography eluting with 50-100 % EtOAc in hexanes containing 1 % AcOH gave Moz-pyrrolo-proline **25b** (40 mg, 60 %): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD) showed a 1:1 mixture of carbamate isomers δ 2.19 (s, 3), 4.43 (d, 1 H, *J* = 12.3), 4.52 (d, 1 H, *J* = 12.3), 5.00-5.15 (m, 3 H), 5.63 (s, 0.5 H) [5.66 (s, 0.5)], 6.87 (m, 2 H), 7.26 (d, 1 H, *J* = 8.3) [7.30 (d, 1 H, *J* = 8.4)], 10.1 (s, 0.5 H) [10.14 (s, 0.5 H)]; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD) δ 13.5, 48.0 (48.2), 55.8, 62.67 (62.75), 68.36 (68.39), 100.2, 114.9 (115.0), 120.0 (120.4), 129.4 (130.0), 129.92 (129.87), 130.7 (130.9), 133.63 (133.59), 156.7 (156.9), 161.2 (161.3), 175.0 (175.3); HRMS calcd for C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (MH<sup>+</sup>) 331.1294, found 331.1281.

**Enantiomeric Purity of (4*S*)-5-(Boc)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid (21a).** At room temperature a solution of (4*S*)-5-(Boc)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid (**21a**, 5 mg, 0.02 mmol) and the HCl salt of either L or D-phenylalanine methyl ester (4.3 mg, 0.02 mmol) in 0.5 mL of acetonitrile was treated with *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate (7 mg, 0.02 mmol) and Et<sub>3</sub>N (5.5 μL, 0.04 mmol). After stirring for 12 h, the mixture was partitioned between brine (0.7 mL)

and EtOAc (3 mL). The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O (2 x 3 mL) and brine, dried and concentrated to a residue that was directly examined by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. Measurement of the diastereotopic pyrrole proton signals at 6.69 ppm and 6.59 ppm during incremental additions of (*S,R*)-**26** in a sample of (*S,S*)-**26** demonstrated *N*-(Boc)-pyrrolo-prolyl-phenylalanine methyl ester (*S,S*)-**26** to be of >99% diastereomeric purity. Hence, fused pyrrol-proline **21a** is considered to be of the same high enantiomeric purity.

**(*S,S*)-*N*-(Boc)-Pyrrolo-prolyl-phenylalanine methyl ester ((*S,S*)-**26**).** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD) showed a 1:2 mixture of carbamate isomers δ 1.33 (s, 6) [1.49 (s, 3 H)], 3.04 (m, 2 H), 3.64 (s, 2 H) [6.62 (s, 1 H)], 4.43-4.50 (m, 2 H), 4.67 (m, 1 H), 5.11 (d, 0.66 H, *J* = 2.3) [5.14 (d, 0.33 H, *J* = 2.0)], 5.95 (s, 0.66 H) [5.98 (s, 0.33 H)], 6.69 (s, 0.66 H) [6.71 (s, 0.33 H)], 7.0-7.2 (m, 5 H), 8.22 (d, 0.66 H, *J* = 7.9) [8.08 (d, 0.33 H, *J* = 7.5)], 10.4 (s, 1 H); MS *m/e* 414.2 [MH<sup>+</sup>].

**(*S,R*)-*N*-(Boc)-Pyrrolo-prolyl-phenylalanine methyl ester ((*S,R*)-**26**).** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD) showed a 1:2 mixture of carbamate isomers δ 1.42 (s, 6) [1.48 (s, 3 H)], 2.99 (m, 1 H), 3.15 (m, 1 H), 4.37 (m, 1 H), 4.52 (m, 1 H), 4.65 (m, 1 H), 5.14 (d, 1 H, *J* = 3.0), 5.57 (s, 0.66 H) [5.75 (s, 0.33 H)], 6.59 (s, 0.66 H) [6.63 (s, 0.33 H)], 7.1-7.3 (m, 5 H), 8.63 (d, 0.66 H, *J* = 7.8) [8.36 (d, 0.33 H, *J* = 7.7)], 10.3 (s, 1 H); MS *m/e* 414.2 [MH<sup>+</sup>].

**Acknowledgment.** This research was supported in part by the Merck Frosst Center for Therapeutic Research, Canada, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT). We thank Mr. Dalbir Sekhon for performing LC-MS experiments.

**Supporting Information Available:** General experimental information, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra for compounds **7-12**, **17a-e**, **18a-e**, **19a-b**, **20b**, **21a**, **23a**, **24a-b** and **25b**, and <sup>1</sup>H NMR

spectra for **22a** and **26** along with the limits of detection experiment for enantiomeric purity of **21a**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## 4.6 References

- (1) Wagaw, S.; Rennels, R. A.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8451-8458.
- (2) Kuwano, R.; Sato, K.; Kurokawa, T.; Karube, D.; Ito, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7614-7615.
- (3) Viswanathan, R.; Prabhakaran, E. N.; Plotkin, M. A.; Johnston, J. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 163-168.
- (4) Ramos Tombo, G. M.; Schär, H.-P.; Ghisalba, O. *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 1833-1838.
- (5) Kim, D. H.; Guinosso, C. J.; Buzby, G. C. J.; Herbst, D. R.; McCaully, R. J.; Wicks, T. C.; Wendt, R. L. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 394-403.
- (6) Stanton, J. L.; Gruenfeld, N.; Babiarz, J. E.; Ackerman, M. H.; Friedmann, R. C.; Yuan, A. M.; Macchia, W. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 1267-1277.
- (7) Gruenfeld, N.; Stanton, J. L.; Yuan, A. M.; Ebetino, F. H.; Browne, L. J.; Gude, C.; Huebner, C. F. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 1277-1282.
- (8) Cignarella, G.; Cerri, R.; Grella, G.; Sanna, P. *Gazz. Chim. Ital.* **1976**, *106*, 65-75.
- (9) Austin, K. W. B.; Marshall, A. C.; Smith, H. *Nature* **1965**, *208*, 999-1000.
- (10) Long, A. A. W.; Naylor, J. H. C.; Smith, H.; Taylor, T.; Ward, N. *J. Chem. Soc. I* **1971**, 1920-1922.
- (11) Couture, A.; Deniau, E.; Ionescu, D.; Grandclaudon, P. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2319-2320.
- (12) Beeley, L. J.; Rockell, C. J. M. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 417-420.
- (13) Gaertzen, O.; Buchwald, S. L. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 465-475.
- (14) Gill, P.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2658-2659.

- (15) Rondeau, D.; Gill, P.; Chan, M.; Curry, K.; Lubell, W. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 771-773.
- (16) Paal, C. *Chem. Ber.* **1884**, *17*, 2756.
- (17) Knorr, L. *Chem. Ber.* **1884**, *17*, 2863.
- (18) Sharma, R.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 202-209.
- (19) Tsuji, J. *Synthesis* **1984**, 369-384.
- (20) Marcotte, F.-A.; Lubell, W. D. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2601-2603.
- (21) Sha, C.-K.; Liu, J.-M.; Chiang, R.-K.; Wang, S.-U. *Heterocycles* **1990**, *31*, 603-609.
- (22) Gutman, I.; Milun, M.; Trinajstić, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1692-1704.
- (23) 1-Benzyl-2-methyl-5-(PhF)-1,5-dihydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid benzyl ester (**11**):  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2.25 (s, 3 H), 4.89 (s, 2 H), 5.12 (s, 2 H), 6.12 (s, 1 H), 7.0-7.7 (m, 23 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 13.5, 49.1, 65.4, 78.1, 160.6; HRMS calcd for  $\text{C}_{41}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{MH}^+$ ) 584.2464, found 584.2487.
- (24) Nagafuji, P.; Cushman, M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4999-5003.
- (25) Fehrentz, J.-A.; Castro, B. *Synthesis* **1983**, 676-678.
- (26) Dueholm, K. L.; Egholm, M.; Buchardt, O. *Org. Prep. Proc. Int.* **1993**, *25*, 457-461.
- (27) Blanco, M.-J.; Paleo, M. R.; Penide, C.; Sardina, F. J. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8786-8793.
- (28) (4*S*)-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid methyl ester  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 3.43 (s, 3 H), 3.99 (d, 2H,  $J = 12.4$ ), 4.27 (d, 1 H,  $J = 2.4$ ), 4.35 (dd, 1 H,  $J = 12.4, 2.4$ ), 5.75 (s, 1 H), 6.54 (s, 1 H), 7.11-7.71 (m, 13 H), 7.89 (s, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 49.8, 51.8, 63.2, 77.8, 174.9; HRMS calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{M}^+$ ) 406.1681, found 406.1652.
- (29) Rawal, V. H.; Cava, M. P. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 6141-6142.
- (30) Heaney, H.; Ley, S. V. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1973**, 499-500.
- (31) Beausoleil, E.; Sharma, R.; Michnick, S. W.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6572-6578.
- (32) (4*S*)-5-(PhF)-1,4,5,6-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid (**23a**):  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD) 4.14 (m, 2 H), 4.54 (dd, 1 H,  $J = 13.4, 3.9$ ), 5.69 (d, 1 H,  $J = 2.6$ ), 6.58

(d, 1 H,  $J = 2.6$ ), 7.1-7.8 (m, 13 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD) 50.7, 65.1, 78.7, 176.3; HRMS calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{MH}^+$ ) 393.1603, found 393.1589.

(33) (4*S*)-1,5-*bis*-(Boc)-octahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrrole-4-carboxylic acid (**22a**):  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD) 1.46 (m, 18 H), 1.95 (m, 2 H), 3.26 (m, 2 H), 3.40 (m, 1 H), 3.42 (m, 1 H), 3.93 (m, 1 H), 4.31 (q, 1 H,  $J = 7.3$ ), 4.44 (d, 1 H,  $J = 8.8$ ); HRMS calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_6$  ( $\text{MH}^+$ ) 357.2026, found 357.1992.



**CHAPITRE 3****Article 2 :**

Jeannotte, G.; Lubell, W. D. 'Large Structural Modification with Conserved Conformation; Analysis of  $\Delta^3$ -Fused Aryl Prolines in Model  $\beta$ -Turns' Accepté dans *J. Am. Chem. Soc.* **2004**.

**Large Structural Modification with Conserved Conformation;  
Analysis of  $\Delta^3$ -Fused Aryl Prolines in Model  $\beta$ -Turns**

Guillaume Jeannotte and William D. Lubell\*

*Département de chimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale CentreVille,*

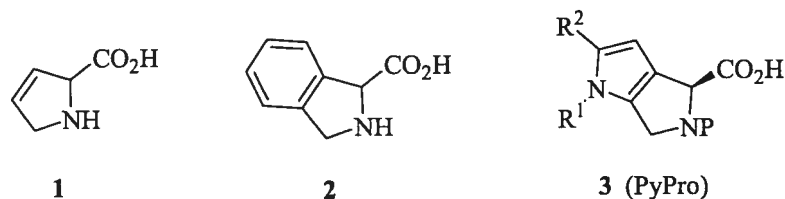
*Montréal, Québec, Canada H3C 3J7*

### **3.1 Abstract**

For the first time, the influence of a fused  $\Delta^3$ -arylproline on peptide conformation has been studied by the synthesis and comparison of the conformations of peptides containing proline and pyrrolo-proline **3** (PyPro). Pyrrolo-proline was demonstrated to be a conservative replacement for Pro in model  $\beta$ -turns **4** and **5** as shown by their similar DMSO titration curves, *cis:trans*-isomer populations and NOESY spectral data. Pyrrolo-proline may thus be used for studying structure activity relationships of Pro containing peptides with minimal modification of secondary structure.

## 3.2 Introduction

Proline serves as a turn inducer in natural peptides and proteins because of the pyrrolidine ring which restricts motion about the  $\phi$ -dihedral angle and reduces the energy difference between the prolyl amide *cis*- and *trans*-isomers.<sup>1a</sup> Steric and stereoelectronic effects of alkyl- and heteroatom-substituted prolines have thus been used to induce specific conformations for studying factors that effect prolyl peptide activity and biology.<sup>1</sup> In contrast,  $\Delta^3$ -dehydroproline **1** acts as a conservative proline replacement in peptides and proteins. For example, little conformational change was observed after replacement of Pro by **1** in a 14-residue cyclic analog of gramicidin S that exhibited a similarly stable  $\beta$ -sheet structure with two type II'  $\beta$ -turns as shown by spectroscopic and computational analysis.<sup>2</sup> Moreover, replacement of Pro by **1** has provided peptide and protein analogs with similar and improved biological activity.<sup>3</sup>



**Figure 1.** Representative Unsaturated, Aryl and Heteroaryl Prolines

$\Delta^3$ -Fused arylprolines, such as **2**, have yet to be examined in peptides primarily because of the difficulties in their synthesis.<sup>4</sup> Like **1**,  $\Delta^3$ -fused arylprolines may serve as conservative proline surrogates; moreover, structural modifications may be added without influencing conformation. Recently, we introduced effective methodology for synthesizing enantiopure  $\Delta^3$ -fused pyrrol-prolines (PyPro) of general structure **3** ( $R^1, R^2 = H, \text{alkyl}, P = \text{protection}$ ).<sup>4</sup> To

examine the influence of the aryl moiety and flattened pyrrolidine ring puckering on conformation, Fmoc-PyPro **3** ( $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $P = \text{Fmoc}$ ) has now been introduced into peptides **4b** and **5b** for comparison with Pro in model  $\beta$ -turns **4a** and **5a** (Table 1). Peptides **4a** and **4b** were selected to examine if PyPro would accommodate itself at the  $i+1$  position of a  $\beta$ -hairpin, because study of the enantiomeric sequence of **4a** had shown that the D-Pro-Gly residue adopted the central position of a  $\beta$ -hairpin.<sup>5</sup> Peptides **5a** and **5b**, analogues of the  $\beta$ -turn portion of gramicidin S, were synthesized to examine PyPro at the  $i+2$  position, because spectroscopic analysis revealed a significant  $\beta$ -turn population in a peptide related to **5a**.<sup>6</sup> Sequences **4** and **5** possessing Pro and PyPro were synthesized in solution and examined by NMR spectroscopy to assess the influence of the pyrrole moiety on the hydrogen bonding network, the prolyl amide equilibrium and turn conformation.

### 3.3 Results and Discussion

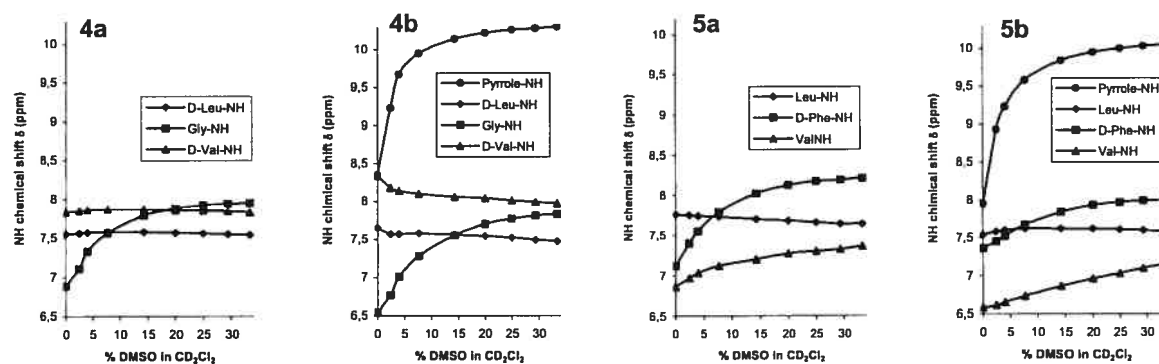
Peptides possessing Pro (**4a** and **5a**) and PyPro (**4b** and **5b**) were synthesized in solution respectively using  $N^\alpha$ -Boc and  $N^\alpha$ -Fmoc strategies as described in the Supporting Information (SI). The NMR spectra of peptides **4** and **5** were measured in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  at concentrations  $\leq 10$  mM because aggregation was observed at higher concentrations.<sup>7a</sup> Intramolecular hydrogen bonding was evaluated by plotting the change in chemical shift of the amide and the pyrrole protons as a function of  $\text{DMSO-}d_6$  added to the peptide in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  (Figure 2), because exchangeable protons engaged in intramolecular hydrogen bonds are typically not influenced by strongly hydrogen bonding solvents like  $\text{DMSO-}d_6$  relative to exposed protons.<sup>7b,8</sup> The prolyl amide isomer equilibrium was measured in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , 2:1  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ : $\text{DMSO}$  and  $\text{DMSO}$  by integration of the

signals for the isomeric amide and  $\alpha$ -protons for **4a** and **5a** and the pyrrole protons for **4b** and **5b**. Finally, sequential and long distance NOEs were measured in the NOESY spectrum of each peptide to assess the presence of a turn conformation.

**Table 1.** Cis-isomer *N*-terminal to Pro and PyPro (conc.  $\cong$  10mM)  
% cis ( $\pm$ 1%)

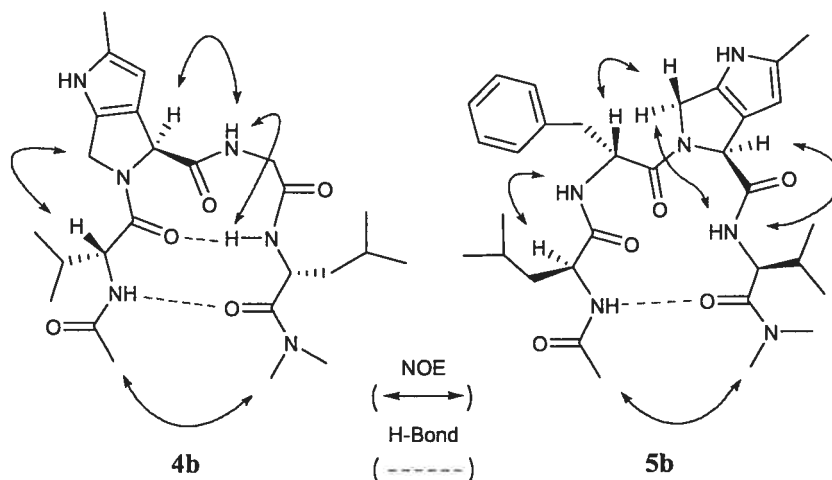
Peptide	% cis ( $\pm$ 1%)	
	2:1 CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :DMSO	DMSO
<b>4a:</b> Ac-D-Val- <b>Pro</b> -Gly-D-Leu-NMe <sub>2</sub>	12	19
<b>4b:</b> Ac-D-Val- <b>PyPro</b> -Gly-D-Leu-NMe <sub>2</sub>	15	18
<b>5a:</b> Ac-Leu-D-Phe- <b>Pro</b> -Val-NMe <sub>2</sub>	26	43
<b>5b:</b> Ac-Leu-D-Phe- <b>PyPro</b> -Val-NMe <sub>2</sub>	44	47

The influence of DMSO on the amide proton chemical shifts was respectively similar in peptides **4** and **5** (Figure 2). In **4**, the amide protons for Val and Leu were downfield from that for Gly in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and unaffected by the addition of DMSO relative to that for Gly, which was downfield shifted ( $\Delta\delta = 1.29$  ppm), indicative of its exposure to solvent. In peptide **5**, the Leu amide proton was unaffected by the solvent change, indicative of a solvent shielded NH. The Phe and Val amide protons were downfield shifted with the addition of DMSO indicative of their exposure to the effects of the solvent. In peptides **4b** and **5b**, the pyrrole-NH was influenced most by the solvent change ( $\Delta\delta = 1.95$  and 2.1 ppm, respectively). The most significant difference between the Pro and PyPro peptides was the magnitude of the chemical shift variation of the Phe amide proton which was larger for **5a** ( $\Delta\delta = 1.1$  ppm) than for **5b** ( $\Delta\delta = 0.6$  ppm), potentially due to a different orientation of the phenyl ring over the peptide backbone.



**Figure 2.** Amide proton NMR chemical shift  $\delta$  as a function of the percentage of DMSO in  $CD_2Cl_2$  for peptides **4** and **5** (conc.  $\approx 10$  mM).

The population of amide *cis*-isomer *N*-terminal to Pro and to PyPro (Table 2) was very similar in peptides **4** and **5**, and undetectable in  $CD_2Cl_2$ . In comparison with 20% *cis*-isomer in  $DMSO-d_6$  observed in a related  $\beta$ -hairpin octapeptide containing a central D-Pro-Gly residue,<sup>8</sup> peptides **4a** and **4b** exhibited similar amounts of *cis*-isomer (19% and 18%). Alternatively, relative to 39% *cis*-isomer observed in Ac-D-Phe-Pro-NH(Me) in  $DMSO$ ,<sup>1b</sup> peptides **5a** and **5b** exhibited slightly higher *cis*-isomer populations (43% and 47%). Assuming favored  $\beta$ -turn conformations, the lower amount of *cis*-isomer in **4** is consistent with stabilization of the *trans*-isomer by an intramolecular hydrogen bond.<sup>9</sup> The significantly higher *cis*-isomer in **5b** may be due to a favored staggered  $\pi$ - $\pi$  interaction between the phenyl and pyrrole ring in this conformer.<sup>1a,10</sup> The greatest difference in the *cis*-isomer population of Pro relative to PyPro was detected in 1:2  $DMSO:CD_2Cl_2$ , in which **5a** exhibited 25% and **5b** 44% *cis*-isomer, which may be due to a combination of favored aromatic stacking as described above and enhanced steric effects, from  $DMSO$  coordination to the pyrrole nitrogen, that disfavored the *trans*-isomer.



**Figure 3.** Selected  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY cross peaks in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  as well as potential hydrogen bonds from DMSO titration curves for peptides **4b** and **5b**

In **4** and **5** respectively, the NOESY spectra for the Pro and PyPro peptides exhibited similar correlations for  $\beta$ -turns in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  (Figure 3). The amide *trans*-isomer *N*-terminal to the Pro and PyPro residues was identified by NOEs between their  $\delta$ -protons and the  $\alpha$ -proton of the *N*-terminal residue. A long range NOE between the Gly and Leu amide protons was indicative of a turn conformer in **4**. Similarly, long range NOEs between the  $\delta$ -proton of Pro/PyPro and the Val amide hydrogen were indicative of a turn conformer in **5**. The presence of a turn geometry in **4** and **5** was respectively supported by long range NOEs between the acetyl and dimethyl amide singlets. Finally, sequential NOEs were observed between the neighboring Leu- $\text{C}^\alpha\text{H}$  and Phe-NH as well as Pro/PyPro- $\text{C}^\alpha\text{H}$  and Val-NH in **4** and between Pro/PyPro- $\text{C}^\alpha\text{H}$  and Gly-NH in **5**, indicative of their proximity in the major conformer.

For the first time, the influence of a fused  $\Delta^3$ -arylproline on peptide conformation has been studied by the synthesis of model peptides **4b** and **5b** containing PyPro **3**. The DMSO titration curves, *cis:trans* isomer ratios and NOESY spectra, all demonstrate an overall conservation of  $\beta$ -turn conformation on replacement of Pro by PyPro in peptides **4** and **5**. In light of the importance of turns in recognition events,<sup>11</sup> future efforts may employ PyPro analogs to create interactions for enhancing biological activity without perturbing conformation.

**Acknowledgment.** This research was supported in part by Merck Frosst Canada, NSERC Canada and FQRNT Québec. We thank Ms. Sylvie Bilodeau of the Regional High-Field NMR Laboratory for her assistance and Mr. Dalbir Sekhon for performing LC-MS experiments.

**Supporting Information Available:** Details on the syntheses, concentration and conformational analyses,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, DEPT, COSY and NOESY spectra for **4a-b** and **5a-b**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.



### 3.4 References (Article)

- (1) (a) Halab, L.; Lubell, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2474-2484 and refs therein. (b) Halab, L.; Lubell, W. D. *J. Peptide Sci.* **2001**, *7*, 92-104. (c) Beausoleil, E.; Sharma, R.; Michnick, S. W.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6572-6578 and refs therein. (d) Cavelier, F.; Vivet, B.; Martinez, J.; Aubry, A.; Didierjean, C.; Vicherat, A.; Marraud, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2917-2923. (e) DeRider, M. L.; Wilkens, S. J.; Wadell, M. J.; Bretscher, L. E.; Weinhold, F.; Raines, R. T.; Markley, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2497-2505. (f) Montelione, G. T.; Hughes, P.; Clardy, J.; Scheraga, H. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6765-6773.
- (2) Gibbs, A. C. G.; Bjorndahl, T. C.; Hodges, R. S.; Wishart, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1203-1213. .
- (3) (a) Felix, A. M.; Wang, C.-T.; Liebman, A. A.; Delaney, C. M.; Mowles, T.; Burghardt, B. A.; Charnecki, A. M.; Meienhofer, J. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1977**, *10*, 299-310 and refs therein. (b) Zhao, Z.; Liu, X.; Shi, Z.; Danley, L.; Buang, B.; Jiang, R.-T.; Tsai, M.-D. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3535-3536.
- (4) Jeannotte, G.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4656-4662; and refs 8, 11-13 cited therein.
- (5) Haque, T. S.; Little, J. C.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6975-6985.
- (6) Sato, K.; Higashijima, T.; Sugawara, R.; Nagai, U. *Bull. Chem Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 3699-3702.
- (7) (a) Details in SI. (b) Hydrogen bonding was also examined in the NH-stretch region of the IR spectra of 4 and 5, see SI.
- (8) Awasthi, S. K.; Raghothama, S.; Balaram, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *216*, 275-381.
- (9) Note: Ac-D-Ala-Pro-NH(Me) exhibits 36% *cis*-isomer in DMSO, see ref 1b.
- (10) (a) Yao, J.; Bruschiweiler, R.; Dyso, H. J.; Wright, P. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 12051-12052. (b) Wu, W.-J.; Raleigh, D. P. *Biopolymers* **1998**, *45*, 381-394.
- (11) Rose, G. D.; Gierash, L. M.; Smith, J. A. *Adv. Protein Chem.* **1985**, *27*, 1-109.

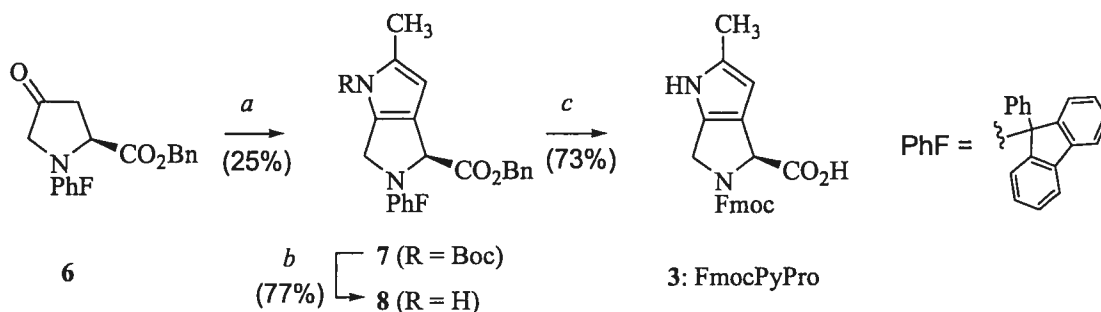
### 3.5 Supporting Information

Replacement of proline by  $\Delta^3$ -dehydroproline **1** in peptides and proteins has given analogs with similar and improved biological activity. For example, a  $\Delta^3$ -dehydroproline<sup>3</sup>-bradikinin analog exhibited nearly the same pharmacological activity as the parent peptide<sup>1</sup> and was a competitive inhibitor for prolyl hydroxylase.<sup>2</sup>  $\Delta^3$ -Dehydroproline<sup>7</sup>-oxytocin exhibited a two-fold increase in uterotonic and antidiuretic potency relative to the native peptide.<sup>3</sup> Moreover, in the protein adenylate kinase, mutation of the highly conserved Pro<sup>17</sup> residue with  $\Delta^3$ -dehydroproline gave a 7-fold increase in the  $K_{m,MgATP}$  kinetic parameter.<sup>4</sup>

Among the rare examples of a proline possessing a heterocycle fused to its 3- and 4-positions, regioisomeric 3-carboxy- and 3-hydroxyisoxazolinyl prolines were synthesized by dipolar cycloadditions on a protected  $\Delta^3$ -dehydroproline and exhibited neuroexcitatory activity and affinity at the AMPA and KAIN ionotropic receptors for glutamate.<sup>5</sup>

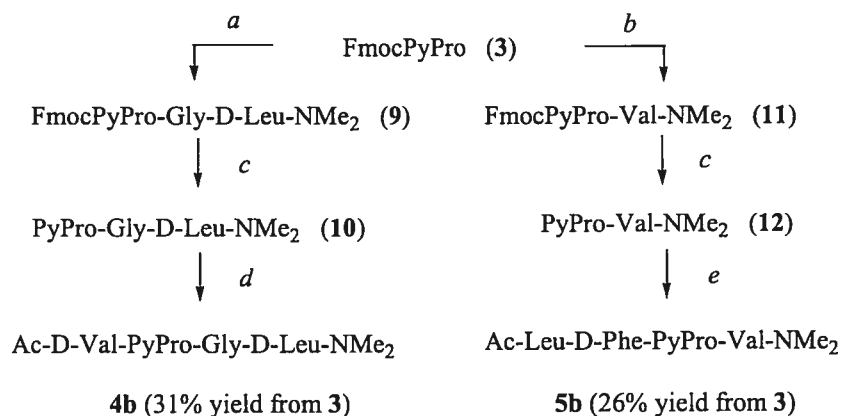
$N^\alpha$ -Fmoc-Pyrrolo-proline **3** was synthesized as reported by a sequence featuring the aldol condensation of Boc-alaninal onto the lithium enolate of *N*-PhF-4-oxo-proline **6** (PhF = 9-(9-phenylfluorenyl)),<sup>7</sup> acid catalyzed cyclisation, thermolytic removal of the Boc group, hydrogenolytic cleavage of the PhF-amine and benzyl ester groups, and acylation with FmocOSu (Scheme 1).<sup>6</sup> Prolyl peptides **4a** and **5a** were prepared by a  $N^\alpha$ -Boc-protection strategy in solution using TBTU, DIEA in  $CH_2Cl_2$ <sup>8</sup> for peptide couplings and HCl in dioxane for deprotections as described in detail in the experimental section.<sup>9</sup>

**Scheme 1. Synthesis of Protected Pyrrolo-Proline 3 for Peptide Synthesis<sup>6</sup>**



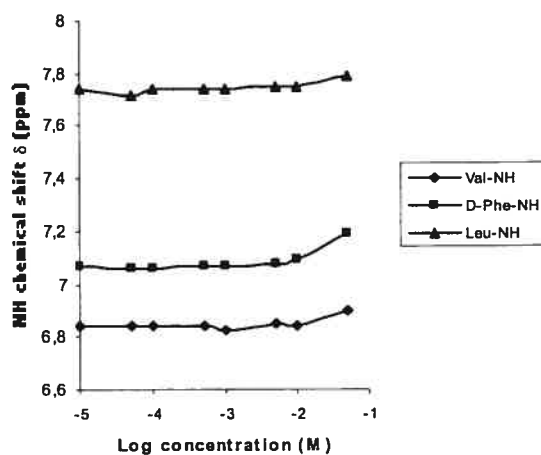
<sup>a</sup> (1) *n*-BuLi, THF, -78°C, (2) Boc-alaninal, THF, -78°C, (3) cat. HCl<sub>conc</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. <sup>b</sup> Δ 180°C, neat, 30 min. <sup>c</sup> (1) H<sub>2</sub>, Pd(OH)<sub>2</sub>, THF, MeOH, (2) FmocOSu, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, dioxane, water.

Pyrrolo-prolyl peptides **4b** and **5b** were synthesized by a *N*<sup>α</sup>-Fmoc-protection strategy in solution (Scheme 2) because Boc-protected pyrrolo-prolines were found to decompose on prolonged exposure to acid, such as TFA in dichloromethane and HCl in dioxane. In solution, cleavage of the Fmoc group using the common piperidine/DMF method was inconvenient because of difficulties removing the poorly volatile solvent and dibenzofulvene adduct. We attempted different conditions such as piperazino-fuctionalized silica gel<sup>10</sup> in chloroform,<sup>11</sup> that gave no reaction, and tris(2-aminoethyl)amine (TAEA) in chloroform,<sup>12</sup> which gave low yield, presumably because of the phosphate buffer extractions that were necessary for removing TAEA from the reaction mixture. The best conditions found for Fmoc group cleavage employed a catalytic amount of DBU in THF in the presence of octanethiol as a scavenger and provided the free amine of pyrrolo-proline peptides **10** and **12** in 85 and 89 % yields after purification by chromatography on silica gel.<sup>13</sup> The free amines were then directly coupled to the acetylated amino acid or dipeptide using TBTU to provide the final peptides after preparative HPLC. Some epimer (less the 5 %) due to coupling of acetyl amino acid or dipeptide, could be detected by LCMS and was removed during purification.

**Scheme 2.** Synthesis of Model Peptides **4b** and **5b** from FmocPyPro **3**.

<sup>a</sup> HCl·Gly-D-Leu-NMe<sub>2</sub>, TBTU, DIEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. <sup>b</sup> HCl·Val-NMe<sub>2</sub>, TBTU, DIEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. <sup>c</sup> HS(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>, DBU, THF. <sup>d</sup> Ac-D-Val, TBTU, DIEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. <sup>e</sup> Ac-Leu-D-Phe, TBTU, DIEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

No aggregation of the enantiomer of **4a** was found previously between 0.01 and 50 mM.<sup>9</sup> The variation of the chemical shift of the amide protons of peptide **5a** was plotted as a function of the logarithm of the peptide concentration in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Figure 4). No significant variation of the chemical shift was observed at ≤10 mM, indicative of a monomeric state below this concentration range.



**Figure 4.** Amide proton NMR chemical shifts in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> at room temperature as a function of the logarithm of peptide concentration for **5a**

Similar chemical shift and coupling constant data were observed for Pro and PyPro peptides **4** in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and 2:1 CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:DMSO (Table 2). In CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, D-Val and D-Leu amide proton were downfield of the Gly-NH, indicative of an intramolecular hydrogen bond for these residues. In DMSO, the Gly amide proton appeared further downfield relative to the amide protons of D-Val and D-Leu probably due to hydrogen bonding with DMSO. In both solvents, larger coupling constants  $^3J_{\alpha\text{H-NH}}$  were measured for Val and Leu relative to Gly, indicative of  $\phi$  dihedral angles in extended versus bent geometry.

**Table 2.** Chemical shifts and coupling constants for peptides **4a** and **4b** in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and 2:1 CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:DMSO-*d*<sub>6</sub><sup>b</sup>

Peptide <sup>a</sup>	Solvent	D-Val-NH $\delta$ ( $^3J_{\alpha\text{H-NH}}$ )	Gly-NH $\delta$ ( $^3J_{\alpha\text{H-NH}}$ )	D-Leu-NH $\delta$ ( $^3J_{\alpha\text{H-NH}}$ )
Pro <b>4a</b>	CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	7.84 (7.8)	6.92 (5.7)	7.55 (8.3)
PyPro <b>4b</b>		8.31 (8.1)	6.49 (5.4)	7.61 (7.9)
Pro <b>4a</b>	2:1 CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	7.83 (8.0)	7.95 (5.8)	7.54 (8.4)
PyPro <b>4b</b>		7.97 (8.5)	7.83 (5.8)	7.47 (8.3)

<sup>a</sup> conc.  $\approx$  10 mM. <sup>b</sup> major isomer

In the case of peptide **5** (Table 3), the chemical shift order in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was Leu-NH downfield from Phe-NH downfield from Val-NH, indicative of a hydrogen-bound Leu amide proton and a Phe amide proton experiencing the influence of aromatic ring current. Similarly, downfield shifted Leu and Phe amide proton signals have been observed in the related cyclic peptide gramicidin S (GS) in DMSO-*d*<sub>6</sub> (Table 3).<sup>14</sup> In this case, as in the case of **5** in 2:1 CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:DMSO-*d*<sub>6</sub>, Phe-NH comes furthest downfield, followed by Leu-NH and Val-NH. The  $^3J_{\alpha\text{H-NH}}$  coupling constant pattern for **5** follows the same trend as for GS, with the amide protons

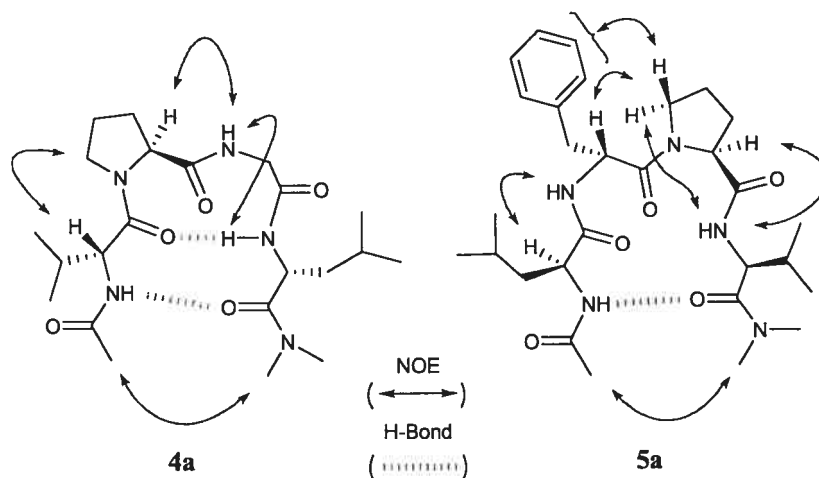
for Leu and Val exhibiting larger values than for Phe, which in GS is due to the *syn*-periplanar geometry of the Phe  $\alpha$ H and NH protons. The larger  $^3J_{\alpha\text{H-NH}}$  value for the Phe amide protons in **5a** and **5b** relative to GS is likely due to greater conformational flexibility of the linear peptide analogues.

**Table 3.** Comparative chemical shifts and coupling constants for the peptides **5a** and **5b**,<sup>b</sup> and for Gramicidin S<sup>c</sup>

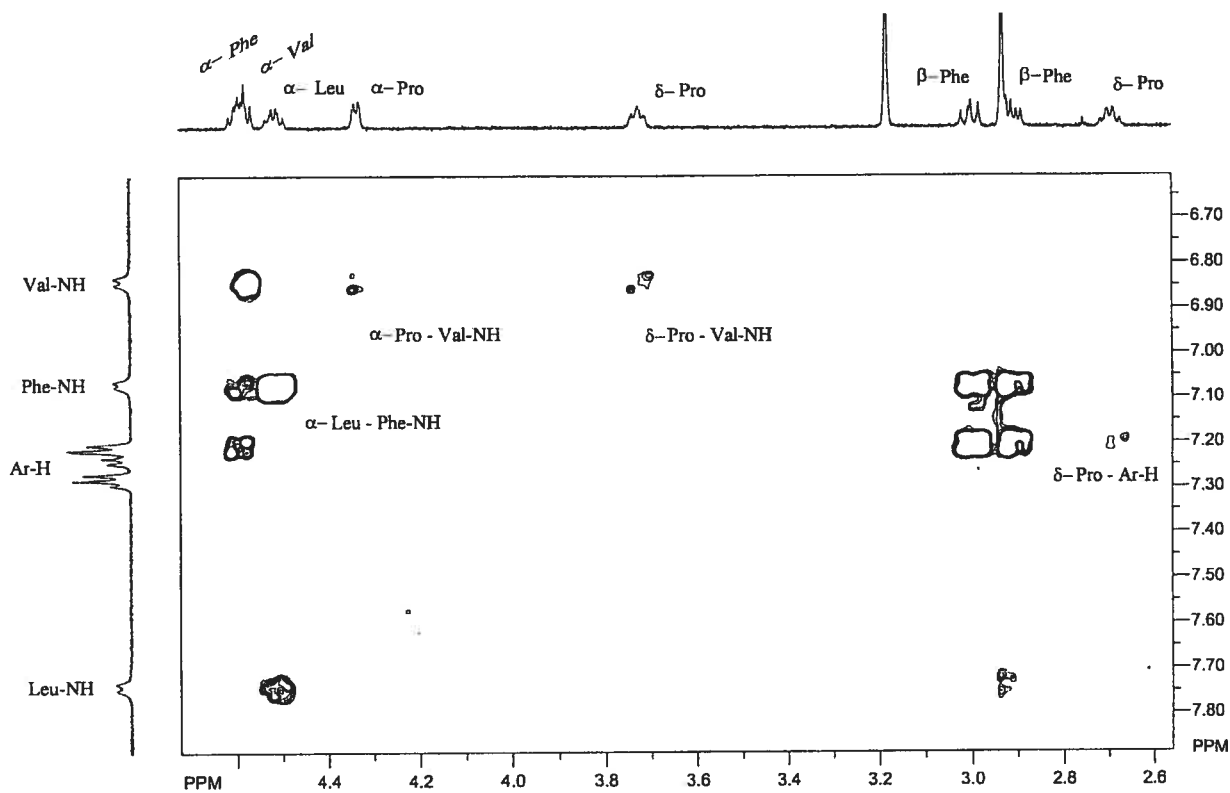
Peptide <sup>a</sup>	Solvent	Leu-NH	Phe-NH	Val-NH
		$\delta$ ( $^3J_{\alpha\text{H-NH}}$ )	$\delta$ ( $^3J_{\alpha\text{H-NH}}$ )	$\delta$ ( $^3J_{\alpha\text{H-NH}}$ )
Pro <b>5a</b>	CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	7.78 (7.8)	7.12 (5.9)	6.86 (7.1)
PyPro <b>5b</b>		7.63 (8.5)	7.40 (7.2)	6.64 (8.9)
Pro <b>5a</b>	2:1 CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	7.64 (7.9)	8.18 (6.2)	7.32 (9.0)
PyPro <b>5b</b>		7.60 (7.8)	8.00 (7.4)	7.27 (8.4)
Gramicidin S <sup>c</sup>	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	8.32 (9.2)	9.05 (2.6)	7.21 (9.7)

<sup>a</sup> conc.  $\cong$  10 mM. <sup>b</sup> of the major isomer. <sup>c</sup> values from ref 12

Different Phe side-chain orientations in **5a** and **5b** are suggested by the chemical shift differences ( $\Delta\delta$ ) for their  $\delta$  protons, which were respectively 1.05 ppm and 0.66 ppm. The phenylalanine aromatic ring current influences the upfield  $\delta$ -proton greater in the Pro analog. Similar aromatic ring current effects have been suggested to upfield shift one of the proline  $\delta$ -protons in a GS analogue.<sup>15</sup> Further support for the greater proximity of the aromatic ring to the  $\delta$ -protons in Pro peptide **5a** was the apparent NOE between the aromatic protons and the upfield shifted  $\delta$ -proton in **5a**, which was not observed with **5b** (Figure 3 and 5).



**Figure 5.** Selected  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY cross peaks in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  as well as potential hydrogen bonds from DMSO titration curves for peptides **4a** and **5a**



**Figure 6:** Expanded NOE spectrum of peptide **5a** in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$

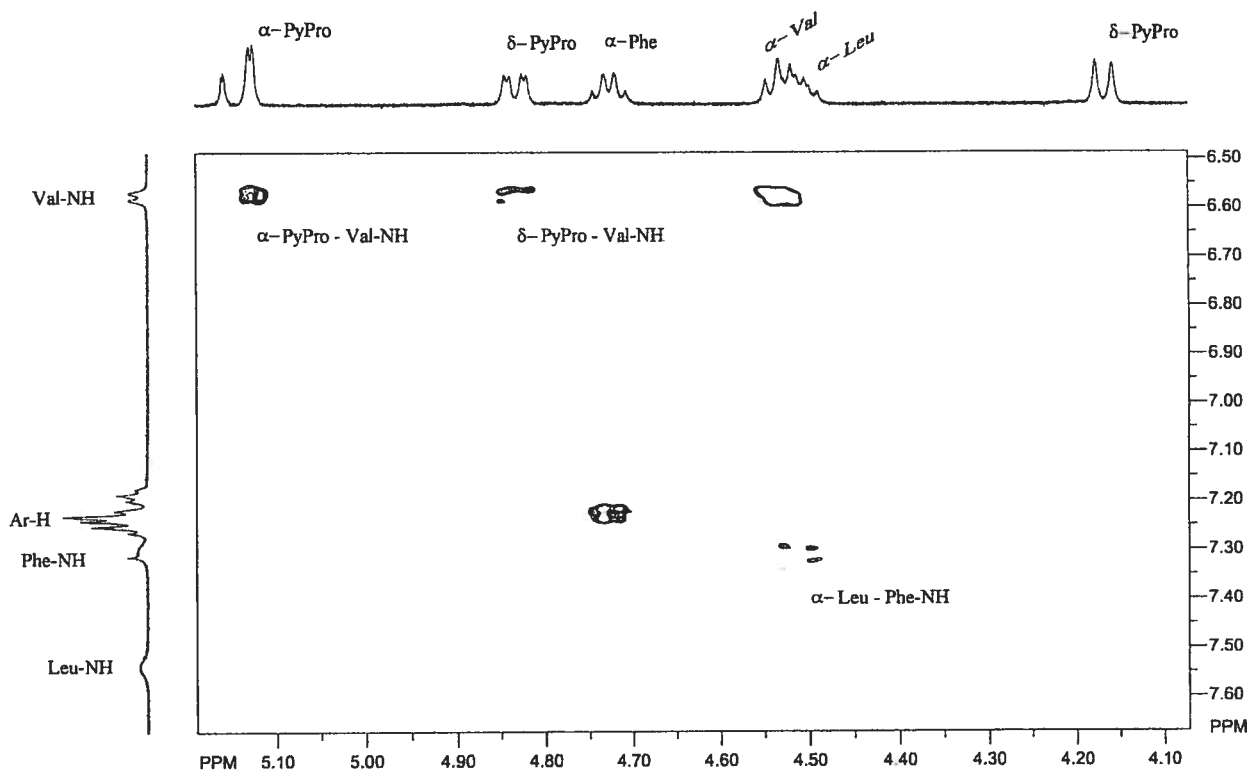


Figure 7: Expanded NOE spectrum for peptide 5b in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

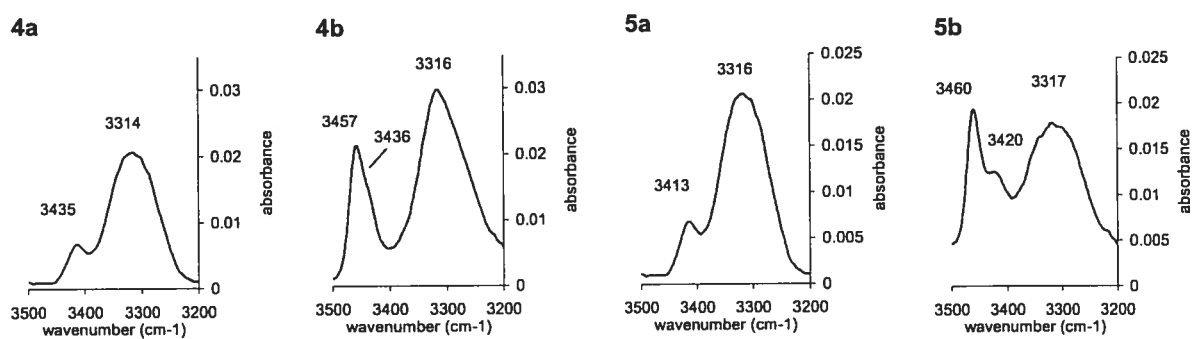


Figure 8: NH-stretch regions from IR spectra of 4 and 5 in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> at [1 mM]



The NH-stretch region of the IR spectra of peptides **4** and **5** was analysed in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> at [1mM]. As reported previously for the enantiomer of **4a**,<sup>9</sup> a characteristic hairpin IR profile was observed exhibiting a minor band at around 3410-3440 cm<sup>-1</sup> corresponding to the exposed NH-amide and a stronger band near 3320 cm<sup>-1</sup> due to the two hydrogen-bonded NHs. Similar characteristic bands were observed in the IR spectra of the other three peptides (Figure 8). PyPro peptides **4b** and **5b** exhibited an additional band near 3460 cm<sup>-1</sup> due to the pyrrole NH-stretch that shouldered the minor amide-NH. Comparisons of the IR data for the Pro and PyPro peptides demonstrate as well a conservation of conformation.

### 3.6 Materials and Methods

**General.** Unless otherwise noted, all reactions were run under an argon atmosphere and distilled solvents were transferred by syringe. Dry dichloromethane and THF were taken from a Solvent Dispensing System (GlassContour™); DIEA was double distilled from ninhydrin and CaH<sub>2</sub>. Final reaction mixture solutions were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Chromatography was on 230-400 mesh silica gel; TLC on aluminum-backed silica plates. Mass spectral data, HRMS (EI &FAB), were obtained by the Regional Center for Mass Spectrometry at the Université de Montréal. Chemical shifts for NMR data are given in ppm ( $\delta$  units) and coupling constants are given in hertz. Final peptides were characterized by HPLC using the following conditions: 40-80% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, over 20 min with a flow rate of 0.5 ml/min on a Prevail C<sub>18</sub> column (250 x 4.6mm).

**IR Spectroscopy.** Spectra were obtained on a Perkin Elmer FT-IR spectrometer. Samples were prepared in dried  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , the spectrum of the pure solvent was subtracted prior to analysis. Peaks in the amide NH stretch region were baseline corrected and analysed without further manipulation.

**NMR Spectroscopy.** 1D and 2D spectra for aggregation studies and conformational analyses were performed on a Varian 600 MHz spectrometer and the data were processed with SpinWorks 2.3. Samples were prepared by serial dilution of a 50 mM stock solution of peptide in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  (dried over 3Å molecular sieves). Samples for NOESY (1 mM) were degassed using the Freeze-Pump-Thaw technique. NOESY spectra were recorded with a time domain size of 2048 by 512 points and 64 scan with a mixing time of 900 ms.

**Synthesis of the Proline Containing Peptides.** Prolyl peptides **4a** and **5a** were prepared by a solution phase strategy using *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU)<sup>8</sup> as coupling reagent with Boc-amino acids. Representative procedures are given below.

**General Procedure for Boc deprotections, HCl·Val-NMe<sub>2</sub>.** A solution of Boc-Val-NMe<sub>2</sub> (500 mg, 2.05 mmol) in dioxane (10 ml) was treated for 2 h with HCl gas bubbles that were generated by slow addition of  $\text{H}_2\text{SO}_4$ (conc) onto NaCl. The mixture was evaporated and triturated with  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 x 10 ml) to give HCl·Val-NMe<sub>2</sub> (300 mg, 1.66 mmol, 81%) as a hygroscopic white solid.

**General Procedure for coupling reactions, Boc-Pro-Val-NMe<sub>2</sub>.** A solution of Boc-Pro-OH (100 mg, 0.46 mmol) in 6 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was treated with TBTU (177 mg, 0.55 mmol) and DIEA (82  $\mu\text{L}$ , 0.47 mmol), stirred for 15 min, cooled to 0°C, treated with a solution of HCl·Val-NMe<sub>2</sub> (92 mg, 0.51 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 mL), followed by DIEA (160  $\mu\text{L}$ , 0.92 mmol).

After stirring for 10-12 h at room temperature, the reaction mixture was washed with water (5 mL), 0.1 N HCl (3 x 5 mL), saturated NaHCO<sub>3</sub> (3 x 5 mL) and brine, dried and concentrated to a residue, that was chromatographed eluting with 0-5 % MeOH in chloroform to give 145 mg (0.42 mmol, 92 %) of the desired dipeptide as a white solid.

**General Procedure for final peptide acetylation, Ac-Leu-D-Phe-Pro-Val-NMe<sub>2</sub> (5a).**

A solution of the tetrapeptide Boc-Leu-D-Phe-Pro-Val-NMe<sub>2</sub> (60 mg, 0.1 mmol) was deprotected with HCl bubbles as described above. The resulting HCl salt was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 mL), cooled to 0°C, treated with DIEA (52 µL, 0.3 mmol) and Ac<sub>2</sub>O (15 µL, 0.16 mmol) and stirred at room temperature for 3 h, then washed with 0.1 N HCl (2 x 4 mL), saturated NaHCO<sub>3</sub> (2 x 4 mL) and brine, dried and concentrated to a residue, that was chromatographed eluting with 0-5 % MeOH in chloroform to give 42 mg (0.073 mmol, 73 %) of the desired tetrapeptide as a white solid.

**Ac-D-Val-Pro-Gly-D-Leu-NMe<sub>2</sub> (4a):** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10 mM) 0.90 (d, 3 H, *J* = 3.3), 0.92 (d, 3 H, *J* = 3.2), 0.94 (d, 3 H, *J* = 6.7), 0.99 (d, 3 H, *J* = 6.7), 1.41 (ddd, 1 H, *J* = 4.5, 8.9, 13.6), 1.64 (m, 1 H), 1.76 (m, 1 H), 1.94 (s, 3 H), 1.95-2.14 (m, 4 H), 2.20 (m, 1 H), 2.90 (s, 3 H), 3.14 (s, 3 H), 3.56 (dd, 1 H, *J* = 5.9, 17.3), 3.62 (m, 1 H), 3.96 (dd, 1 H, *J* = 7.2, 17.3), 4.1 (m, 1 H), 4.35 (m, 2 H), 5.32 (ddd, 1 H, *J* = 4.5, 8.6, 13.0), 6.92 (t, 1 H, *J* = 5.7), 7.55 (d, 1 H, *J* = 8.3), 7.84 (d, 1 H, *J* = 7.8); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 19.0, 19.3, 21.9, 22.7, 23.4, 24.9, 25.3, 29.6, 30.9, 36.0, 37.5, 41.1, 42.9, 47.4, 48.1, 57.6, 61.8, 169.0, 172.1, 172.5, 172.6, 173.2; HPLC RT: 12.26 min; MS: 454.2 (MH<sup>+</sup>).

**Ac-Leu-D-Phe-Pro-Val-NMe<sub>2</sub> (5a):** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10 mM) δ 0.88 (m, 12 H), 1.49 (m, 1 H), 1.49-1.65 (m, 5 H), 2.00 (s, 3 H), 2.04 (m, 1 H), 2.13 (m, 1 H), 2.67 (m, 1 H), 2.90 (dd, 1 H, *J* = 6.2, 12.8), 2.93 (s, 3 H), 2.97 (dd, 1 H, *J* = 9.7, 12.8), 3.18 (s, 3 H), 3.72 (m, 1

H), 4.33 (d, 1 H,  $J = 6.4$ ), 4.51 (q, 1 H,  $J = 6.8$ ), 4.56-4.62 (m, 2 H), 6.86 (d, 1 H,  $J = 7.1$ ), 7.12 (d, 1 H,  $J = 5.9$ ), 7.19-7.30 (m, 5 H), 7.78 (d, 1 H,  $J = 7.8$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  18.6, 19.2, 22.4, 22.9, 23.1, 24.3, 25.0, 29.7, 31.0, 36.0, 37.5, 37.9, 39.5, 47.0, 50.6, 53.8, 54.3, 60.9, 127.3, 128.8, 129.7, 136.8, 171.1, 171.3, 171.7, 172.3, 173.8. HPLC RT: 19.17 min; MS: 544.2 ( $\text{MH}^+$ ).

**Fmoc-PyPro-Gly-D-Leu-NMe<sub>2</sub> (9).** Fmoc-PyPro-OH (**3**, prepared as described in Ref 6, 87 mg, 0.22 mmol) was coupled to HCl·Gly-D-Leu-NMe<sub>2</sub> (68 mg, 0.27 mmol) using the general coupling procedure described above to give 86 mg (0.147 mmol, 67 %) of the desired tripeptide.

**Fmoc-PyPro-Val-NMe<sub>2</sub> (11).** Fmoc-PyPro-OH (**3**, 80 mg, 0.20 mmol) was coupled to HCl·Val-NMe<sub>2</sub> (40 mg, 0.22 mmol) using the general coupling procedure described above to give 72 mg (0.14 mmol, 70 %) of the desired dipeptide.

**General Procedure for the Fmoc Deprotection. PyPro-Gly-D-Leu-NMe<sub>2</sub> (10).** At room temperature, a stirred solution of Fmoc-PyPro-Gly-D-Leu-NMe<sub>2</sub> (**9**, 200 mg, 0.34 mmol) and octanethiol (590  $\mu\text{L}$ , 3.4 mmol, 1000 mol%) in THF (4 mL) was treated with a 1 % (v/v) solution of DBU in THF (225  $\mu\text{L}$ , 5 mol %), stirred for 2 h and evaporated to a residue, that was triturated with Et<sub>2</sub>O (3 x 10 mL) and chromatographed eluting with 0-5 % MeOH in chloroform containing 1 % of Et<sub>3</sub>N to give PyPro-Gly-D-Leu-NMe<sub>2</sub> (**10**, 105 mg, 85 %):  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, pyridine- $d^5$ )  $\delta$  0.79 (d, 3 H,  $J = 6.4$ ), 0.94 (d, 3 H,  $J = 6.4$ ), 1.53 (m, 1 H), 1.65 (m, 1 H), 1.76 (m, 1 H), 2.27 (s, 3 H), 2.89 (s, 3 H), 2.97 (s, 3 H), 4.20 (s, 2 H), 4.35 (dd, 1 H,  $J = 16.9$ , 4.5), 5.53 (dd, 1 H,  $J = 16.9$ , 5.4), 5.17 (s, 1 H), 5.31 (m, 1 H), 6.29 (s, 1 H), 9.08 (d, 1 H,  $J = 8.3$ ), 9.19 (s, 1 H), 11.2 (s, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, pyridine- $d^5$ )  $\delta$  14.3, 22.4, 23.8, 25.4, 35.9, 37.1, 42.4, 43.4, 46.7, 48.1, 63.1, 101.7, 125.5, 132.5, 133.5, 169.9, 172.8, 175.1; HRMS calcd for C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> ( $\text{M}^+$ ) 363.2270, found 363.2255.

**PyPro-Val-NMe<sub>2</sub> (12).** Fmoc-PyPro-Val-NMe<sub>2</sub> (**11**, 79 mg, 0.15 mmol) was deprotected using the general Fmoc deprotection procedure described above to give PyPro-Val-NMe<sub>2</sub> (**12**, 39 mg, 89 %): <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.80 (d, 3 H, *J* = 6.7), 0.88 (d, 3 H, *J* = 6.7), 1.99 (m, 1 H), 2.23 (s, 3 H), 2.96, (s, 3 H), 3.13 (s, 3 H), 4.13 (s, 2 H), 4.71 (1 H, dd, *J* = 6.9, 9.2), 4.81 (m, 1 H), 5.84 (s, 1 H), 7.99 (d, 1 H, *J* = 9.2), 8.16 (s, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.8, 17.8, 19.6, 31.7, 35.8, 37.6, 46.0, 53.4, 61.9, 100.8, 124.0, 131.1, 132.8, 172.0, 172.7; HRMS calcd for C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (M<sup>+</sup>) 292.1899, found 292.1900.

**Ac-D-Val-PyPro-Gly-D-Leu-NMe<sub>2</sub> (4b):** At 0°C, a solution of PyPro-Gly-D-Leu-NMe<sub>2</sub> (**10**, 100 mg, 0.275 mmol) and Ac-D-Val-OH (50 mg, 0.3 mmol) in 10 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was treated with TBTU (106 mg, 0.33 mmol) and DIEA (105 μL, 0.6 mmol). After stirring for 12 h, the mixture was washed with water (8 mL), 0.1 N HCl (3 x 8 mL), saturated NaHCO<sub>3</sub> (3 x 8 mL) and brine, dried and concentrated to a residue that was purified by HPLC (20-80 % CH<sub>3</sub>CN in water, 0.01 % TFA, C<sub>18</sub> column) to provide Ac-D-Val-PyPro-Gly-D-Leu-NMe<sub>2</sub> (**5a**, 81 mg, 54 %): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ≅10 mM) δ 0.92 (d, 3 H, *J* = 6.8), 0.94 (d, 3 H, *J* = 6.8), 0.98 (d, 3 H, *J* = 6.7), 1.02 (d, 3 H, *J* = 6.7), 1.43 (ddd, 1 H, *J* = 4.3, 9.0, 13.5), 1.67 (m, 1 H), 1.84 (ddd, 1 H, *J* = 4.5, 10.5, 14.2), 1.98 (s, 3 H), 2.15 (m, 1 H), 2.25 (s, 3 H), 2.92 (s, 3 H), 3.16 (s, 3 H), 3.47 (dd, 1 H, *J* = 5.5, 17.4), 4.11 (dd, 1 H, *J* = 7.4, 17.4), 4.43 (t, 1 H, *J* = 9.1), 4.77 (d, 1 H, *J* = 11.6), 4.95 (m, 1 H), 5.25 (dd, 1 H, *J* = 2.6, 11.6), 5.31 (mask by CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1H), 5.76 (s, 1 H), 6.49 (t, 1 H, *J* = 5.4), 7.61 (d, 1 H, *J* = 7.9), 8.27 (s, 1 H), 8.31 (d, 1 H, *J* = 8.1); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 13.6, 18.8, 19.3, 21.7, 22.4, 23.3, 24.9, 30.7, 36.0, 37.5, 40.8, 42.8, 47.6, 48.2, 57.5, 63.9, 100.2, 119.9, 127.7, 133.4, 169.4, 171.2, 172.6, 173.22, 173.27. HPLC RT: 12.66 min; MS: 505.2 (MH<sup>+</sup>).

**Ac-Leu-D-Phe-PyPro-Val-NMe<sub>2</sub> (5b):** At 0°C, a solution of PyPro-Val-NMe<sub>2</sub> (**12**, 49 mg, 0.168 mmol) and Ac-Leu-D-Phe-OH (54 mg, 0.168 mmol) in 4.2 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was treated with TBTU (59 mg, 0.18 mmol) and DIEA (88 μL, 0.5 mmol). After stirring for 12 h, the mixture was washed with water (4 mL), 0.1 N HCl (3 x 4 mL), saturated NaHCO<sub>3</sub> (3 x 4 mL) and brine, dried and concentrated to a residue that was purified by HPLC (20-80 % CH<sub>3</sub>CN in water, 0.01 % TFA, C<sub>18</sub> column) to provide Ac-Leu-D-Phe-PyPro-Val-NMe<sub>2</sub> (**5b**, 42 mg, 42 %): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ≅10 mM) δ 0.67 (d, 3 H, *J* = 6.7), 0.77 (d, 3 H, *J* = 6.7), 0.85 (d, 3 H, *J* = 6.1), 0.88 (d, 3 H, *J* = 6.1), 1.50 (m, 1 H), 1.57 (m, 2 H), 1.98 (m, 1 H), 2.00 (s, 3 H), 2.21 (s, 3 H), 2.91 (dd, 1 H, *J* = 6.5, 13.4), 2.93 (s, 3 H), 3.10 (dd, 1 H, *J* = 8.7, 13.4), 3.17 (s, 3 H), 4.19 (d, 1 H, *J* = 11.7), 4.53 (m, 2 H), 4.74 (q, 1 H, *J* = 7.6), 4.84 (dd, 1 H, *J* = 3.1, 11.7), 5.14 (d, 1 H, *J* = 3.1), 5.72 (s, 1 H), 6.64 (d, 1 H, *J* = 8.9), 7.19-7.25 (m, 5 H), 7.40 (d, 1 H, *J* = 7.2), 7.63 (d, 1 H, *J* = 8.5), 7.93 (s, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 13.6, 18.0, 19.1, 22.2, 22.99, 23.02, 25.0, 31.2, 36.1, 37.5, 37.9, 40.1, 47.5, 51.3, 53.2, 54.0, 63.2, 100.5, 121.2, 126.9, 127.2, 128.8, 129.7, 132.7, 137.0, 170.76, 170.83, 171.8, 172.5, 173.6. HRMS calcd for C<sub>32</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> (MH<sup>+</sup>) 595.3608, found 595.3602. HPLC RT: 15.54 min.

### 3.7 References (Supporting info)

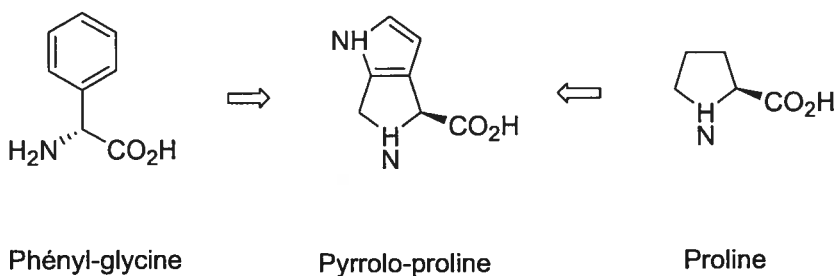
- (1) Felix, A. M.; Jimenez, M. H.; Vergona, R.; Cohen, M. R. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1973**, *5*, 201-206.
- (2) McGee, J. O. D.; Jimenez, M. H.; Felix, A. M.; Cardinale, G. J.; Udenfriend, S. *Arch. Biochem Biophys.* **1973**, *154*, 483-487.
- (3) Moore, S.; Felix, A. M.; Meienhofer, J. *J. Med Chem.* **1977**, *20*, 495-500.
- (4) Zhao, Z.; Liu, X.; Shi, Z.; Danley, L.; Buang, B.; Jiang, R.-T.; Tsai, M.-D. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3535-3536.
- (5) Conti, P.; De Amici, M.; De Sarro, G.; Rizzo, M.; Stensbol, T. B.; Brauner-Osborne, H.; Madsen, U.; Toma, L.; De Micheli, C. *J. Med Chem.* **1999**, *42*, 4099-4107.
- (6) Jeannotte, G.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, In Press.
- (7) Sharma, R.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 202-209.
- (8) Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen, D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.
- (9) Haque, T. S.; Little, J. C.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6975-6985.
- (10) We thank Silicycle Inc. for providing a sample of piperazine functionalized silica gel.
- (11) Carpino, L. A.; Mansour, E. M. E.; Knapczyk, J. *J. Org. Chem.* **1983**, *43*, 666-669.
- (12) Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D.; Beyermann, M. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1673-1675.
- (13) Sheppeck II, J. E.; Kar, H.; Hong, H. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5329-5333.
- (14) Bach II, A. C.; Markwalder, J. A.; Ripka, W. C. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *38*, 314-323.
- (15) Gibbs, A. C. G.; Bjorndahl, T. C.; Hodges, R. S.; Wishart, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1203-1213.

## **CHAPITRE 4**

### **Conclusion et travaux futurs**



Ce mémoire a été consacré à la synthèse et aux applications d'une chimère entre la proline et la phényl-glycine donnant naissance au dérivé pyrrolo-proline, le premier exemple d'aryl-glycine fusionné obtenu de façon énantiomériquement pure.



**Figure 1** : Dualité du dérivé pyrrolo-proline

Dans un premier temps, deux approches ont été développées pour la synthèse de ce composé à partir de la 4-oxo-proline. Tout d'abord, l'allylation suivie par une oxydation de type Wacker a permis d'obtenir le 1,4-dicétone, qui a pu être converti sélectivement en pyrrolo-proline, pyrrolo-pyrrole et pyridazino-pyrrole; trois hétérocycles n'ayant jamais été obtenus auparavant. Une autre approche a aussi été développée impliquant une condensation aldolique de la 4-oxo-proline sur différents Boc- $\alpha$ -amino-aldéhydes, suivie par une cyclisation en présence d'acide catalytique pour obtenir le pyrrolo-proline désiré. Cette approche a permis d'augmenter la diversité à la position 2 du pyrrole et la déprotection sélective du groupement Boc a permis l'alkylation de l'azote avec différents électrophiles. Enfin, la déprotection par hydrogénation des groupements benzyle et phénylfluorényle suivie par une protection subséquente avec les groupes Boc, Fmoc et Moz a permis d'obtenir des analogues pouvant être utilisés en synthèse peptidique.

Dans le troisième chapitre, pyrrolo-proline a été comparé à la proline en ce qui attrait à l'effet sur la conformation des peptides. Pour cette étude, deux tetrapeptides possédant respectivement la proline en position  $i+1$  et  $i+2$  d'un repliement  $\beta$  ont été sélectionnés. La synthèse des peptides contenant le motif pyrrolo-proline a nécessité le développement de conditions pour le couplage et la déprotection en solution du dérivé Fmoc-pyrrolo-proline, puisque la déprotection du groupement Boc a provoqué la décompositon du produit. L'étude comparative des tetrapeptides contenant proline et pyrrolo-proline par spectroscopie RMN 1D et 2D a démontré une conservation globale de la conformation. Cette habilité qu'a notre analogue à maintenir la conformation en fait donc un outil intéressant pour l'étude de sites de reconnaissance par modification du noyau proline dans les peptides biologiquement actifs.

Les travaux présentés dans ce mémoire ouvrent donc la voie à une étude plus approfondie de la synthèse et des applications possibles de l'analogue pyrrolo-proline. Tout d'abord, au niveau de la synthèse, il serait intéressant d'obtenir le dérivé pyridazino-proline, décrit dans le deuxième chapitre, sous sa forme déprotégée. Un tel composé est aussi un intéressant analogue d'aryl-glycine fusionné et pourrait peut-être démontrer une plus grande stabilité en milieu acide que le pyrrolo-proline. En ce qui concerne la synthèse peptidique, l'utilisation d'un support solide de type Wang pour la préparation des peptides pourrait permettre d'employer plus efficacement le dérivé Fmoc-pyrrolo-proline pour préparer une librairie de peptides dans le but d'étudier leur activité biologique.

En résumé, notre recherche sur la synthèse des dérivés pyrrolo-prolines a permis de développer une méthodologie efficace pour la préparation de ces composés de façon

énantiomériquement pure. Le premier exemple d'hétéroarylproline fusionné a pu être introduit dans des peptides pour démontrer une conservation de la conformation. Les travaux présentés dans ce mémoire sont donc significatifs, autant au niveau de la peptido-mimétique et ouvrent la voie à une étude plus approfondie des applications possibles des  $\Delta^3$ -arylprolines fusionnés au niveau de la chimie médicinale.